



Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología

Características Clínicas, Inmunológicas y Moleculares en Pacientes con Agammaglobulinemia Ligada al Cromosoma X o Síndrome de Bruton

Tesis Doctoral de Antonia Álvarez Márquez

DIRECTORES:

Dr. Antonio Núñez Roldán
Dra. Berta Sánchez Sánchez
Dr. Francisco Vela Casas

Sevilla, 2009

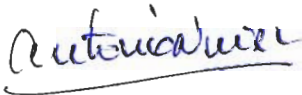
D. Antonio Núñez Roldán, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, **D^a Berta Sánchez Sánchez**, Doctora en Biología de la Universidad de Sevilla y **D. Francisco Vela Casas**, Profesor del Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que **D^a Antonia Álvarez Márquez**, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su conjunta dirección el trabajo titulado:

“**CARACTERÍSTICAS CLINICAS, INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES EN PACIENTES CON AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X O SÍNDROME DE BRUTON**”, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para que pueda proceder a su lectura y defensa para optar al título de Doctor.

Sevilla, 5 de octubre de 2009

Vº Bº de los Directores



D. Antonio Núñez Roldán



D. Francisco Vela Casas



D^a Berta Sánchez Sánchez

Quiero manifestar mi sincero agradecimiento a todas las personas que, de un modo directo o indirecto, han contribuido a que la realización de este trabajo haya sido posible. En primer lugar a mis directores de tesis, el Dr. Antonio Núñez, por haberme permitido realizar este proyecto bajo su dirección, por su disponibilidad, por su visión crítica y por sus consejos para la realización y presentación de este proyecto, a la Dra. Berta Sánchez, a la que admiro en lo profesional y sobre todo en lo personal, a la que considero, sobre todo una amiga, por la confianza que ha depositado siempre en mí, por su dedicación y por el interés que manifestó en este trabajo desde un principio, y al Dr. Vela Casas, por su accesibilidad y disposición a la hora de discutir los resultados y por sus consejos para la presentación de este proyecto.

A la Unidad de Inmunología y Alergología Pediátrica del Hospital Universitario Virgen del Rocío, en especial a la Dra. Cristina Casas y al Dr. José Luis Madrazo, por la aportación de pacientes al estudio y con quienes tuve la suerte de aprender. A Lucía, y al personal de la Unidad de Día del Hospital Infantil, por su infinita paciencia y colaboración.

A la sección de Inmunopatología del Servicio de inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, en especial a la Dra. Wichmann y a Maribel Magariño, por el análisis de la actividad hemolítica del complemento en todos los casos con sospecha de inmunodeficiencia.

A la Dra. María Dolores Mendoza del Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos y a la Dra. Pilar Noguero, del Servicio de Hematología por su inestimable colaboración.

Al Centro Regional de Transfusiones Sanguíneas, en especial a la Dra. Gertrudis Pereira por su permanente disposición a colaborar.

También quiero agradecer a todos mis compañeros del Servicio de Inmunología, que me han animado y apoyado desde el primer día que pisé el laboratorio hasta que me fui, haciendo que me sintiera como en casa. Un recuerdo especial a Mari Paz, Yolanda, Maribel, Charo, Toñi Torres, Manoli, Pili, Encarnita Sánchez, Marisa, Lourdes, Carmen y José Manuel, por su cariñosa acogida desde el primer momento en que empecé la especialidad.

A mis compañeros y amigos, Sonia, Olga, Belén, Mercedes, Nieves, Merche, José Manuel, José Luis, Cristina, María José, Mari Carmen, Ana, Marco,

que me han acompañado durante estos años, tanto para discutir resultados y proponer experimentos, como para animarme en los malos ratos y compartir los buenos. Y sobre todo, a Isabel, que ha llegado a ser algo más que una compañera de trabajo, y cuyo ánimo e "insistencia" han logrado que no me desanimara y pudiera terminar este trabajo. Gracias a todos por aguantarme.

A mi familia, sobre todo, a mi hijo Román porque, junto con mi esposo Román, forman el motor de mi vida, por su cariño y apoyo y porque creen en mí más que yo y consiguen que me esfuerce para llegar a ser como ellos me ven. Y por supuesto, a mis padres, Antonio y Emilia, por su ejemplo en la vida y por la confianza que han depositado siempre en nosotros. A Mina por su permanente ayuda. A mi hermana Rosa y a mi hermano Emilio porque les quiero y han sido siempre un ejemplo para mí y un modelo a seguir.

Pero a quienes más tengo que agradecer es a los pacientes y a sus familiares que se han mostrado siempre dispuestos a colaborar y a ayudar y son, en definitiva, por y para quienes se ha realizado este trabajo, del cual me siento completamente satisfecha, tan sólo por el hecho de haber podido contribuir, a que puedan disfrutar de una mejor calidad de vida gracias a un diagnóstico y tratamiento tempranos de su enfermedad.

A mi esposo y a mi hijo Román,
juntos formamos un gran equipo

Una búsqueda comienza siempre con la suerte del principiante y termina siempre con la prueba del conquistador.

El Alquímista. Paulo Coelho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: aminoácido

AcMo: anticuerpo monoclonal

AD: Autosómico Dominante

ADA: adenosindesaminasa

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo

ALX: Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

AR: Autosómico Recesivo

Arg: arginina

BCR: B Cell receptor , receptor para el antígeno de la célula B

BLNK: B-cell linker protein, también conocida como SLP65

BSA: Albúmina sérica bovina

BTK: Tirosín quinasa de Bruton

CAM: Complejo de ataque a la membrana

CD40L: ligando de CD40

CF: Citometría de flujo

CIV: comunicación interventricular

ConA: Concanavalina A

CPA: célula presentadora de antígeno

DAG: diacilglycerol

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido Etilendiaminotetraacético

EGC: enfermedad granulomatosa crónica

ELISA: enzimoimmunoensayo

ESID: Sociedad Europea de Inmunodeficiencias

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FMLP: péptido quimiotáctico N-formil-Met-Leu-Phe

FSC: Forward Scatter, dispersión frontal

Gly: glicina

IDP: Inmunodeficiencia Primaria

IDVC: Inmunodeficiencia variable común

Ig: Inmunoglobulina

IgIV: gammaglobulina intravenosa

IP3: Inositoltrifosfato

IO: ionomicina

ITAM: Motivo de activación basados en tirosina

IUIS: Unión Internacional de las Sociedades de Inmunología

kb: kilobase

LTc: linfocitos T citotóxicos

LTh: linfocitos T helper o colaboradores

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

min: minuto

MO: médula ósea

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PBMC: células mononucleadas de sangre periférica

PBS: tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PE: Ficoeritrina

PH: homólogo a plecstrina

PHA: fitohemaglutinina

PI3K: fosfoinositido 3- quinasa

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato

PKC: protein-kinasa C

PLC- γ 2: fosfolipasa C- γ 2

PMA: miristato acetato de forbol

pre-BCR: receptores de los linfocitos pre-B

PWM: mitógeno de la fitolaca o Mitógeno Pokeweed

RAG: gen activador de la recombinación (recombination activating gene)

REDIP: Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias

RFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

SH: homólogo a Src

Spa: proteína A de la pared celular de *Staphylococcus aureus*

Src: Rous sarcoma oncogene (oncogen del virus del sarcoma de Rous)

SSC: Side Scatter, dispersión lateral

Syk: Tirosín quinasa esplénica

T^a amb: Temperatura ambiente

TC: tomografía computerizada

TH: homólogo a Tec

TLR: "Toll-like receptor"

UTR: región no codificante del gen

WAS: síndrome de Wiskott Aldrich

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INMUNODEFICIENCIAS	3
1.1. Inmunodeficiencias Primarias	3
1.2. Inmunodeficiencias Primarias con Defectos Predominantemente de Anticuerpos	9
2. AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X (ALX). SÍNDROME DE BRUTON	12
2.1. Estadios madurativos de los linfocitos B	14
2.2. Bases moleculares del síndrome de Bruton	19
2.3. Transducción de señales por el complejo del receptor antigénico del linfocito B (BCR). Papel de la Btk	21
2.4. Distribución de mutaciones en el gen BTK en familias con ALX	23
2.5. Patología y clínica asociada al síndrome de Bruton	27
2.6. Estado de portadoras. Lionización	29
2.7. Tratamiento de la agammaglobulinemia ligada a X	30
2.8. Importancia del diagnóstico diferencial	31
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	35
HIPÓTESIS DE TRABAJO	37
OBJETIVOS	38
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. POBLACIÓN OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO	41
2. ESQUEMA DE ESTUDIO	41
3. MÉTODOS	42
3.1. Recopilación de datos clínicos e inmunológicos de los pacientes incluidos en el estudio	42
3.2. Criterios diagnósticos de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X	43
3.3. Marcadores fenotípicos de las distintas poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo	44

3.3.1. Marcadores celulares de superficie	46
3.4. Estudio de la funcionalidad linfocitaria	48
3.5. Análisis de expresión de Btk (tirosín quinasa de Bruton)	51
3.5.1. Detección de Btk mediante inmunofluorescencia indirecta (Futatani T et al. 1998)	52
3.5.2. Método modificado de Futatani et al. (1998) mediante inmunofluorescencia indirecta	54
3.5.3. Detección de Btk mediante inmunofluorescencia directa	54
3.6. Cuantificación de la actividad respiratoria oxidativa en granulocitos	55
3.6. Cuantificación de anticuerpos específicos	56
3.8. Cuantificación de inmunoglobulinas, subclases de IgG y de los diferentes componentes del complemento	56
3.9. Cuantificación de Isohemaglutininas	59
3.10. Métodos de estudio de la actividad del complemento	59
3.11. Estudios genéticos	60
3.11.1. Extracción de DNA	60
3.11.2. Extracción de RNA	61
3.11.3. Síntesis de cDNA	61
3.11.4. Análisis molecular del gen BTK	61
3.11.4.1. Diseño de los cebadores	62
3.11.4.2. Amplificación del gen BTK	64
3.11.4.3. Amplificación de cDNA de BTK	65
3.11.4.4. Visualización de los fragmentos amplificados	66
3.11.5. Secuenciación	67
3.11.5.1. Secuenciador automático ABI Prism 310(Perkin-Elmer)	67
3.11.5.2. Secuenciador automático CEQ 8000(Beckman-Coulter)	68
3.11.6. Análisis mediante PCR-RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)	69
3.11.6.1. Análisis mediante PCR-RFLP del exón 1 con la enzima de restricción Ddel	69
3.11.6.2. Análisis mediante PCR-RFLP del exón 18 con la enzima de restricción NlaIII	71

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
5. APÉNDICE	72
RESULTADOS	77
1. ESTUDIO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE BRUTON	78
1.1. FAMILIA A	79
1.1.1. Resumen del caso índice. Paciente A.1	79
1.1.2. Resultados. Paciente A.1	79
1.1.3. Estudio de Portadoras. Familia A	81
1.2. FAMILIA B	85
1.2.1. Resumen caso clínico. Paciente B.1	85
1.2.1.1. Resultados Paciente B.1	86
1.2.2. Resumen caso clínico. Paciente B.2	89
1.2.2.1. Resultados. Paciente B.2	89
1.2.3. Resumen caso clínico. Paciente B.3	91
1.2.3.1. Resultados. Paciente B.3	91
1.2.3.2. Estudio mediante PCR-RFLP	91
1.2.4. Estudio de portadoras	93
1.3. FAMILIA C	95
1.3.1. Resumen Caso clínico Paciente C.1	95
1.3.1.1. Resultados Paciente C.1	95
1.3.2. Estudio de portadoras	97
1.4. Familia D	99
1.4.1. Resumen Caso clínico Paciente D.1	99
1.4.1.1. Resultados Paciente D.1	99
1.5. Familia E	103
1.5.1. Resumen caso clínico Paciente E.1	103
1.5.1.1. Resultados Paciente E.1	103
1.6. Familia F	107
1.6.1. Resumen caso clínico Paciente F.1	107
1.6.1.1. Resultados Paciente F.1	108
1.6.1.2. Estudios empleando PCR-RFLP	110

1.6.2. Resumen casos clínicos Pacientes F.2 y F.3	111
1.6.2.1. Resultados Pacientes F.2 y F.3	111
1.6.2.2. Análisis mediante PCR-RFLP	114
1.6.3. Estudio de portadoras	115
2. ANÁLISIS DE LAS FORMAS DE PRESENTACIÓN CLINICA DEL SÍNDROME DE BRUTON. REVISIÓN DE LOS 10 CASOS ESTUDIADOS	117
3. PERFIL DE INFECCIONES Y SU RELACIÓN CON EL INICIO PRECOZ DEL TRATAMIENTO CON IgIV	118
4. INCIDENCIA Y PREVALENCIA DEL SÍNDROME DE BRUTON EN LA PROVINCIA DE SEVILLA	120
5. RESULTADOS DE LAS MODIFICACIONES INTRODUCIDAS EN EL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE Btk MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	121
DISCUSIÓN _____	125
RESUMEN	147
CONCLUSIONES _____	151
BIBLIOGRAFÍA _____	155
APÉNDICE _____	167

INTRODUCCIÓN

1. INMUNODEFICIENCIAS

Cualquier fallo en la integridad del sistema inmune puede dar lugar a un defecto en su capacidad para eliminar los agentes infecciosos que tratan de invadir el organismo. En los estados de inmunodeficiencia las células y/o factores moleculares que participan en la respuesta inmune fallan. Las inmunodeficiencias se pueden generar como consecuencia de una alteración genética que impide la expresión normal de algún componente del sistema inmune innato o adquirido (Inmunodeficiencias primarias), o debidas a cuadros tales como desnutrición, cáncer diseminado, tratamiento con agentes inmunosupresores o infección de las células del sistema inmunitario, sobre todo por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Inmunodeficiencias secundarias). La severidad del proceso va a depender del componente que se encuentre afectado (Fontán G 2001).

1.1. Inmunodeficiencias Primarias

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son defectos congénitos de alguno de los mecanismos de la respuesta inmunológica, que predisponen a padecer infecciones con mayor frecuencia, de mayor gravedad y, generalmente, más difíciles de curar (Español T et al. 2005). La mayoría son hereditarias y aunque, en general, se manifiestan desde edades tempranas, también se pueden poner de manifiesto por primera vez en la edad adulta (Paul ME et al. 2001, Casanova L et al. 2008). La presentación clínica de los síndromes de inmunodeficiencia primaria es muy variable, desde susceptibilidad para padecer determinadas infecciones hasta alergia, linfoproliferación o manifestaciones autoinmunes (Fischer A et al. 2004). La naturaleza de la infección en un paciente concreto dependerá en gran medida del componente del sistema inmunitario defectuoso (Tabla 1). Los defectos de la inmunidad humoral suelen asociarse a una mayor susceptibilidad a las infecciones causadas por bacterias piógenas, mientras que los de la inmunidad celular predisponen a las infecciones por virus y otros

microorganismos intracelulares. Por su parte, las inmunodeficiencias combinadas de inmunidad humoral y celular hacen que los pacientes sean susceptibles a padecer infecciones causadas por todo tipo de microorganismos (Paul ME et al. 2001).

Tabla 1. Clasificación de las IDP y sus manifestaciones clínicas, según el componente afectado (Fontán G 2001)

Subgrupo	Inicio	Causa de Infección	Otras características
Desórdenes de la inmunidad humoral (diferenciación de células B y producción de anticuerpos)	Después de los 6 meses de edad	-Bacterias encapsuladas -Hongos y parásitos -Virus	-Infecciones recurrentes -Problemas crónicos del tracto gastrointestinal -Autoinmunidad
Defectos en las células T o combinados (B y T)	Antes de los 6 meses de edad	Infecciones oportunistas	-Fallo de medro -Enfermedad injerto contra huésped -Diarrea
Defectos en la fagocitosis	Infancia	-Bacterias -Hongos y parásitos	-Infecciones graves por patógenos comunes -Formación de granulomas -Abscesos, infecciones de la piel
Defectos en el complemento	Cualquier edad	Infecciones por <i>Neisseria</i>	Enfermedades reumatoides, lupus, escleroderma

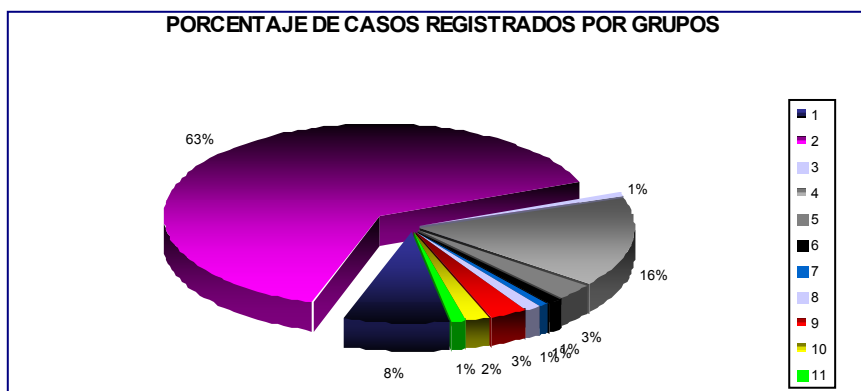
Los pacientes con inmunodeficiencia son también mas susceptibles a padecer determinados tipos de cánceres, sobre todo en las deficiencias de linfocitos T, debido a que estas células tienen una función importante en la vigilancia contra los virus oncogénicos y los tumores que producen.

Paradójicamente, algunas inmunodeficiencias se asocian, además a una mayor incidencia de trastornos autoinmunitarios. El mecanismo de esta asociación no se conoce, pero podría reflejar una deficiencia de los linfocitos T

reguladores que, en circunstancias normales, mantienen la autotolerancia (Abbas AK et al. 2006a).

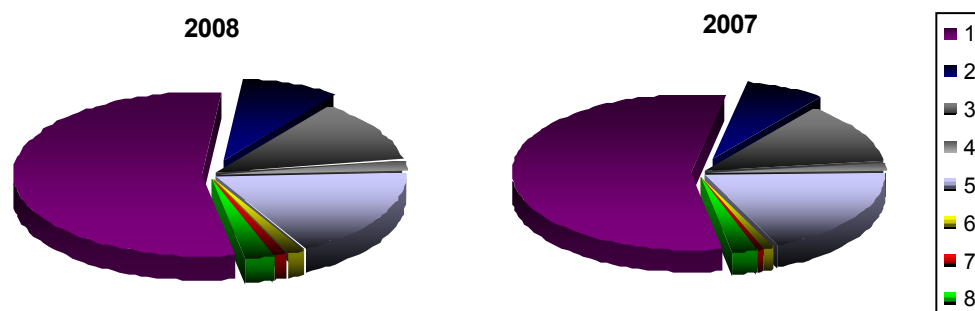
Las inmunodeficiencias pueden deberse tanto a defectos en la maduración o la activación de los linfocitos, como a alteraciones de los mecanismos efectores de la inmunidad. Los síndromes de inmunodeficiencia primaria constituyen un desafío para clínicos e investigadores, ya que existen más de 200 descritos que dan lugar a defectos en distintos puntos de la respuesta inmune (Casanova L et al. 2008, Guzmán D 2007, Samarghiteau C et al. 2007). Por otra parte, las IDPs sirven de modelos naturales para profundizar en el conocimiento de la función de los distintos componentes del sistema inmunitario (Good RA 1991). Los avances tecnológicos de los últimos años han permitido el desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de estas enfermedades, que facilitan un diagnóstico más rápido, además de haber contribuido a la descripción de nuevos síndromes de inmunodeficiencia primaria (Marodi L et al. 2007).

En los últimos 15 años se han identificado las bases genéticas de más de 100 IDPs, las cuales, en muchos casos, han conducido a la identificación de nuevos genes cruciales en el desarrollo de la inmunidad celular, la función efectora, o que contribuyen a mecanismos homeostáticos que protegen frente a las enfermedades autoinmunes (Notarangelo L et al. 2006, Chinen J et al. 2005). Hasta junio de 2008 se habían incluido en el Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias (REDIP) 6.876 casos de IDPs (Fig. 1). La mayoría de los casos registrados, tanto en el REDIP (65%), como en el registro de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias, ESID (Fig. 2), (54,3%), corresponden a deficiencias de anticuerpos, siguiendo la distribución por grandes grupos diagnósticos, según las distintas clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de las Sociedades de Inmunología (IUIS) (Milà Llambí J et al. 2007) descritas en la tabla 2.



- 1 Inmunodeficiencias combinadas (T y B)
- 2 Deficiencias predominantemente de anticuerpos
- 3 Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos
- 4 Deficiencias del sistema del complemento
- 5 Defectos congénitos de número, función o ambos, del sistema fagocitario
- 6 Otras inmunodeficiencias primarias
- 7 Defectos en la inmunidad innata
- 8 Inmunodeficiencias asociadas a otros trastornos congénitos o hereditarios
- 9 Trastornos autoinflamatorios
- 10 Enfermedades con disregulación inmunológica
- 11 Inmunodeficiencias primarias sin catalogar

Fig. 1. Porcentaje de casos de IDP registrados por grupos en el Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias (REDIP). <http://web.hsd.es/redip/>



Diagnosis:	2008 :		2007 :	
	%	n	%	n
1 Predominantly antibody Disorders	54,36	3738	55,93	3084
2 Predominantly T-cell Deficiencies	8,35	574	7,22	398
3 Phagocytic Disorders	12,57	864	12,64	697
4 Complement Deficiencies	2,07	142	1,65	91
5 Other well defined PIDs	17,68	1216	18,77	1035
6 Autoimmune & immunedysregulation syndromes	1,31	90	0,96	53
7 Autoinflammatory Disorders	1,06	73	0,73	40
8 Unclassified PIDs	2,60	179	2,09	115
Total number of patients:	100	6876	100	5514

Fig. 2. Principales grupos de inmunodeficiencias primarias según el registro de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias. Datos obtenidos de la página web: <http://www.esid.org>

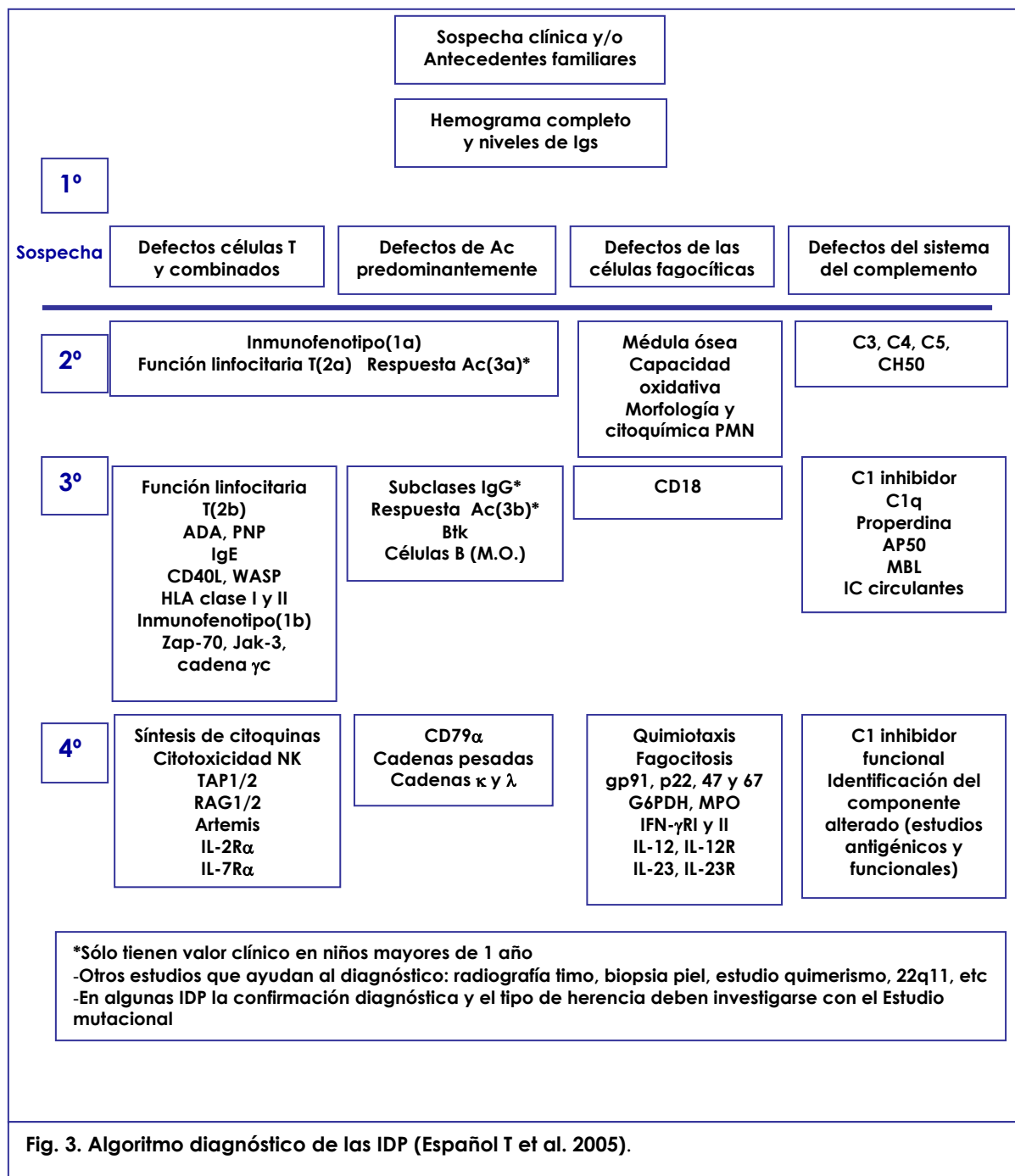
Tabla 2. Clasificación propuesta por el Grupo Científico de la International Union of Immunology Societies (IUIS) (Geha RS et al., 2007)	
CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES DE INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA	
1.	Inmunodeficiencias combinadas (T y B)
2.	Deficiencias predominantemente de anticuerpos
3.	Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos
4.	Deficiencias del sistema del complemento
5.	Defectos congénitos de número, función o ambos, del sistema fagocitario
6.	Defectos en la inmunidad innata
7.	Trastornos autoinflamatorios
8.	Enfermedades con disregulación inmunológica

El diagnóstico de las IDPs se ve dificultado y retrasado por la difundida creencia de su rareza, totalmente injustificada con los datos mostrados. El retraso en su diagnóstico puede llegar a ser de varios años, lo que condiciona una peor evolución clínica de los pacientes. Por ello, es importante insistir en la divulgación del conocimiento de sus formas de presentación clínica y su diagnóstico diferencial (tablas 1 y 3). En un trabajo realizado por Español et al, en 2005 se recogen los datos sobre los centros hospitalarios en los que se realizan estudios inmunológicos, moleculares y genéticos de la mayoría de las IDP en nuestro país y se elabora un directorio de pruebas diagnósticas de las inmunodeficiencias en España. En la actualidad, se pueden realizar en nuestro país los diagnósticos inmunológicos y la mayoría de los estudios genéticos de las IDPs descritas hasta ahora. Sin embargo, en primer lugar se debe tener la sospecha de que se trate de una de estas enfermedades y, en segundo lugar, hay que orientar el estudio. No resulta razonable que puedan realizarse todos los estudios en todos los pacientes con sospecha de IDP, por lo que es importante conocer las manifestaciones características de las distintas formas de IDP (tabla 1) y seguir un algoritmo de estudio desde las determinaciones mas frecuentes a los estudios genéticos específicos (Fig. 3).

Tabla 3. Patrones clínicos de los síndromes de IDP y su diagnóstico diferencial (Tomada de Español T et al. 2005) .

Causas	Diagnóstico diferencial
Infecciones recurrentes ORL y de las vías respiratorias bajas Déficits de anticuerpos Déficits del complemento	Síndrome de la guardería Fibrosis quística Discinesia ciliar Asma/alergia Hipertrfia adenoidea-amigdalar
Retraso pondoestatural /diarrea intratable / infección oportunista ID combinada grave	Malabsorción Enfermedad crónica intestinal Quimioterapia TMO/TPH Inmunosupresión ID secundaria (VIH, CMV, rubéola congénita)
Infecciones superficiales o sistémicas por gérmenes piógenos/hongos Deficiencias de la fagocitosis Candidiasis mucocutánea crónica Síndrome de hiper-IgE	Problemas locales Diseminación hematógena Eccema
Infecciones recurrentes por neisserias /micobacterias atípicas y/o virus Déficit del complemento (especialmente factores C5 a C9) Defectos del eje IFN- γ /IL-12/IL-23	Problemas locales Contactos familiares
Alteraciones clínicas asociadas Ataxia y telangiectasias (ataxia-telangiectasia) Cardiopatía, fenotipo especial, hipocalcemia (síndrome de DiGeorge) Eccema, trombopenia (síndrome de Wiskott-Aldrich) Caída tardía del cordón umbilical (defectos moléculas de adhesión) Procesos autoinmunes (IDCV)	

Los estudios analíticos básicos se pueden realizar en la mayoría de centros hospitalarios, los estudios inmunológicos requieren un laboratorio de Inmunología y los estudios genéticos, como algunas de las IDP son poco frecuentes, se centralizan en unos pocos hospitales.



1.2. Inmunodeficiencias Primarias con Defectos Predominantemente de Anticuerpos.

Este grupo de IDPs está caracterizado por una alteración de la capacidad del sistema inmune de un individuo para producir anticuerpos. La anomalía primaria puede afectar a distintos estadios de la maduración de los

linfocitos B, así como a las respuestas de los linfocitos maduros a la estimulación antigénica (Schroeder HW Jr et al. 2001).

El diagnóstico de los defectos predominantemente de anticuerpos está basado en el hallazgo de concentraciones de inmunoglobulinas séricas disminuidas, una escasa respuesta de anticuerpos frente a vacunaciones y, en algunos casos, una disminución del número de linfocitos B en la circulación o en los tejidos linfáticos. Forman un grupo heterogéneo de defectos inmunológicos clínicamente definidos por una mayor susceptibilidad a infecciones recurrentes, en su mayoría piógenas (Abbas AK et al. 2006b).

Aunque las manifestaciones clínicas suelen ser similares entre sí, algunos de ellos presentan particularidades propias. Los defectos moleculares y celulares de estos síndromes son también muy heterogéneos, pudiendo afectar a distintos elementos, células, mediadores, receptores, etc, que intervienen en la respuesta inmune humoral (Tabla 4).

Las manifestaciones clínicas, al igual que en el resto de las inmunodeficiencias, se suelen iniciar en etapas tempranas de la vida. Sin embargo, en algunos casos, aunque el defecto genético está presente desde el nacimiento, no se pone de manifiesto hasta la edad adulta, como ocurre en la inmunodeficiencia variable común (IDVC), el déficit de IgA o la deficiencia de subclases de IgG. Si el defecto en la proteína afectada es parcial, como ocurre en algunos casos de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), puede existir un fenotipo mas leve de la enfermedad y los síntomas pueden iniciarse en etapas mas tardías (Notarangelo L et al. 2004). Algunos pacientes diagnosticados inicialmente de un tipo de inmunodeficiencia primaria pueden evolucionar a otra. Esto ha sido descrito en algunos casos de pacientes con déficit de IgA, que posteriormente han evolucionado a IDVC (Vorechovsky I et al. 1995, Castigli E et al. 2006).

Conocer el patrón de herencia del defecto genético subyacente es fundamental, no sólo para el diagnóstico del caso índice, sino también para la detección y tratamiento precoz de nuevos casos en la misma familia, así como para la identificación de portadoras en las formas ligadas al cromosoma X, lo que conlleva la posibilidad de ofrecer consejo genético (Kanegane H et al. 2001).

Tabla 4. IDP con defectos predominantemente de anticuerpos. International Union of Immunology Societies (IUIS). LX: Ligada a X. AD: Autosómica dominante. AR: Autosómica recesiva. N: No conocida. V: Variable (Geha RS et al. 2007)

ENFERMEDAD	HERENCIA	DEFECTO GENÉTICO
1. Reducción importante de todos los isotipos de Igs séricas con ausencia de células B		
a. Deficiencia de BTK	LX	Mutaciones Btk
b. Deficiencia de la cadena pesada μ	AR	Mutaciones cadena pesada μ
c. Deficiencia $\lambda 5$	AR	Mutaciones lambda 5
d. Deficiencia Iga	AR	Mutaciones Iga
e. Deficiencia Ig β	AR	Mutaciones Ig β
f. Deficiencia BLNK	AR	Mutaciones BLNK
g. Inmunodeficiencia con timoma	N	Desconocido
h. Mielodisplasia	V	Monosomía de 7, trisomía de 8, disqueratosis congénita
2. Reducción severa en al menos dos isotipos de Igs con número de células B normal o bajo		
a. Síndrome de IDCIV	V	Desconocido
b. Deficiencia de TACI (CD 267)	AD o AR	Mutaciones TACI
c. Deficiencia del receptor de BAFF (CD 268)	AR	Mutaciones BAFFR
d. Deficiencia de ICOSL	AR	Mutaciones ICOSL
e. Deficiencia de CD19	AR	Mutaciones CD19
f. Síndrome Linfoproliferativo ligado a X (XLP1)	LX	Mutaciones SH2D1A
3. Reducción severa de IgG e IgA sérica con incremento de IgM y número normal de células B		
a. Síndrome de hiper-IgM. Déficit de CD40	AR	Mutaciones en CD40
b. Síndrome de hiper-IgM Ligado a X. Déficit de CD40L	LX	Mutaciones en CD40L (CD154)
c. Deficiencia de AID	AR	Mutación AICDA
d. Deficiencia de UNG	AR	Mutación UNG
4. Deficiencias en cadenas ligeras o isotipo con número normal de células B		
a. Deficiencias en el gen de la cadena pesada de Igs	AR	Delección cromosoma 14q32
b. Deficiencia en cadena k	AR	Mutación gen constante k
c. Deficiencia de subclases de IgG aislada	V	Desconocido
d. Deficiencia de IgA y subclases de IgG	V	Desconocido
e. Deficiencia selectiva de IgA	V	Mutación desconocida y en pocos casos TACI
5. Deficiencia de anticuerpos específicos con concentraciones de Igs y número de células B normales	V	Desconocido
6. Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia	V	Desconocido

2. AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA A X. SÍNDROME DE BRUTON

Agammaglobulinemia, by Col. Ogden C. Bruton, MC, USA, *Pediatrics*, 1952;9:722–728

A hitherto unrecognized entity manifested by complete absence of gamma globulin with otherwise normal serum proteins and recurrent pneumococcal sepsis is described in an 8-year-old male. The patient appeared to be normal in other respects and, after extensive study, no structural or functional change could be demonstrated in any body system. He was unable to produce antibody to the pneumococcus with the four antigenic substances used; a positive Schick test persisted despite numerous attempts to reverse it with diphtheria toxoid. No antibody could be demonstrated following administration of typhoid vaccine in the usual manner, and his serum was negative for complement-fixing antibodies of epidemic parotitis after he experienced a typical clinical picture of that disease. Gamma globulin could be demonstrated in his serum after concentrated immune human serum globulin was administered subcutaneously, and its gradual disappearance could be followed by electrophoretic analysis over a period of approximately six weeks. Concurrently, and following administration of human gamma globulin (3.2 gm. gamma globulin) at monthly intervals, he had been free of pneumococcal sepsis for more than a year, whereas he had experienced clinical sepsis at least 19 times in the previous four years. Eight different types of pneumococci had been recovered from blood cultures during 10 different episodes of sepsis. In the Discussion, [the author] concluded that there was a cause-and-effect relationship between the absence of gamma globulin and the repeated infections, based on the child's dramatic improvement after beginning gamma globulin therapy. [The author] proposed two possible causes—congenital or acquired. While [he] felt that the patient's good health for the first 4.5 years of life argued against a congenital cause, the persistence of the defect supported it.

Fig. 4. Resumen de la publicación del primer caso de Síndrome de Bruton. Con los actuales conocimientos es muy probable que este primer caso fuera ahora considerado como una forma atípica y benigna.

En 1952, (Fig. 4) Bruton describió el caso de un niño de 8 años que hasta los 4 años y medio había sido considerado normal por sus padres, quienes sólo recordaban una neumonía postrubéola. El niño ingresó por primera vez en el hospital a causa de una artritis de rodilla, diagnosticada de fiebre reumática, pero con aspecto séptico, que cedió bien con penicilina y fue finalmente considerada como una osteomielitis. A las dos semanas volvió a ingresar por una grave gastroenteritis con fiebre elevada, apareciendo una otitis aguda y aislándose el mismo tipo de neumococo en sangre y faringe. Los ingresos e infecciones neumocócicas se reiteraron a lo largo de más de 3 años. En un momento determinado, se le administró una vacuna con neumococos, pero no hubo respuesta de anticuerpos específicos, surgiendo la duda de si formaría anticuerpos contra otros microorganismos. La ausencia de anticuerpos antitifoideos y la permanente positividad de la prueba de Schick

empezó a sugerir a Bruton la existencia de un fallo global en la síntesis de anticuerpos. Mediante electroforesis, Bruton descubrió la ausencia de gammaglobulina y, en base a ello, le dio el nombre de "agammaglobulinemia" a la enfermedad de su paciente (Bruton OC, 1968). Otros científicos se encargarían posteriormente de asociar su nombre para distinguirla de otros defectos predominantemente de anticuerpos (Blanco Quirós E et al. 2002).

Bruton era coronel de las fuerzas armadas y así lo hace constar en su histórico artículo. En una entrevista que le hace RA Good, relata las dificultades que tuvo que vencer para que el Hospital Militar adquiriera un aparato de electroforesis, algo que a principios de los años 50 se estaba introduciendo y que era decisivo para su investigación clínica. Dos avances médicos: el desarrollo de la técnica para la electroforesis de proteínas, junto con la identificación de la fracción globulina como la fracción que contiene los anticuerpos al final de los años 30, además del empleo de antibióticos en los años 40 y la aplicación de los primeros preparados de gammaglobulina intramuscular con los que se trató a este paciente, permitieron el descubrimiento de esta enfermedad (Stiehm ER et al. 1992, Blanco-Quirós E et al. 2002).

Aunque en algunos trabajos científicos se ha cuestionado que el primer paciente descrito por Bruton fuera realmente un caso típico de la enfermedad, la importancia de este primer trabajo radica en que inspiró la investigación del déficit de anticuerpos en pacientes con sospecha de padecerla (Sideras P et al. 1995). Como resultado de esta búsqueda, a lo largo de muchos años se han diagnosticado, no sólo pacientes con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), sino también otras formas de deficiencia de Igs (Good RA et al. 1962). El reconocimiento de diferentes formas de deficiencias de anticuerpos ha sido un proceso gradual, y no fue hasta principios de la década de los años 70 cuando se aceptó la primera clasificación (Cooper MD et al. 1973). Gracias a las nuevas herramientas disponibles para el estudio de estas enfermedades, la clasificación de los síndromes de IDP es un proceso dinámico que se revisa constantemente; la clasificación más reciente se refleja en la tabla 2 (Geha RS et al. 2007).

Al principio de los años 70, muy poco después de que las células B fueran descritas como linfocitos que expresaban Igs endógenas en la superficie celular, se observó que los pacientes con Síndrome de Bruton no tenían células B circulantes. Sin embargo, en estudios posteriores se pudo observar que en la médula ósea de los pacientes sí que había precursores de células B, pero éstos no se diferenciaban normalmente. Este hecho indicaba que las células progenitoras hematopoyéticas de pacientes afectados podían iniciar el linaje B pero no progresar eficientemente (Nomura K et al. 2000).

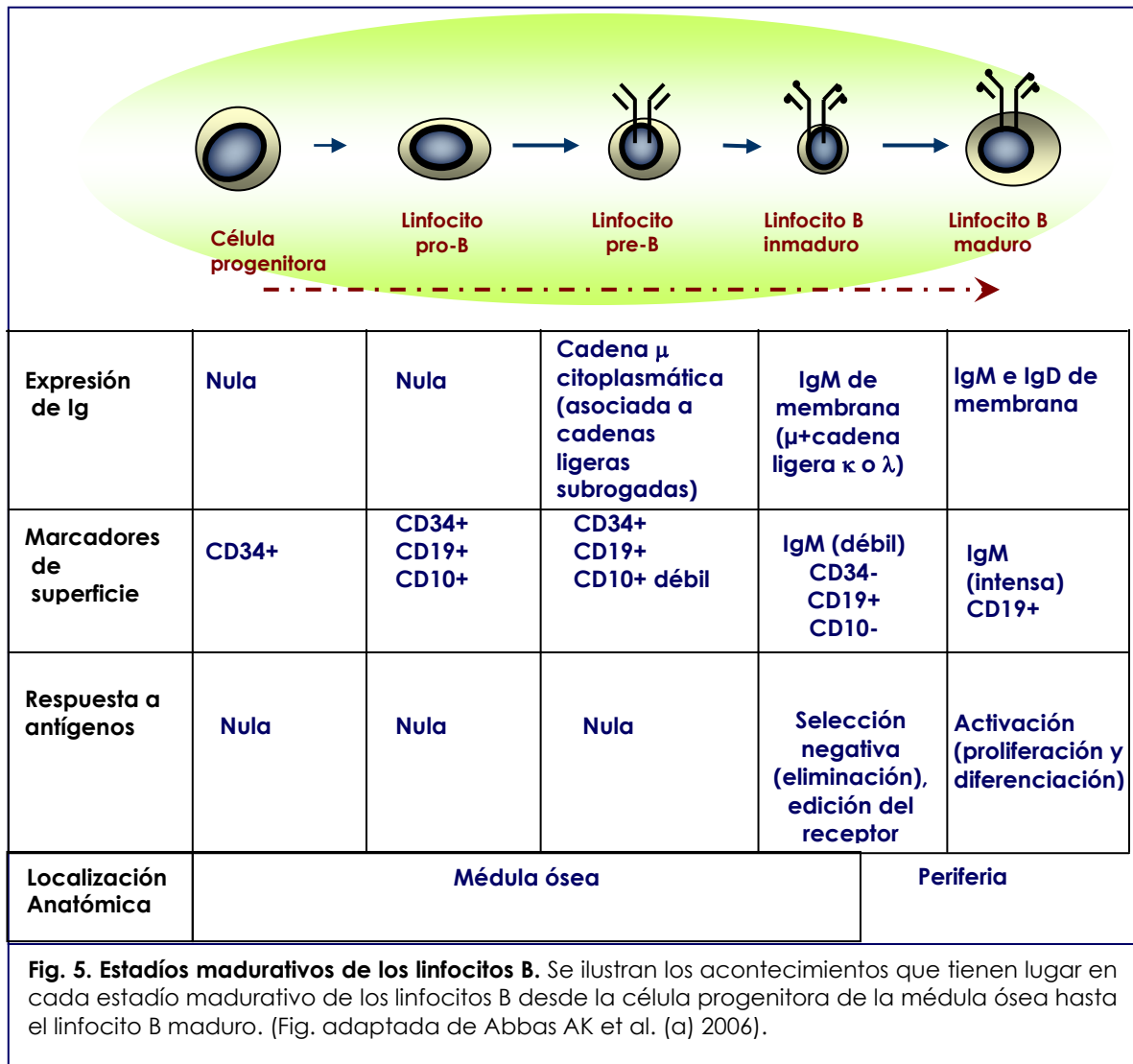
2.1. Estadios madurativos de los linfocitos B

Los acontecimientos principales en la maduración de los linfocitos B son el reordenamiento y la expresión de los genes de Ig en un orden preciso, la proliferación de linfocitos inmaduros y la selección del repertorio maduro. Durante este proceso, los progenitores de los linfocitos B se convierten en linfocitos B maduros que expresan en su membrana moléculas de IgM + IgD y que, posteriormente, abandonan la médula ósea (MO) para poblar los tejidos linfáticos periféricos. Allí emplearán sus Ig de membrana para reconocer y responder a los antígenos extraños. Se estima que, en los seres humanos, el desarrollo de un linfocito B maduro a partir de un progenitor linfocítico dura entre 2 y 3 días.

A lo largo de su maduración en la MO, las células de la estirpe linfoide B atraviesan una serie de etapas caracterizadas por un patrón específico de expresión de genes de Igs y de otras moléculas de superficie que van apareciendo a lo largo de su evolución hacia célula plasmática productora de anticuerpos. Cada una de estas proteínas tiene su papel en la diferenciación del linfocito B. Estas moléculas de superficie, a su vez, sirven como marcadores fenotípicos para identificar los estadios madurativos de las células B (Fig. 5).

La célula más precoz ya diferenciada hacia la estirpe B de la médula ósea es el linfocito **pro-B**. Los linfocitos **pro-B** no producen Igs, pero pueden distinguirse de las otras células inmaduras por la expresión de moléculas de superficie propias de la estirpe B, tales como CD19 y CD10. CD19 aparece de

forma temprana durante el proceso de maduración de la célula B en la médula ósea y permanece en la célula hasta su diferenciación a célula plasmática (Menno C et al. 2006). Las proteínas codificadas por los genes RAG (gen activador de la recombinación) se expresan por primera vez en este estadio, produciéndose la primera recombinación de los genes Ig en el locus de la cadena pesada.



El linfocito **pre-B** representa el siguiente estadio madurativo y es el primer tipo celular que sintetiza un producto de los genes de Ig detectable, que es la cadena pesada citoplasmática μ . Los linfocitos **pre-B** sólo se encuentran en los tejidos hematopoyéticos y no expresan receptores antigénicos en su superficie, dado que la expresión de moléculas completas de Ig requiere la síntesis de

cadena tanto pesadas como ligeras, que no es aún posible en este estadio. Por consiguiente, estas células no pueden ni reconocer ni responder a los antígenos. Las cadenas pesadas μ de los linfocitos pre-B se asocian a un grupo de proteínas denominadas **cadenas ligeras subrogadas** que son estructuralmente homólogas a las cadenas ligeras κ y λ , pero invariables, es decir, son idénticas en todos los linfocitos B. Los complejos formados por las cadenas μ y las cadenas ligeras subrogadas, denominados **receptores de los linfocitos pre-B (pre-BCR)**, comienzan a expresarse en poca cantidad en la superficie celular. A su vez, el **pre-BCR** se asocia a otras proteínas, conocidas como $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, que actúan en la transducción de señales del receptor y que también se asocian a las moléculas de Ig de membrana en los linfocitos B maduros (Fig. 6). Los **pre-BCR** estimulan la proliferación y maduración de los linfocitos B en desarrollo, por lo que la expresión de estos receptores es esencial para que estas células completen con éxito su maduración.

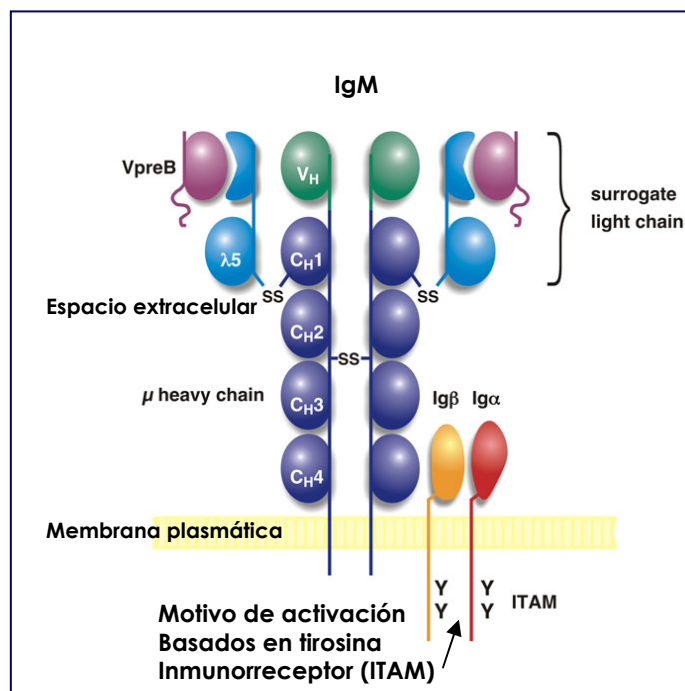


Fig. 6. Complejo del receptor antigénico de los linfocitos PreB (Pre-BCR). Las cadenas pesadas μ se asocian a las cadenas ligeras subrogadas que son, estructuralmente, homólogas a las cadenas κ y λ . El pre-BCR se asocia a moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ invariables, que contienen ITAM en sus extremos citoplasmáticos que intervienen en sus funciones de señalización. Adaptado de: http://www.biologie.uni-erlangen.de/genetik/resact_winkler-Dateien

En el siguiente estadio madurativo, los linfocitos B en desarrollo reordenan sus genes de las cadenas ligeras κ o λ , que comienzan a sintetizarse y se asocian a la cadena μ sintetizada previamente para formar una molécula completa de IgM. Los linfocitos B que expresan IgM en la superficie celular se conocen como **linfocitos B inmaduros**. Estos linfocitos B inmaduros no proliferan ni se diferencian en respuesta a los antígenos; de hecho, su encuentro con los mismos, así como con los antígenos propios presentes en la médula ósea, puede llevarles a la muerte celular por apoptosis o a una insensibilidad funcional en lugar de a su activación. Esta propiedad es importante para la selección negativa de los linfocitos B que son específicos para antígenos propios, presentes en la médula ósea. Posteriormente, los linfocitos B inmaduros abandonan la médula ósea y completan su maduración en los tejidos linfáticos periféricos.

El siguiente estadio madurativo es el de **linfocito B maduro**. En esta fase los linfocitos B expresan las cadenas pesadas μ y δ en asociación con una cadena ligera κ o λ y, por tanto, coexpresan en su superficie IgM e IgD. Ambos tipos de Igs de membrana tienen la misma región variable y, en consecuencia, la misma especificidad antigénica. La coexpresión de IgD e IgM se acompaña de la adquisición de la competencia funcional. Por esta razón, estas células se conocen como **linfocitos B maduros vírgenes**. Estas células B ya son capaces de responder a un antígeno y, a menos que la célula encuentre a su antígeno, muere en pocos días o semanas. Los linfocitos B maduros se encuentran en la circulación y los tejidos linfoides periféricos. De hecho, la mayoría de los linfocitos B presentes en la sangre o los tejidos linfáticos de los individuos normales son IgD⁺ IgM⁺ (Abbas AK et al. (b) 2006).

Este proceso de diferenciación desde células hematopoyéticas en médula ósea hasta **células plasmáticas secretoras de anticuerpos** es complejo y se halla altamente regulado. La proliferación y diferenciación ocurre en respuesta a numerosas señales procedentes de la propia médula, citoquinas, interacción con antígenos, así como con linfocitos T.

La activación de los linfocitos B maduros se inicia por el reconocimiento específico del antígeno por los receptores de Ig presentes en la superficie celular. Los antígenos y otros estímulos inducen la proliferación y diferenciación

del clon específico de linfocitos B. La progenie de ese clon puede sintetizar IgM u otros isotipos de Ig (IgG), someterse a un proceso de maduración de la afinidad o persistir como células de memoria. La unión del antígeno a las Ig de membrana (BCR) favorece la expresión de moléculas coestimuladoras que aumentan la capacidad de los linfocitos B para activar a los linfocitos T colaboradores (LTh). Los cuales expresan, a su vez, en su superficie una de estas moléculas, denominada ligando de CD40 (CD40L o CD154) que se une a CD40, presente en la superficie de los linfocitos B que están presentando el antígeno. Esta interacción estimula la proliferación de los linfocitos B.

Parte de los linfocitos B que han proliferado se diferencian en células efectoras que secretan anticuerpos de forma activa. A través de señales mediadas por CD40, así como por distintas citoquinas, se activan factores de transcripción que amplifican la transcripción de los genes de las Igs y, por tanto, la producción de anticuerpos. Muchos de los linfocitos B secretores de anticuerpos, localizados en las zonas extrafoliculares de los órganos linfáticos, se convierten en **células plasmáticas**, que son unos linfocitos B morfológicamente distintos encargados de producir grandes cantidades de anticuerpos. Estas células también migran hacia la MO de forma que 2 ó 3 semanas después del encuentro con el antígeno, la MO se convierte en un lugar importante de la síntesis de anticuerpos.

En 1985, Conley observó que casi todos los pacientes con Síndrome de Bruton tenían ausencia o un número muy reducido de células B con un fenotipo inmaduro. Este hallazgo fue interpretado como indicativo de que los precursores de las células B que habían conseguido pasar a través de los primeros estadios de la diferenciación del linfocito B, eran bloqueados en estadios posteriores, sugiriendo que el defecto genético responsable de la enfermedad debía estar localizado en un gen necesario en algún o algunos estadios de la diferenciación del linfocito B. En 1990, en un trabajo realizado por Campana et al. se demostraba que las células pro-B CD19+ estaban presentes en número normal en la MO de los pacientes, pero había un severo descenso en el siguiente estadio de diferenciación, la célula pre-B, de lo que se dedujo que éste era el punto más temprano del desarrollo del linfocito B donde se requería la actuación del gen candidato. La severidad de este

bloqueo es variable, ya que algunos pacientes tienen células pre-B, aunque su actividad proliferativa está alterada (Pearl et al. 1978, Campana et al. 1990).

2.2 Bases moleculares del síndrome de Bruton

El defecto responsable fue descrito por primera vez por dos grupos independientes en 1993 y consiste en una serie de mutaciones que afectan a un gen que codificaba una tirosina-quinasa que recibió el nombre de tirosín-quinasa de Bruton o Btk (Tsukada S et al. 1993, Vetrie D et al. 1993).

Btk es una proteína que interviene en la transmisión de señales procedentes del pre-BCR que son necesarias para que la célula continúe su proceso de maduración (Abbas AK et al. 2006a). Btk se expresa en todas las células hematopoyéticas, con la excepción de células T y células plasmáticas. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que Btk es esencial para la supervivencia de las células B, la progresión del ciclo celular y la proliferación de las células B en respuesta a estímulos antigénicos (Conley ME et al. 2005).

El gen que la codifica se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma X, lo que le confiere un patrón de herencia ligado al sexo, y tiene un tamaño de 37.5 kilobases (kb) distribuidas en 19 exones, con una región que no se traduce (UTR) en el extremo 5' del exón 1 y parte del exón 2 (Rohrer J et al. 1994).

Btk pertenece a la familia de las tirosín-quinasas. Está compuesta por 659 aminoácidos (aa) y tiene una estructura modular compuesta por 5 dominios: la región amino terminal compuesta por un dominio PH (140 aa), homólogo a la plecstrina; un segundo dominio llamado TH (80 aa), por ser homólogo a Tec (tirosín-quinasa citoplasmática), en el que existe una región rica en prolina; el dominio SH3 (65 aa) que tiene un lugar de fosforilación en posición 223 y es homólogo a Src (Rous sarcoma oncogene); un dominio SH2 (100 aa) y un dominio carboxiterminal SH1 (280 aa), o dominio quinasa donde reside la actividad catalítica y con otro lugar de fosforilación en la posición 551. Los otros dominios son necesarios para interacciones con otras proteínas (Fig. 7).

El tamaño de los exones varía desde 55 a 560 pares de bases (pb), y el de los intrones desde 164 pb a 9 kb. La Btk de humano, ratón y rata son

proteínas altamente conservadas (98-99%) (Lindwall JM et al. 2005), con una organización genómica bastante similar.

La región promotora del gen BTK fue inicialmente inferida de la secuencia 5' del sitio de inicio del gen. Los análisis funcionales de esta región han identificado sitios críticos de unión para miembros de dos familias de factores de transcripción: PU.1 en la posición -61, Sp1 en la posición -169 y Sp3 en la posición -38, respectivamente y que actúan de forma sinérgica para activar al promotor de BTK. Además, se han identificado otros dos elementos reguladores en las primeras 500pb del intrón 1. Estudios *in vitro* han revelado que alteraciones en la secuencia del promotor y en regiones reguladoras del intrón 1, se corresponden con una reducción de la transcripción de BTK, sin que la secuencia codificante se encuentre afectada. (Himmelman et al. 1996, Müller S et al. 1996, Rohrer J et al. 1998).

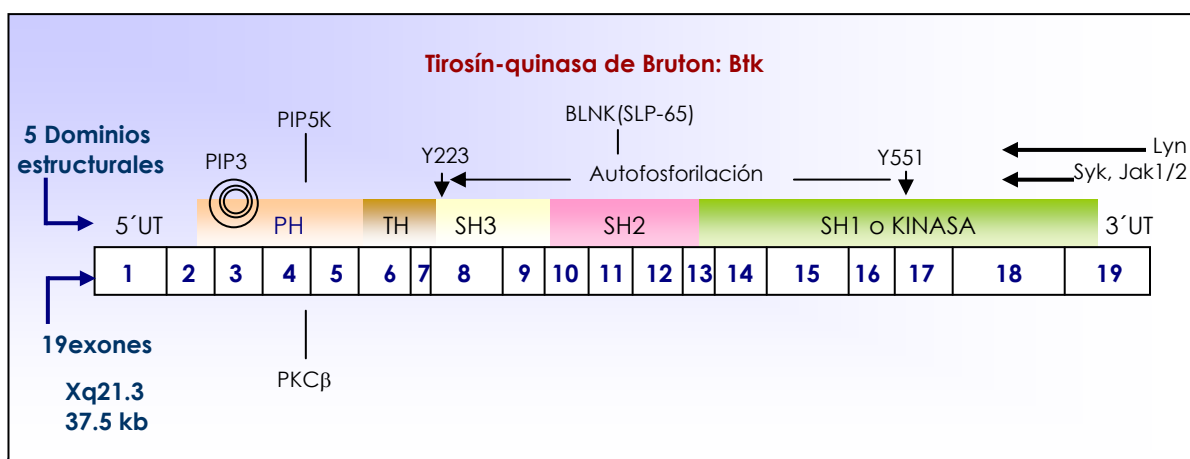
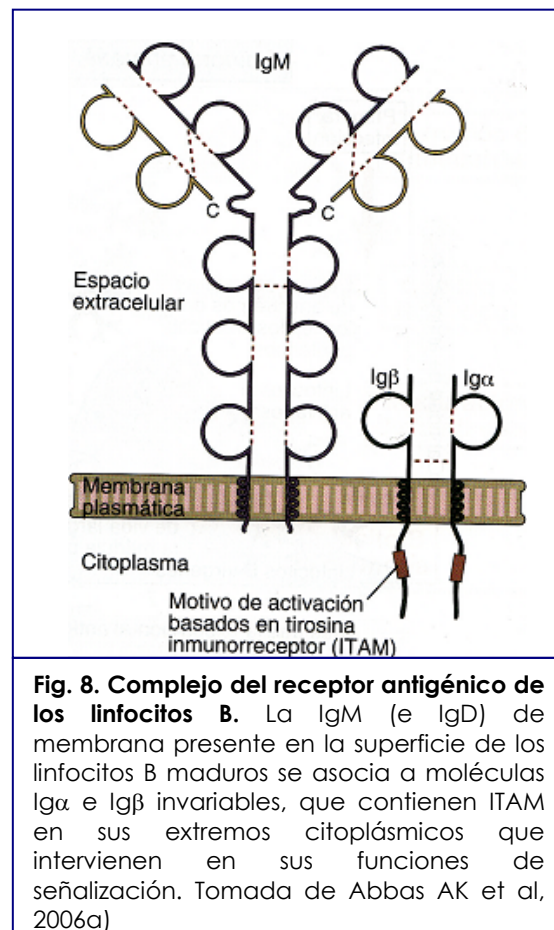


Fig. 7. Representación esquemática de la estructura genómica de BTK y su localización cromosómica. El primer exón y 30 pb del segundo constituyen la región no codificante del mismo. La proteína consta de 659 aa distribuidos en 5 dominios. Su estructura multimodular le permite interactuar con múltiples proteínas. Desde el punto de vista funcional consta de los siguientes dominios: el dominio PH ("pleckstrin homology") en la región N-terminal, seguido por el dominio TH ("Tec homology") rico en prolina; el dominio SH3 ("Src homology 3") que media la unión a proteínas con motivos ricos en prolina; el dominio SH2 ("Src homology 2") que permite la interacción con motivos de tirosina fosforilada, y una región C-terminal catalítica o dominio SH1 que posee función kinasa. Y223 e Y551 son residuos de tirosina cuya fosforilación regula la actividad de Btk. Los principales factores implicados en la regulación de la actividad kinasa se indican en sus respectivos sitios de interacción y se describen en el texto más adelante (Rohrer J et al. 1994, Moreau T et al. 2007).

2.3. Transducción de señales por el complejo del receptor antigénico del linfocito B (BCR). Papel de la Btk.

Aunque en la última década se ha avanzado mucho en el conocimiento acerca de los eventos relacionados con la señalización del BCR, el papel preciso de Btk en esta vía no es aún completamente conocido. Se sabe que la expresión de Btk es un evento crítico en varios pasos clave de la ontogenia del linaje B, que van desde la proliferación, desarrollo, diferenciación, supervivencia hasta la apoptosis (Lindwall JM et al. 2005).

El BCR (Fig. 8) emite señales de activación a los propios linfocitos B cuando se yuxtaponen o entrecruzan dos o más moléculas de receptor por antígenos multivalentes. Las moléculas de IgM e IgD de membrana, los receptores antigénicos de los linfocitos B vírgenes (BCR), tienen unas colas citoplasmáticas cortas formadas por 3 aa (lisina, valina y lisina). Estas colas son demasiado pequeñas para transducir las señales generadas por el agrupamiento de las Ig de la superficie celular.

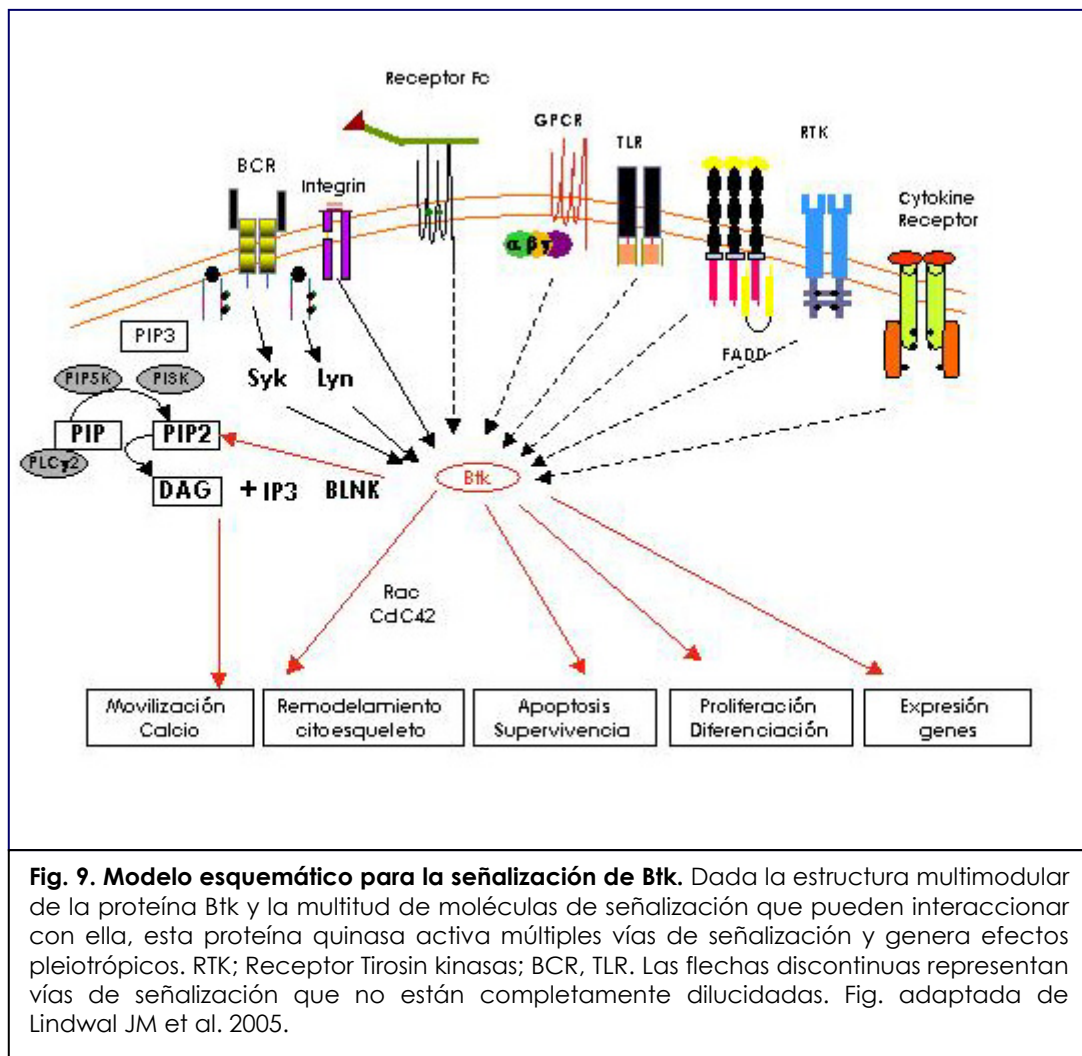


En realidad, las señales mediadas por Igs se transducen gracias a otras dos moléculas, denominadas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, que están unidas entre sí por puentes disulfuro, y que se expresan asociadas a las Ig de membrana mediante enlaces no covalentes. Las moléculas de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ también son necesarias para la expresión de las moléculas de Ig en la superficie y junto con ellas forman el **complejo del receptor del linfocito B (BCR)**. Los dominios citoplasmáticos de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ contienen motivos basados en tirosina (motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina o **ITAM**), que son necesarios para la transducción de señales. El entrecruzamiento de las Igs de membrana provoca el agrupamiento de las moléculas de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ y la fosforilación de los residuos de tirosina de los ITAM presentes en los extremos citoplasmáticos de las mismas, provocada por miembros de la familia Src-quinasas, creando un sitio de anclaje para tirosín-quinasas no receptoras, como Btk y proteínas adaptadoras, como BLNK ("B-cell linker protein", también conocida como SLP65) (Fig. 9).

Además, como resultado de la activación de la PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) hay un aumento de los niveles de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato) en la cara interna de la membrana plasmática, dirigiendo el dominio PH de Btk hacia la membrana plasmática. La activación de Btk puede ocurrir también tras la estimulación de una gran diversidad de receptores de la superficie celular, siendo el denominador común, la generación de PIP3 (Figs. 7 y 9).

El primer evento transcurre en la membrana plasmática donde miembros de la familia de quinasas Src fosforilan Btk en un residuo clave de tirosina en el dominio kinasa, Y551. Este paso es seguido por un evento de autofosforilación en el residuo Y223 del dominio SH3; a continuación, Btk recluta a la proteína adaptadora BLNK, junto con PLC- γ 2 (fosfolipasa C- γ 2) a la membrana plasmática, conduciéndolas muy cerca de Syk (tirosin-quinasa esplénica) donde tiene lugar la fosforilación de ambas proteínas. En tercer lugar, la fosforilación y la consiguiente activación de PLC- γ 2 da lugar a la hidrólisis de fosfatidilinositol para producir IP3 y diacilglicerol (DAG) provocando la movilización de los depósitos de calcio intracelulares y activación de la protein-quinasa C (PKC), respectivamente. Finalmente, estas cascadas de

señales activan factores de transcripción que inducen la expresión de genes cuyos productos son necesarios para la activación funcional de los linfocitos B y su diferenciación hacia células productoras de anticuerpos (Abbas AK et al. (b) 2006).



2.4. Distribución de mutaciones en el gen BTK en pacientes con ALX

Desde que en el año 1993 se identificara BTK como el gen responsable de la ALX, se han descrito unas 600 mutaciones diferentes que afectan a los 5 dominios de la proteína, así como a las regiones no codificantes del gen (Lindwal JM et al. 2005). En 1994, se formó un grupo de estudio internacional con el propósito de avanzar en el conocimiento de esta enfermedad, creando

una base de datos común, en la que se invitaba a todos los investigadores a registrar las mutaciones encontradas en esta base de datos: Mutation registry for X-linked agammaglobulinemia. Esta base de datos se denominó BTKbase, siendo constantemente actualizada y estando disponible a través de Internet en la dirección: <http://bioinf.uta.fi/BTKbase/> .

Las mutaciones encontradas abarcan todos los tipos, incluyendo sustituciones de aminoácidos (cambio de sentido), formación de codones de parada (sin sentido), deleciones e inserciones. La mayoría de las deleciones e inserciones alteran la pauta de lectura, originando un codón de parada, aunque también se han descrito variaciones que no afectan la pauta de lectura. Una gran parte de las mutaciones están localizadas en los exones, mientras que aproximadamente el 16% afecta a zonas de procesamiento (Fig. 10). La mayoría de las mutaciones son puntuales, existiendo una cierta predilección por los llamados sitios CpG, que son zonas puntuales de la secuencia del gen que muestran una mayor susceptibilidad para sufrir mutaciones (Duncan BK et al. 1980, Lindwall JM et al. 2005).

La Fig. 11 muestra la localización de las diferentes mutaciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la proteína Btk. Las mutaciones de cambio de sentido no están distribuidas uniformemente a lo largo de todo el gen, localizándose preferentemente en el dominio kinasa de la proteína, especialmente en su porción Carboxiterminal. Por su parte, las mutaciones que alteran la pauta de lectura, dando lugar a la formación de un codón de parada, se hallan uniformemente distribuidas.

La gran variedad, tanto en las mutaciones descritas en el gen BTK, como en el grado de severidad de la enfermedad, han determinado que varios investigadores hayan tratado de establecer una asociación entre el tipo de mutación y el fenotipo de la enfermedad. Hasta el momento no ha sido posible establecer ninguna correlación firme en este sentido (López-Granados E et al. 2005, Broides P et al. 2006, Teimourian S et al. 2008), de tal manera que individuos que portan un mismo cambio genético pueden mostrar un fenotipo intermedio o severo de la enfermedad, incluso dentro de una misma familia.

BTKbase

Mutation registry for X-linked agammaglobulinemia (XLA)

BTKbase mutation types

	PH			TH			SH3			SH2			TK			Other			Total		
	uniq	ufam	all	uniq	ufam	all	uniq	ufam	all	uniq	ufam	all	uniq	ufam	all	uniq	ufam	all	uniq	ufam	all
Missense	38	75	89	7	7	8	0	0	0	32	70	86	122	237	273	0	0	0	199	389	456
Nonsense	14	30	34	6	10	11	12	34	40	11	20	21	32	67	74	0	0	0	75	161	180
Deletion inframe	6	6	11	2	2	2	0	0	0	4	5	5	10	13	15	0	0	0	22	26	33
Deletion frameshift	32	37	40	18	19	24	15	17	18	18	19	22	45	54	55	0	0	0	128	146	159
Deletion undefined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	18	18	18	19	19	19
Insertion inframe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	0	0	0	3	3	3
Insertion frameshift	9	16	19	10	15	15	3	3	3	3	3	3	18	22	27	0	0	0	43	59	67
Insertion undefined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	4	4	4	6	6	6
Splice site inframe	3	5	5	0	0	0	4	6	9	1	1	1	3	4	5	0	0	0	11	16	20
Splice site frameshift	7	7	9	0	0	0	1	1	1	3	3	6	9	10	13	0	0	0	20	21	29
Splice site undefined	20	26	30	6	9	10	5	7	8	15	19	19	35	51	56	4	7	8	85	119	131
Multiple	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5	5	5
Upstream	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
Unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	131	204	239	51	64	72	40	68	79	89	142	165	278	462	522	31	34	35	620	974	1112

uniq = Unique molecular events
ufam = Unrelated families
all = All analyzed alleles
Other = Mutations at Upstream, GROSS, PH,TH,SH3 regions

Last updated 12.4.2007 15:17

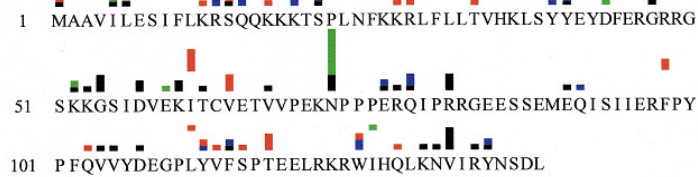
Fig. 10. Distribución de mutaciones en los diferentes dominios del gen BTK. Tomada de <http://protein.uta.fi/BTKbase>

Fig. 11. Distribución de mutaciones en el gen *BTk* en familias con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. Tomada de <http://protei.uta.fi/BTKbase/family/bars.html>

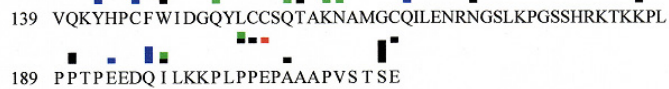
Distribution of mutations in families having XLA

Red bars represent missense mutation families
 Blue bars represent nonsense mutation families
 Green bars represent insertion mutation families
 Black bars represent deletion mutation families

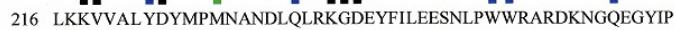
PH DOMAIN



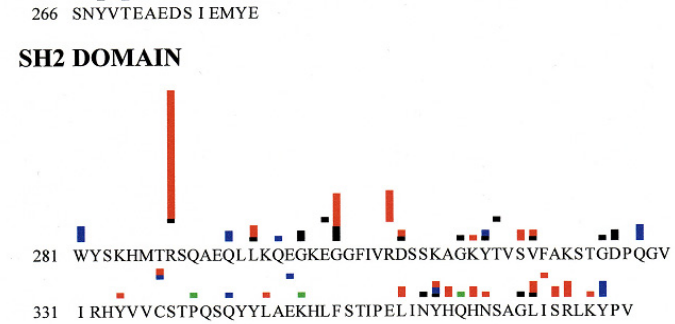
TH DOMAIN



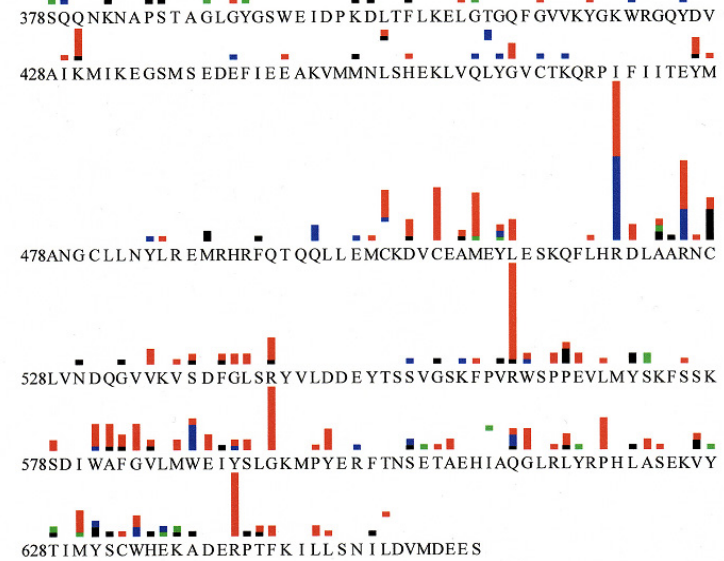
SH3 DOMAIN



SH2 DOMAIN



KINASE DOMAIN



Por otra parte, en un 10% de individuos con fenotipo típico de síndrome de Bruton, no se consiguen encontrar mutaciones en el gen BTK, aunque la ausencia selectiva de mRNA de Btk o de la proteína se consideran marcadores diagnósticos de síndrome de Bruton (Smith E et al. 2007).

Desde el momento en que la enfermedad pudo ser definida mediante métodos de biología molecular, se ha comprobado a lo largo del tiempo que las características clínicas e inmunológicas del síndrome de Bruton son mucho más variables de lo que inicialmente se pensaba, habiéndose diagnosticado pacientes en la edad adulta que eran portadores de formas clínica e inmunológicamente atenuadas. Por otra parte se han descrito casos esporádicos de síndrome de Bruton en los que no existen antecedentes familiares de enfermedad (Broides P et al. 2006, Sigmon JR et al. 2008).

2.5. Patología y Clínica Asociada al Síndrome de Bruton.

El síndrome de Bruton es una inmunodeficiencia primaria que está incluida en la clasificación internacional dentro de las deficiencias de anticuerpos. Fenotípicamente, se expresa como un déficit en la producción de anticuerpos debido a un defecto primario en la diferenciación de las células B. Algunos individuos tienen células pre-B en su MO, pero no tienen células B maduras en sangre periférica; como consecuencia, no son capaces de producir inmunoglobulinas de ningún isotipo y, por tanto, son susceptibles de padecer infecciones de repetición, principalmente bacterianas. Por esta misma razón, la respuesta humoral frente a vacunas está muy disminuida o ausente en estos individuos.

La incidencia descrita del síndrome de Bruton es de 5/1.000.000 de nacidos vivos, aunque esta proporción puede variar según las razas. Estos datos se basan en el análisis de los pacientes que sobreviven a la enfermedad, y pueden estar influenciados por distintos factores, tales como la evolución de los métodos diagnósticos y del tratamiento de la enfermedad, por lo que es posible que la incidencia real de la enfermedad sea mayor que la descrita (Smith E et al. 2007). Los avances conseguidos en el desarrollo de las herramientas disponibles para el diagnóstico y tratamiento de esta

enfermedad, han hecho que la prevalencia haya aumentado y, por consiguiente, el número de pacientes inscritos en los registros (Kanegane H et al. 2000).

Desde el punto de vista clínico el síndrome de Bruton se caracteriza por la aparición de infecciones recurrentes por bacterias piógenas, casi siempre graves, usualmente neumonías, que suelen evolucionar tórpidamente y que terminan por ocasionar un deterioro de la función respiratoria. Además de neumonías, otitis media, diarreas, sinusitis, conjuntivitis y pioderma son las formas clínicas de presentación habituales (Smith E et al. 2007). La diseminación hematógena de la infección suele causar septicemia, meningitis, artritis séptica y osteomielitis. La artritis, que afecta a grandes articulaciones, suele ocurrir en el 20% de los casos. Infecciones del sistema nervioso central se encuentran en el 4-16% de los casos y septicemia en el 6-10% previo o en el momento del diagnóstico (Hermanszewski RA et al. 1993, Plebani A et al. 2002). Las infecciones por enterovirus pueden complicarse con encefalitis crónica progresiva en estos pacientes. Otras infecciones virales, tales como sarampión o infecciones por microorganismos intracelulares (*Mycobacterias* o *Toxoplasma gondii*), siguen un curso similar al de un individuo con un sistema inmunológico competente. Para este tipo de agentes infecciosos se piensa que la inmunidad celular constituye la principal defensa (Smith E et al. 2007).

El inicio de infecciones recurrentes sucede de forma típica durante la segunda mitad del primer año de vida (entre los 4-12 meses), cuando los anticuerpos maternos que cruzaron la placenta durante el embarazo empiezan a reducirse por debajo de niveles protectores. Sin embargo, se han descrito casos en que la sintomatología ha sido de aparición más tardía. En un estudio norteamericano (Lederman HM et al. 1985) se observó que, de los 96 pacientes analizados, el 25% mostraba síntomas a los 4 meses de edad, el 50% a los 8, el 75% a los 12, y el 90% a los 18 meses. En un estudio británico realizado en 42 pacientes (Hermanszewski RA et al. 1993), se observó que hasta un 40% de ellos no presentaba síntomas durante el primer año de vida, y un 20% permanecía asintomático, incluso hasta los 3-5 años de edad. En otro estudio italiano, la media de aparición de síntomas fue a los 2 años de edad (Plebani A et al. 2002).

En cuanto al inicio de los síntomas, entre los casos familiares y esporádicos no hay diferencias, aunque el diagnóstico se puede retrasar más en los casos esporádicos (Lederman HM et al. 1985). Sin embargo, incluso dentro de una misma familia, varios individuos con la misma mutación identificada pueden presentar diferencias tanto en la edad de inicio como en la gravedad de los síntomas, lo cual demuestra que existen otros factores que pueden influir en este proceso (Kornfeld SJ et al. 1997, Bykowsky MJ et al. 1996).

La afectación del desarrollo del linfocito B, responsable de esta enfermedad, afecta a todos los órganos, de manera que se observa un tamaño muy reducido de amígdalas, adenoides y nódulos linfáticos. Los órganos linfoides secundarios pierden sus centros germinales y folículos. Un hallazgo característico del síndrome de Bruton, que no aparece en otras IDP, es la ausencia de células plasmáticas en la lámina propia del intestino, aunque en la IDVC se pueden encontrar también en número muy reducido. Por lo general, a no ser que se sospeche una invasión intestinal por microorganismos, no se suele hacer biopsia en estos pacientes (Smith E et al. 2007).

El interés en el diagnóstico del Síndrome de Bruton reside en el hecho de que éste constituye una entidad mejor definida a nivel fisiopatológico y genético que otras deficiencias de anticuerpos que, clínicamente, tienen una forma de presentación muy similar, pero para las que hasta el momento no se ha descubierto un defecto genético asociado o un patrón de herencia concreto. En algunas IDCV ya se ha descrito el defecto genético subyacente, aunque son minoría (Castigli E et al. 2006).

2.6. Estado de portadoras. Lionización

Normalmente, y muy temprano en la embriogénesis, se produce la lionización o proceso de inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X en las células somáticas femeninas: el de origen materno o el paterno, manteniéndose este estado inalterable durante toda la progenie de esa célula. Habitualmente, este fenómeno da lugar a un mosaico de células que presentarán, en forma alternativa uno u otro cromosoma X activo o inactivo; de modo que, en teoría, el 50% de las células tendrán la combinación

“cromosoma X materno activo/cromosoma X paterno inactivo”, mientras que el 50% restante presentará la combinación “cromosoma X materno inactivo/cromosoma X paterno activo”. Una vez producida la lionización, es el cromosoma X activo el encargado de brindarle información genética a esa célula, lo que implica transcribirse a ARN y traducirse en proteínas (Puck JM et al. 2007).

Para responder a la pregunta de si el defecto responsable del síndrome de Bruton era intrínseco al linaje B o era debido a la ausencia de un factor de crecimiento o de diferenciación producido por las células T, células mieloides o células estromales de la médula ósea, se examinaron los patrones de inactivación del cromosoma X en células B, células T, y neutrófilos de mujeres portadoras del síndrome de Bruton (Conley ME, 1985). Este estudio reveló que tan sólo las células B y no las demás estirpes celulares, presentaban, en todas las mujeres portadoras estudiadas, un patrón de inactivación del cromosoma X no debido al azar, es decir, todas las células B derivaban de precursores de médula ósea que portaban el cromosoma X normal activo. El resultado de este estudio indicaba que el transcrito del gen mutado se expresaba en el linaje celular B, ya que se sabía previamente que la proteína defectuosa era un factor limitante para el desarrollo y maduración de la célula B desde su origen, tal y como se ha confirmado posteriormente (Busque L et al. 1996, Kubota T et al. 1998).

2.7. Tratamiento de la agammaglobulinemia ligada a X

El tratamiento del síndrome de Bruton consiste en la infusión de gammaglobulina de por vida. Este producto es preparado a partir de plasma proveniente de miles de donantes. Existen dos formas de administración; la forma clásica es mediante infusión endovenosa con una periodicidad que varía entre 21-28 días, y requiere que el paciente acuda a un centro de día hospitalario para su administración. Más recientemente se ha introducido en nuestro país su infusión subcutánea, que puede ser administrada por el propio paciente de forma ambulatoria y permite mantener unos niveles adecuados de IgG con pautas de administración semanal (100-150 mg/ Kg /dosis) después

de un entrenamiento adecuado. Esta nueva forma de administración precisa varios sitios de inyección por cada dosis, ya que el volumen es demasiado grande para administrarlo de forma subcutánea (0.5mL/kg de peso) en una sola dosis.

Independientemente de la vía de administración, el objetivo del tratamiento es obtener una tasa de anticuerpos (IgG) circulantes entre 500 y 600 mg/dl. Sin embargo, una tasa media de 900 mg/dl parece haber mostrado una disminución significativa de la frecuencia y de la gravedad de las infecciones, especialmente de meningoencefalitis producidas por enterovirus, posiblemente debido a la necesidad de una mayor concentración de determinados anticuerpos que, en condiciones normales, podrían estar menos representados en los preparados de inmunoglobulinas (Smith E et al. 2007).

Han sido varios los intentos de realizar tratamiento con trasplante de progenitores hematopoyéticos de donantes histocompatibles, sin que se hayan obtenido hasta la fecha resultados satisfactorios (Howard V et al. 2003).

Con respecto a las vacunaciones en los pacientes afectados de síndrome de Bruton, aquellas con microorganismos vivos atenuados están contraindicadas, ya que existe el riesgo de desarrollar la infección contra la que el paciente se está vacunando. La prevención de las infecciones se apoya con una educación del paciente y una vigilancia bacteriológica regular, así como con tratamiento antimicrobiano precoz (Broides P et al. 2006).

2.8. Importancia del diagnóstico diferencial

Debido a la similitud clínica del síndrome de Bruton con el síndrome de inmunodeficiencia variable común, se pueden plantear dudas en su diagnóstico diferencial, fundamentalmente cuando el paciente es un varón y no existen antecedentes familiares de enfermedad. El tratamiento en ambos casos es exactamente el mismo, consistente en la terapia sustitutiva con gammaglobulina de por vida.

En la IDVC, aunque se han descrito algunos defectos genéticos asociados (Casanova L et al. 2008), aún no existe un patrón claro de herencia.

En el síndrome de Bruton sí está muy bien definido, por lo que es fundamental la identificación de portadoras, ya que nos brinda la posibilidad de ofrecer consejo genético a aquella mujer que lo desee, no sólo encaminada, por ejemplo, a la selección del sexo del embrión, sino para que cuando nazca un varón con síndrome de Bruton, hijo de una madre portadora ya conocida, se le pueda instaurar tratamiento precoz con gammaglobulina, adelantándose así a la aparición de los primeros síntomas clínicos. Todo ello, con el objetivo de prevenir las infecciones de repetición que terminan por provocar un deterioro de la función respiratoria del paciente, limitando su calidad y expectativa de vida (d'Audigier C et al. 2006).

El diagnóstico diferencial se debe realizar también con otros defectos de la producción de anticuerpos, tales como la hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia. La diferencia entre estas dos entidades estriba en que el porcentaje de linfocitos B circulantes debe ser superior a un 5% en esta última. También se debe hacer un diagnóstico diferencial con las formas autosómicas recesivas, cuyo patrón hereditario es absolutamente diferente (Notarangelo L et al. 2004).

En el diagnóstico, hay que tener en cuenta que para el conteo de linfocitos B debe emplearse siempre una combinación de anticuerpos monoclonales frente a varios marcadores de superficie de la estirpe B, tales como CD19, CD20, CD22, etc, ya que existe otra entidad recientemente descrita, que consiste en la ausencia de expresión de CD19 en células B, cuya presentación clínica es similar al síndrome de Bruton y para la cual se han descrito mutaciones en el gen que codifica CD19, siendo la expresión del resto de los marcadores de superficie de la serie B normal (Menno C et al. 2006).

La otra vertiente del diagnóstico del síndrome de Bruton es la posibilidad de ofrecer consejo genético. La enfermedad está ligada al cromosoma X con una penetrancia completa, lo que implica que los varones sufren la enfermedad y las mujeres pueden ser portadoras de la enfermedad. La probabilidad de que una mujer portadora pueda tener un hijo afecto de la enfermedad es del 50% si el embarazo es de un varón. Mientras que existe un 25% de probabilidades de que nazca una hija que sea portadora de la enfermedad, de manera que el 50% de las hijas serán sanas no portadoras, y el

50% serán sanas portadoras (Puck JM et al. 2007). Por ello es fundamental insistir en la correcta caracterización de los pacientes varones con hipogammaglobulinemia y niveles muy reducidos o ausentes de linfocitos B circulantes.

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Las deficiencias inmunitarias en las que predomina el déficit en la producción de anticuerpos son las inmunodeficiencias primarias más frecuentes. Forman un grupo heterogéneo de defectos inmunológicos, clínicamente definidos por una mayor susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes. Aunque las manifestaciones clínicas suelen ser similares entre sí, algunos de ellos presentan particularidades propias.

Es necesario efectuar un diagnóstico adecuado de estos pacientes, ya que ello permite un tratamiento precoz de la enfermedad, lo que reduce las secuelas a largo plazo derivadas de las infecciones recurrentes. Por otra parte, los errores a la hora de catalogar a un paciente dentro de este grupo de inmunodeficiencias son comunes debido a la similitud en su forma de presentación clínica. Es necesario, por ello, profundizar en el estudio de los pacientes con déficit de anticuerpos, y este punto es particularmente importante cuando existe una base genética conocida para la enfermedad y se halla ligada al cromosoma X. En este sentido, se pueden identificar posibles portadoras, así como nuevos casos en las fases iniciales o incluso antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad, existiendo, por tanto, la posibilidad de ofrecer consejo genético al paciente y/o a la familia.

Dentro de las deficiencias predominantemente de anticuerpos, el defecto ligado al cromosoma X más común es el Síndrome de Bruton o Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

-Entre los pacientes remitidos para estudio a un Servicio de Inmunología con sospecha clínica de inmunodeficiencia por presentar infecciones de repetición desde edades tempranas, se encuentran aquellos con niveles muy reducidos de todas las clases de inmunoglobulinas, así como de linfocitos B, teniendo, algunos de ellos, antecedentes familiares de enfermedad.

-El estudio de estos pacientes y sus familiares podría permitir dilucidar si se trata de un defecto genético ligado al cromosoma X, así como la posibilidad de consejo genético.

-Diagnosticar correctamente a los pacientes con inmunodeficiencias primarias puede permitir conocer su incidencia y prevalencia real en nuestra población.

-Por otra parte, el estudio de estos pacientes suele requerir un gran número de determinaciones analíticas, que implican una gran inversión de tiempo y el empleo de métodos de diagnóstico muy laboriosos. En ocasiones, además, es necesario confirmar el resultado, lo que requiere repetir la extracción sanguínea al paciente y a sus familiares. Una mejora, a este nivel sería beneficioso para todos ellos.

OBJETIVOS

- 1)** Estudio clínico, inmunológico y genético de carácter observacional en pacientes varones con historia clínica de infecciones graves de repetición desde la infancia y con niveles muy reducidos de todas las inmunoglobulinas y de linfocitos B.
- 2)** Estudio de familiares de dichos pacientes para la caracterización de portadoras del defecto genético.
- 3)** Conocer la incidencia y prevalencia real del síndrome de Bruton en nuestra población.
- 4)** Mejora de los métodos de diagnóstico.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla; al tratarse de un Hospital de tercer nivel, se reciben pacientes para estudio desde los distintos hospitales de la provincia, así como del resto de Andalucía.

Entre los pacientes remitidos para estudio desde los diferentes centros, entre enero de 1999 y mayo de 2008, se realizó la selección de los pacientes objeto de este trabajo, la cual se basó en los siguientes criterios:

- Pacientes varones
- Historia clínica de infecciones graves de repetición desde la infancia.
- Sospecha clínica de deficiencia de anticuerpos.
- Niveles muy reducidos de todas las clases de Inmunoglobulinas y cifras muy reducidas o ausencia de linfocitos B en el estudio inmunológico básico inicial.

El estudio se extendió a los familiares de los pacientes seleccionados, en los casos en que fue posible.

Se incluyó un grupo control de 100 individuos no emparentados, procedentes del mismo área geográfica e incluidos en el registro del Centro Regional de Transfusiones Sanguíneas de Sevilla.

2. ESQUEMA DE ESTUDIO

Para conseguir alcanzar los objetivos propuestos anteriormente, planteamos el siguiente esquema de estudio:

- 1) Seleccionar de entre los pacientes remitidos al Servicio de Inmunología con sospecha clínica de inmunodeficiencia por déficit de anticuerpos, por presentar infecciones de repetición desde edades tempranas, a aquellos pacientes varones con niveles muy reducidos de todas las clases de Inmunoglobulinas y de linfocitos B.

- 2) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de la proteína Btk en monocitos de sangre periférica en enfermos y posibles portadoras.
- 3) En todos estos casos, secuenciar el gen para encontrar la alteración genética responsable, tomando como molde el DNA extraído de las células sanguíneas.
- 4) Comparar las alteraciones genéticas encontradas con las descritas en la literatura y en bases de datos internacionales.
- 5) Ampliar el estudio a los familiares de los pacientes, en los casos que sea posible, para analizar el patrón hereditario de las mutaciones encontradas.
- 6) Confirmar o descartar el estado de portadora en las mujeres de cada familia.
- 7) Calcular la incidencia del Síndrome de Bruton en nuestra población.
- 8) Mejora de métodos diagnósticos.

3. MÉTODOS

3.1. Recopilación de datos clínicos e inmunológicos de los pacientes incluidos en el estudio

Los datos clínicos de estos pacientes se obtuvieron mediante una revisión detallada de su Historia Clínica, de la que se obtuvieron los siguientes datos: manifestaciones clínicas más relevantes, edad de inicio de los síntomas, edad al diagnóstico, edad de inicio del tratamiento sustitutivo con IgIV, antecedentes familiares y datos de laboratorio.

También se revisaron los estudios analíticos y pruebas complementarias que se suelen realizar de forma rutinaria a los pacientes con sospecha de inmunodeficiencia por déficit de anticuerpos, tales como: hemograma completo, bioquímica completa, cuantificación de inmunoglobulinas séricas y subclases de IgG, isohemaglutininas, niveles de anticuerpos específicos previos al inicio del tratamiento sustitutivo con IgIV, cuantificación de factores del complemento y de su actividad, determinación de subpoblaciones y función

linfocitarias, realizados con los métodos habituales de laboratorio (especificados más adelante), pruebas de función respiratoria, radiografías de tórax, tomografía computerizada (TC) de tórax y abdomen, y radiografía de senos paranasales.

A estas pruebas básicas, se le añaden otras, más específicas y más selectivas según la sintomatología clínica: serología para virus de hepatitis B y C, cultivo de esputo, hemocultivos, coprocultivo para bacterias y parásitos, test del sudor, etc.

3.2. Criterios diagnósticos de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

Para el diagnóstico de agammaglobulinemia ligada a X se emplearon los siguientes criterios diagnósticos propuestos por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) (<http://www.esid.org>).

Diagnóstico definitivo:

Paciente varón con <2% de linfocitos B CD19+ y al menos uno de los siguientes criterios:

1. Mutaciones en el gen BTK.
2. Ausencia de mRNA de Btk en granulocitos y/o monocitos.
3. Ausencia de proteína Btk en monocitos o plaquetas.
4. Primos maternos, tíos o sobrinos con menos de 2% de células CD19+.

Diagnóstico probable:

Paciente varón con <2% de linfocitos B CD19+ y todos los siguientes criterios:

1. Infecciones bacterianas recurrentes en los primeros 5 años de vida.
2. Niveles séricos de IgG, IgA e IgM por debajo de 2 desviaciones estándar de los valores normales para la edad del paciente.
3. Ausencia de isohemaglutininas y/o respuesta pobre a vacunas.
4. Se hayan excluido otras causas de hipogammaglobulinemia.

Diagnóstico posible:

Paciente varón con <2% de linfocitos B CD19+, se hayan excluido otras causas de hipogammaglobulinemia y cumplan al menos uno de los siguientes criterios:

1. Infecciones bacterianas recurrentes en los primeros 5 años de vida.
2. Niveles séricos de IgG, IgA e IgM por debajo de 2 desviaciones estándar de los valores normales para la edad del paciente.
3. Ausencia de isohemaglutininas.

Para excluir otras causas de hipogammaglobulinemia, tales como hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, se debe hacer un seguimiento estrecho con la monitorización de los niveles de IgA, IgG e IgM, cuantificación de subpoblaciones linfocitarias (CD19, CD3, CD4 y CD8) al menos en dos determinaciones mediante citometría de flujo.

3.3. Marcadores fenotípicos de las distintas poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo

La citometría de flujo (CF) es un método analítico que permite medir la emisión de fluorescencia y dispersión de luz, al incidir una determinada longitud de onda sobre una suspensión celular, a medida que es arrastrada, y pasan las células de una en una por un flujo portador frente a un sistema de detección. La CF aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a componentes celulares, se acumulan selectivamente en distintos compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas.

Mediante la CF se definen las características físicas y químicas de las células, bien mediante parámetros extrínsecos (antígenos de superficie) o intrínsecos (tamaño, morfología celular y granularidad o complejidad interna).

Los parámetros dispersión frontal o Forward Scatter (FSC) y dispersión lateral o Side Scatter (SSC) permiten diferenciar las células por su tamaño y su granularidad o complejidad interna, respectivamente. De esta forma, la CF permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o

partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas y tiene una amplia aplicación en estudios inmunológicos (Figs. 1 y 2).

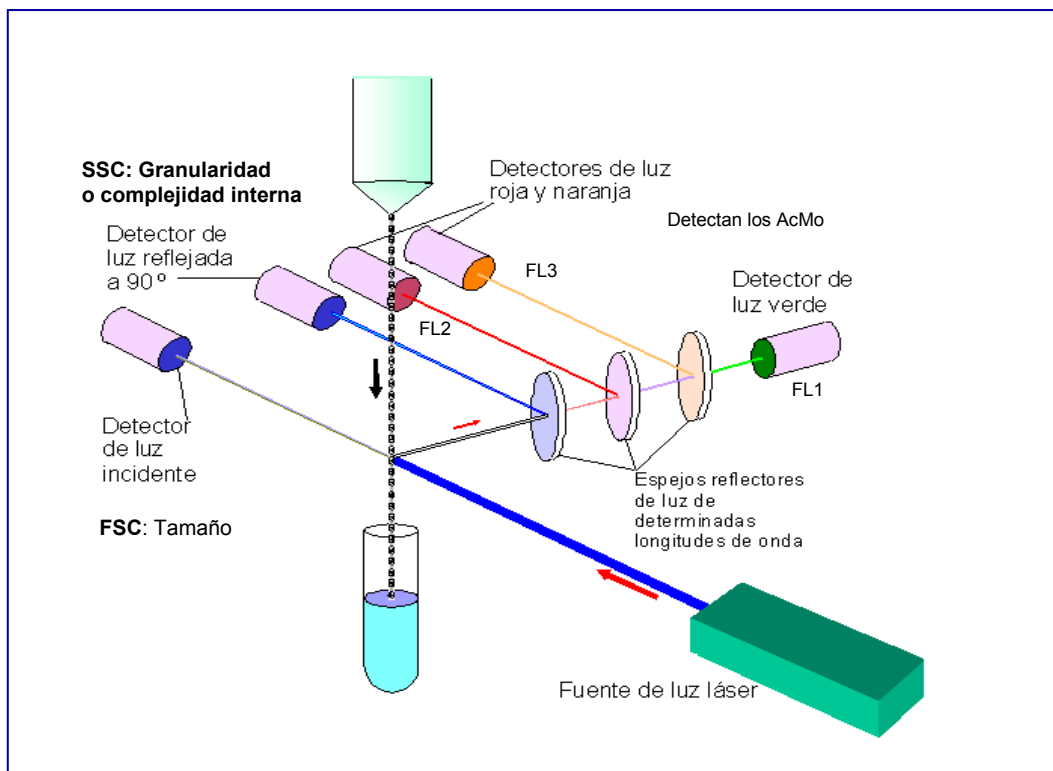


Fig.1. Representación esquemática de los fundamentos de CF.

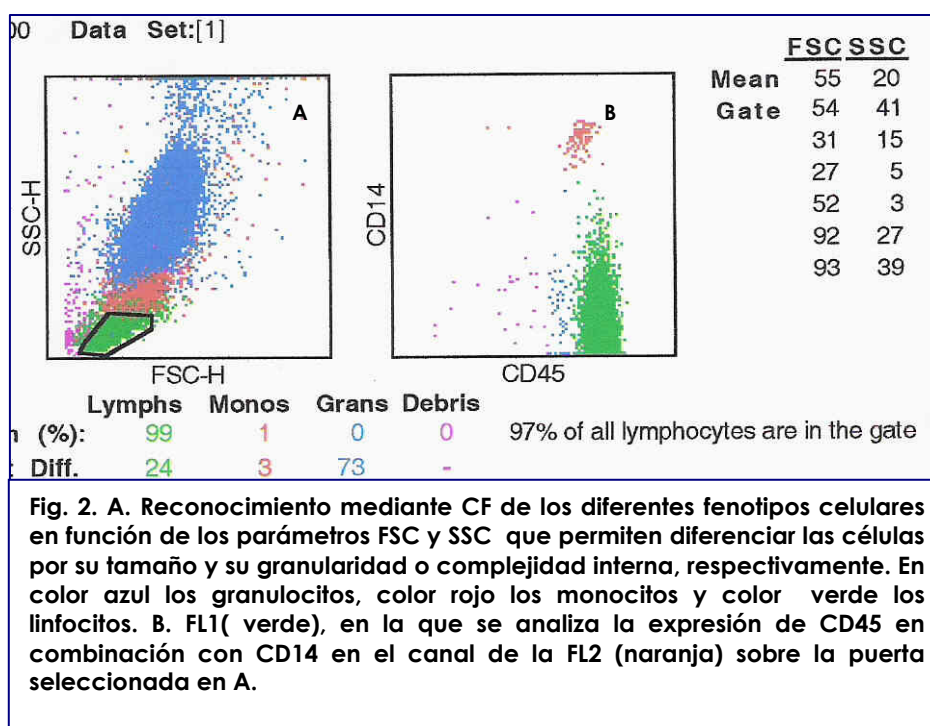
El haz de luz láser cuando atraviesa una célula sufre una dispersión que puede ser evidenciada en un fotodetector, situado detrás de la corriente de células y justo enfrente de la fuente emisora, como una disminución de la luz incidente. El tiempo que dure el corte en la llegada de fotones al detector será proporcional al diámetro, y por tanto al volumen celular. Dispersión frontal o Forward Scatter (**FSC**).

Complejidad. Existe otro grupo, que detecta la luz dispersada por las células y que se coloca formando un ángulo de 90° con el haz láser. Esta luz es descompuesta, mediante los filtros apropiados para poder estudiar tanto la dispersión de luz de la misma longitud de onda del láser como la emitida por los fluorocromos. La mayor o menor dispersión de la luz y por tanto la mayor o menor detección de luz en ese detector, será proporcional a la complejidad de la superficie celular y a las estructuras y organelas celulares Dispersión lateral o Side Scatter (**SSC**).

Fluorescencia. La luz dispersada pasa a través de espejos que reflejan fotones hasta longitudes de onda determinadas y dejan continuar a los de longitud de onda mayor de manera que es posible descomponer la luz en varios rangos de longitudes de onda que nos permiten estudiar complejidad y dos, tres o más fluorescencias, según el modelo de citómetro (**FL1,FL2,FL3**).

Imagen adaptada de:

http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/C_flujo001



3.3.1. Marcadores celulares de superficie

Se diseñó un panel con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales para la determinación simultánea de los marcadores de superficie de las diferentes poblaciones celulares, teniendo en cuenta los marcadores de superficie estudiados habitualmente en el diagnóstico de los síndromes de inmunodeficiencia primaria (Tabla 1). Además, en el caso concreto de las células B, se incluyeron varios marcadores de superficie de la estirpe B presentes a lo largo de su desarrollo. El ensayo se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa y análisis por citometría de flujo.

Para ello, se añadieron a cada tubo 50 µl de sangre periférica y 5 µl de cada AcMo. Los tubos se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió 1 ml de solución lisante (FACS Lysing Solution, BD), incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, para la lisis de los hematíes. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS y centrifugación a 500xg durante 5 min y se resuspendieron en un volumen final de 200 µl de PBS para su análisis en un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACSsort).

Tabla 1. Combinación de AcMo empleados para el estudio fenotípico de linfocitos.						
BD: Becton Dickinson; BDPhar: BDPharmingen						
	AcMo-FITC	Procedencia	Ref. No.	AcMo-PE	Procedencia	Ref. No.
1.	CD45	BD.Simultest Leucogate (CD45/CD14.)	342408	CD14	BD.Simultest Leucogate (CD45/CD14)	342408
2.	Control de isotipos	Simultest	349526 (95-0026)	Control de isotipos	Simultest	349526 (95-0026)
3.	CD18	BD	347953	CD132	BDPhar	555898
4.	CD16+56	BD	335035	CD132	BDPhar	555898
5.	HLA-ABC	BDPhar	555552	HLA-DR	BD	347401
6.	CD7	BD	347483	CD21	BDPhar	555422
7.	CD8	BD	345772	CD22	BD	337898
8.	CD27	BDPhar	555440	CD19	BD	345777
9.	CD30	BDPhar	555829	CD4	BD	347414
10.	CD4	BD	347413	CD45RO	BDPhar	31304-X
11.	CD43	Dako	F-7102	CD212	BDPhar	550723
12.	CD25	BD	345796	CD34-PE	BDPhar	555822
13.	TCR$\alpha\beta$	BD WT31	347773	TCR$\gamma\delta$	BD	333141
14.	CD58	BDPhar	555920	CD2	BD	347405
15.	CD25	BD	345796	CD119 (IFNγ-R)	BDPhar	558934
16.	CD40	BDPhar	555588	CD19	BD	345777
17.	CD268 (BAFF-R)	BDPhar	558081	CD19	BD	345777
18.	CD19	BD	345777	CD267 (TACI)	BDPhar	558414

Se empleó el programa BD CellQuest™ para la adquisición y el análisis de datos, así como el programa "WindMDI" versión 2.8, disponible en la dirección de internet <http://facs.scripps.edu/sofwre.html>.

Para el cálculo de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos, estableciendo una puerta (región) de adquisición sobre la población celular a analizar, que fueron seleccionados por criterios de tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC), y por expresión de marcadores de la superficie celular en diagramas de densidad en los canales de FL1, FL2 y/o FL3.

La muestra del control negativo (tubo 2) se utilizó para situar los cuadrantes a fin de delinear expresión positiva o negativa. El porcentaje de

células positivas en la muestra del control negativo fue inferior al 5% en todos los casos.

El recuento de linfocitos y de las subpoblaciones linfocitarias es un parámetro imprescindible en el diagnóstico inicial ante la sospecha de una inmunodeficiencia primaria. Esta determinación se realiza de modo rutinario en el Servicio de Inmunología de nuestro hospital. Para ello, una muestra de sangre extraída en tubos con EDTA es marcada con un panel de anticuerpos apropiado dentro de las primeras 24 horas de la extracción. El recuento absoluto y porcentajes de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+, linfocitos B CD19+ y linfocitos NK CD16+CD3+ se obtiene por análisis automatizado de un volumen fijo de sangre, utilizando un citómetro de flujo *Orthocytoron Absolute* (Ortho, USA) o Beckman Coulter Epics XL-MCL. En la tabla 2 se muestran las diferentes subpoblaciones linfocitarias identificadas por este método y los rangos de referencia, en porcentaje y número absoluto tanto en adultos como en niños distribuidos por edades (Erkeller E et al. 1999).

3.4. Estudio de la funcionalidad linfocitaria

La activación o estimulación de los linfocitos ex vivo nos aproxima a lo que transcurre cuando un antígeno reacciona con linfocitos específicamente sensibilizados. De esta forma se mide la capacidad funcional de los linfocitos T o B para responder después de la provocación antigénica y se emplea para evaluar la inmunidad celular.

Los mitógenos son agentes capaces de activar muchos clones de linfocitos con independencia de sus especificidades antigénicas: fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (ConA), para las células T (mecanismos diferentes); mitógeno de fitolaca (Pokeweed, PWM), que estimula principalmente las células B, dependientes de células T y la proteína A de la pared celular de *Staphylococcus aureus* (Spa), con especificidad relativa para células B independiente de células T.

Tabla. 2. Rangos de referencia de las diferentes poblaciones linfocitarias en porcentajes y números absolutos (células/ μ L) tanto en adultos como en niños distribuidos por edades (Erkeller et al. 1992).

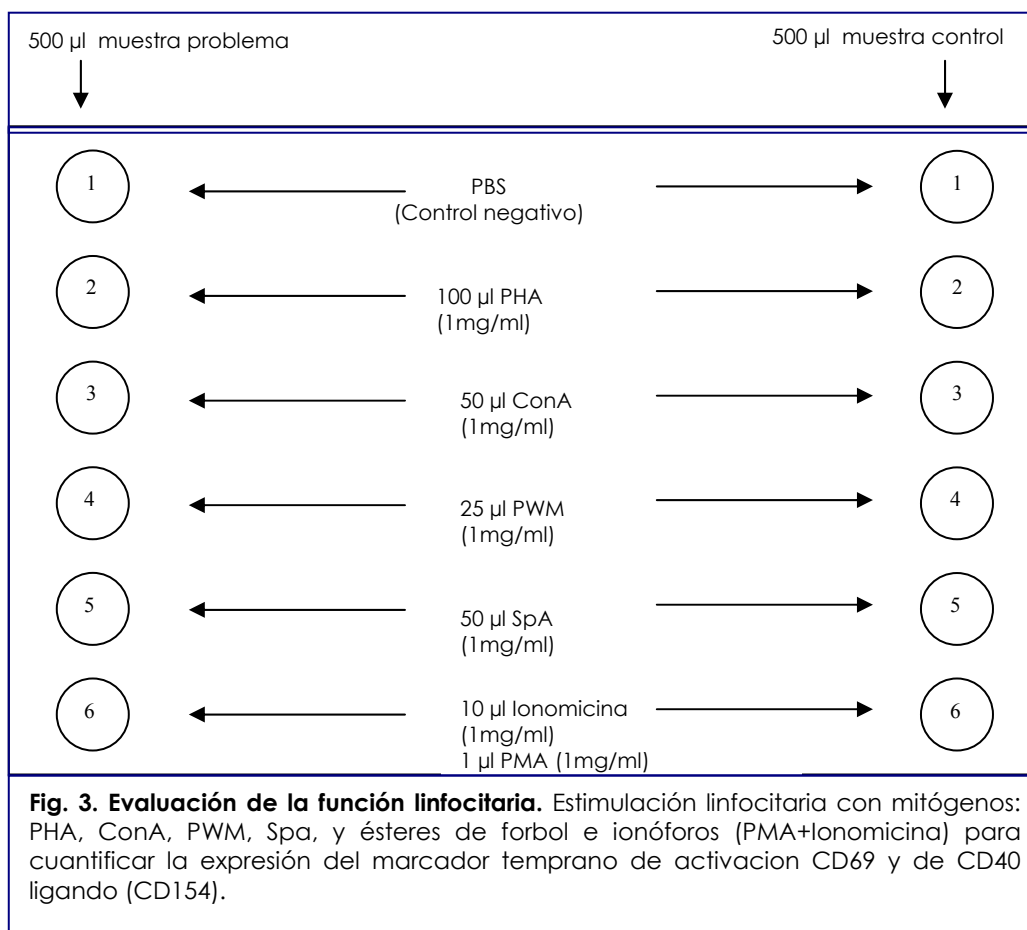
	SCU*	1día-11 meses	1-6 años	7-17 años	18-70 años
	Media (P25-75)	Media (P25-75)	Media (P25-75)	Media (P25-75)	Media (P25-75)
Leucocitos					
Células/ μ L	12 (10-15)	9.0 (6,4-11)	7.8 (6.8-10)	6.0 (4.7-7.3)	5.9 (4.6-7.1)
Linfocitos					
Porcentaje	41 (35-47)	47 (39-59)	46 (38-53)	40 (36-43)	329 (28-39)
Nº absoluto	5.4 (4.2-8.9)	4.1 (2.7-5.4)	3.6 (2.9-5.1)	2.4 (2.0-2.7)	2.1 (2.6-1.4)
Células T					
Porcentaje	56 (49-62)	64 (58-67)	64 (62-69)	70 (66-76)	72 (67-76)
Nº absoluto	3.1 (2.4-3.7)	2.5 (1.7-3.6)	2.5 (1.8-3.0)	1.8 (1.4-2.0)	1.4 (1.1-1.7)
Células B					
Porcentaje	20 (14-23)	23 (19-31)	24 (21-28)	16 (12-22)	13 (11-16)
Nº absoluto	1.0 (0.7-1.5)	0.9 (0.5-1.5)	0.9 (0.7-1.3)	0.4 (0.3-0.5)	0.3 (0.2-0.4)
Células Nk					
Porcentaje	20 (14-30)	11 (8.0-1.7)	11 (8.0-1.6)	12 (9.0-1.6)	14 (10-19)
Nº absoluto	0.9 (0.8-1.8)	0.5 (0.3-0.7)	0.4 (0.2-0.6)	0.3 (0.2-0.3)	0.3 (0.2-0.4)
Células T CD4+					
Porcentaje	35 (28-42)	41 (38-50)	37 (30-40)	37 (33-41)	42 (38-46)
Nº absoluto	1.9 (1.5-2.4)	2.2 (1.7-2.8)	1.6 (1.0-1.8)	0.8 (0.7-1.1)	0.8 (0.7-0.11)
Células T CD8+					
Porcentaje	29 (26-33)	21 (18-25)	29 (25-32)	30 (27-35)	35 (31-40)
Nº absoluto	1.5 (1.2-2.0)	0.9 (0.8-1.2)	0.9 (0.8-1.5)	0.8 (0.6-0.9)	0.7 (0.5-0.9)
CD4+/CD8+	1.2 (0.8-1.8)	1.9 (1.5-2.9)	1.3 (1.0-1.6)	1.3 (1.1-1.4)	1.2(1.0-1.5)

*SCU: Sangre de Cordón Umbilical

Por otra parte, los ionóforos aumentan la concentración de Ca^{++} en el citoplasma produciendo la activación celular y los ésteres de forbol, estimulan la enzima proteincinasa C, lo que conduce a la proliferación linfocitaria en presencia de los cofactores adecuados. Su empleo conjunto permite a las pocas horas evaluar los signos precoces de activación como son la expresión de la molécula de activación linfocitaria AIM/CD69 (Cebrián M et al. 1989) y de CD154. Este último se expresa en la superficie de las células T, estimulando la proliferación de las células B, tras la unión a su ligando, la molécula CD40, presente en la superficie de células B (segunda señal o señal coestimuladora) (Abbas AK et al. 2006b).

Como material de partida para esta prueba se utilizó sangre periférica fresca obtenida por venopunción en tubos estériles con heparina sódica como anticoagulante.

Se distribuyeron en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, 500 µl de sangre periférica con los distintos mitógenos, así como con PMA (12 acetato 13 miristato de forbol) e ionomicina según el esquema de la Fig. 3.



Las muestras se incubaron durante 4 horas a 37°C en una cámara de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó el marcaje de superficie con los AcMo CD69-PE (BD. Ref. 341652), CD154-PE (BD CD40L. Ref.340477) durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, según se describe en la tabla 3.

Tabla 3: Combinación de AcMo empleados para evaluar la función linfocitaria mediante la expresión del marcador temprano de activación CD69 y CD154 .		
Tubo 1.	CD45FITC/CD14PE	100 µl pocillo 1 (CN)
Tubo 2.	Control de Isotipos $\gamma 1/\gamma 2$	100 µl pocillo 1 (CN)
Tubo 3.	CD69PE	100 µl pocillo 1 (CN)
Tubo 4.	CD69PE	100 µl pocillo 2 (PHA)
Tubo 5.	CD69PE	100 µl pocillo 3 (ConA)
Tubo 6.	CD69PE	100 µl pocillo 4 (PWM)
Tubo 7.	CD69PE	100 µl pocillo 5 (SpA)
Tubo 8.	CD69PE	100 µl pocillo 6 (PMA+Ionomicina))
Tubo 9.	CD154PE	100 µl pocillo 1 (CN)
Tubo 10.	CD154PE	100 µl pocillo 6 (PMA+Ionomicina))

Tras incubar la sangre con solución lisante Ortho-mune™ Lysing Reagent (ver Apéndice), para eliminar los hematíes, durante 10 min en la oscuridad y a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con PBS, el botón resultante de cada tubo se resuspendió en un volumen final de 200µl de PBS y se analizaron mediante CF. Se analizó en paralelo un individuo control para cada prueba.

El cálculo de la respuesta específica de los linfocitos frente a los diferentes estímulos se obtuvo sustrayendo el porcentaje de células activadas del control negativo del porcentaje de células positivas para cada estímulo. El porcentaje de células positivas para CD69 y CD154 en la muestra del CN fue inferior al 10%, mientras que en la muestra del control del ensayo (PMA+ Ionomicina) fue superior al 80%.

3.5. Análisis de expresión de BTK (tirocin-quinasa de Bruton)

El método empleado en el presente trabajo para el análisis de la expresión de Btk fue evolucionando a lo largo del desarrollo del mismo. En el estudio de los primeros pacientes, se empleó el método descrito por Futatani T et al en 1998, cuya publicación coincidió con el inicio de este trabajo en el Servicio de Inmunología.

Se introdujeron una serie de modificaciones al método inicial, encaminadas principalmente a reducir, tanto el tiempo empleado, como el volumen de muestra necesario para su realización.

3.5.1. Detección de Btk mediante inmunofluorescencia indirecta (Fututani T et al. 1998)

Para su realización se precisa separar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradiente de densidad, por lo que se requieren 7 ml de sangre venosa periférica, anticoagulada con EDTA o heparina de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio y de los individuos control ensayados en paralelo. Para ello, las muestras se diluyen 1:2 en PBS en un tubo Falcon® de 50 ml. La separación de las PBMC se realizó en la misma mañana de la extracción mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, centrifugando a 1600xg durante 20 minutos a 18°C. La fase conteniendo la fracción de células mononucleares se recoge y se diluye con PBS hasta un volumen final de 50 ml, y se lava 2 veces con PBS, centrifugando a 1600xg durante 5 min, a 4°C. Tras el aislamiento de las PBMC, el botón celular se resuspende en 200 µl de PBS en un tubo de polipropileno de 12x75 mm.

La suspensión celular se incuba durante 20 min en la oscuridad y a temperatura ambiente con 10µl de un anticuerpo monoclonal frente al marcador de superficie de los monocitos CD14 conjugado con fluoresceína (CD14-FITC/Mouse IgG2ακ , BD. Ref 345784).

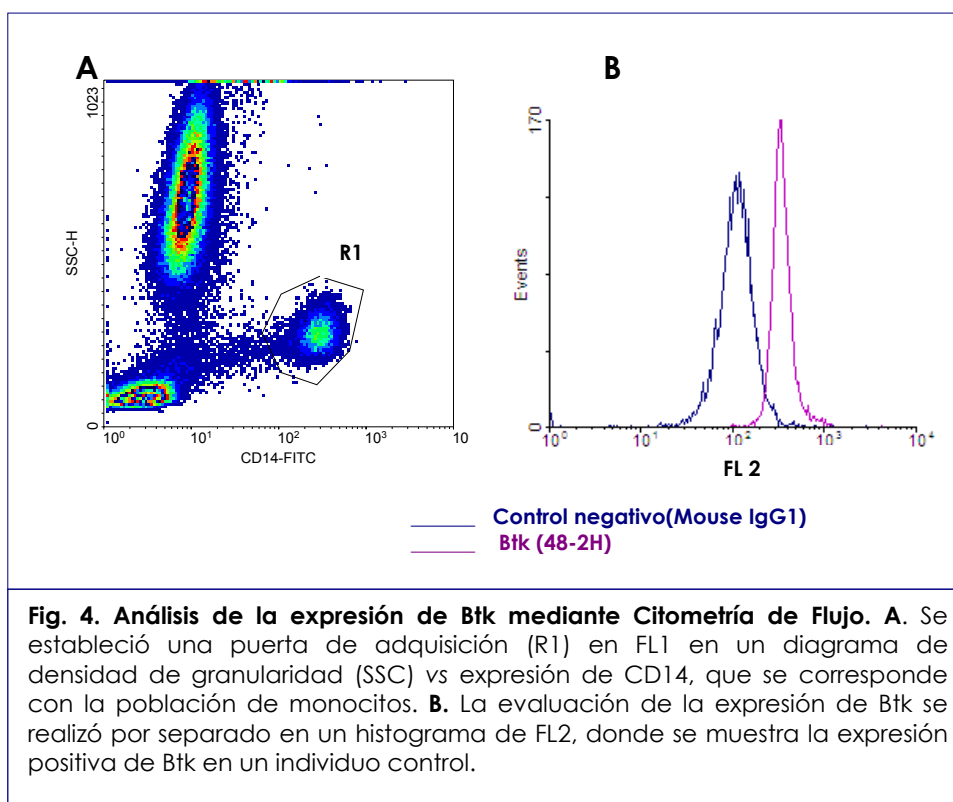
Posteriormente, se permeabilizan las PBMC con PBS con Triton x-100 al 1% durante 5 minutos y, tras dos lavados con PBS, se fijan con una solución de paraformaldehído al 4%. Tras realizar otra etapa de lavado, el botón celular resultante se resuspende en 400 µl de solución de lavado (PBS+BSA+Azida, ver Apéndice) y se divide en 2 alícuotas de 200 µl cada una. A la primera de ellas se añadieron 10 µl de un anticuerpo que no reconoce ninguna estructura en células humanas (AcMo Mouse IgG1 sin conjugar. Dako. Ref. X0931), siendo éste el control negativo del ensayo, mientras que a la segunda se añadió un AcMo Mouse IgG1 Anti-Btk (48-2H) sin conjugar cedido generosamente por el

Dr Toshio Miyawaki (Futatani T et al. 1998), incubándose la muestras durante 30 min a 4°C .

Tras lavar dos veces con la solución de lavado, se incubaron ambos tubos con 10µl de un conjugado frente a IgG1 murina (RAM-IgG1-PE. BD. Ref 340270) durante 30 minutos a 4°C y en la oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron 2 veces con solución de lavado y se resuspendieron en un volumen final de 200 µl de PBS para ser analizadas.

El análisis se realizó mediante citometría de flujo (FACSort, BD). Para seleccionar la población a estudiar se adquirieron un mínimo de 70.000 eventos y se estableció una puerta de adquisición en el canal de FL-1 en un diagrama de densidad de SSC vs CD14 para separar la población de monocitos. Se necesitan un número mínimo de 1.000 células para poder realizar el ensayo.

La evaluación de la expresión de Btk se realizó por separado en un histograma en el que se representa el número relativo de células en unidades arbitrarias vs FL-2. Para este propósito, a la muestra del control negativo se le superpone el histograma con la muestra del tubo 2 que contiene las células marcadas con el AcMo Anti-Btk (Fig. 4). En todas las determinaciones realizadas se incluyó una muestra de un individuo control.



3.5.2. Método modificado de Futatani T et al (1998) mediante inmunofluorescencia indirecta

La principal modificación introducida a este método fue en el material de partida. Se empleó sangre venosa periférica anticoagulada con EDTA o heparina sin necesidad de recurrir a la separación de células mediante gradiente de densidad, precisándose además para su realización un volumen muy reducido: 400 μ l.

Se separaron 2 alícuotas de 200 μ l de sangre periférica para cada ensayo en tubos de polipropileno de 12x75 mm. Las muestras se lisaron para eliminar los hematíes y se permeabilizaron, para permitir la tinción intracelular de Btk, con 4 ml de solución de trabajo (1x) de lisis (Facs Lysing solution BD) durante 20 min a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS-BSA-Azida, sobre el botón celular resultante se realizó una primera tinción con los AcMo Mouse IgG2 α κ CD14-FITC e IgG1 murina simultáneamente en el tubo 1, y con los AcMo Mouse IgG2 α κ CD14-FITC y AcMo Mouse IgG1 Anti-Btk (48-2H) en el tubo 2, incubándose las muestras durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras lavar con PBS-BSA-Azida, se realizó finalmente una segunda tinción con el conjugado RAM-IgG1-PE en ambos tubos durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Tras añadir solución de lavado y centrifugar, las muestras se resuspendieron en 200 μ l de PBS para ser analizadas en el citómetro.

Para el análisis de la expresión de Btk mediante CF se procedió de la misma manera que en el método original.

3.5.3. Detección de Btk mediante inmunofluorescencia directa

Como material de partida se emplearon 400 μ l de sangre venosa periférica anticoagulada con EDTA o heparina, de las que se separaron 2 alícuotas de 200 μ l de sangre periférica para cada ensayo en tubos de polipropileno de 12x75 mm. Las muestras se lisaron para eliminar los hematíes y se permeabilizaron para permitir la tinción intracelular de Btk con 4 ml de solución de trabajo (1x) de lisis (Facs lysing solution BD) durante 20 min a

temperatura ambiente. Tras lavar con PBS-BSA-Azida, sobre el botón resultante se realizó una primera y única tinción con el control de isotipos Mouse IgG2a conjugado con PE y el AcMo Mouse IgG2aκ CD14-FITC en el tubo 1 y con Mouse IgG2a Anti-Btk-PE (PE Mouse anti-Human BTK. BD Biosciences. Ref. 558527) y el AcMo Mouse IgG2aκ CD14-FITC en el tubo 2 durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras lavar con solución de lavado y centrifugar, las muestras se resuspendieron en 200 µl de PBS para ser analizadas en el citómetro. Para el análisis de la expresión de Btk mediante CF se procedió de la misma manera que en el método original.

3.6. Cuantificación de la actividad respiratoria oxidativa en granulocitos

La evaluación de la actividad respiratoria oxidativa se lleva a cabo por la exposición de los leucocitos a distintos estímulos como el activador de la protein-cinasa PMA, el péptido quimiotáctico N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP) y un preparado de bacterias (*E. coli*) opsonizadas. Se trata de evaluar la actividad del complejo NADPH-oxidasa. Las células estimuladas capaces de producir metabolitos derivados de la oxidación (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso) convertirán el sustrato fluorogénico dihidrorrodamina-123 en rodamina-123 (Rothe G et al. 1988). La evaluación de esta actividad biológica se realiza mediante citometría de flujo, el análisis determina el porcentaje de células que han producido radicales de oxígeno.

Para esta determinación se empleó el kit *BURSTTEST (PHAGOBURST*, Ref 341058, ORPEGEN Pharma, info@orpegen.com), distribuido en España por BD Biosciences (www.bdbiosciences.com), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para este estudio se necesitaron muestras de sangre heparinizada (heparina sódica o litio) que debe ser procesada dentro de las 24 horas siguientes a su extracción y debiendo permanecer a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FacSort BD) dentro de los primeros 30 min tras finalizar la prueba.

3.7. Cuantificación de anticuerpos específicos

La valoración de la capacidad de producción de anticuerpos específicos mediante la cuantificación *in vitro* de IgG e IgG2 específica frente a polisacárido capsular de neumococo e IgG específica frente a Haemophilus B humano y toxoide tetánico, se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío empleando un método de enzimoimmunoensayo (ELISA).

Para este estudio se necesitaron muestras de suero, y se emplearon los kits comerciales: Kit EIA BYNDAZYME anti-PCP IgG2 (Ref MK 013), Kit EIA BYNDAZYME anti-PCP IgG (Ref MK 012), Kit EIA BYNDAZYME anti-TT IgG (Ref MK 010) y Kit EIA BYNDAZYME anti-human Haemophilus influenzae B (Ref MK 016), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos ellos están fabricados por The Binding Site Ltd (www.bindingsite.co.uk) y son distribuidos en España por Radim Ibérica, S.A. (info@radim-iberica.es).

Los valores de referencia empleados, a título orientativo, fueron los recogidos en la tabla 4 (Schauer U et al. 2003).

3.8. Cuantificación de inmunoglobulinas, subclases de IgG y los distintos componentes del Complemento.

La cuantificación de Inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgE, así como las subclases de IgG y los distintos componentes del complemento se realizó en los laboratorios del Servicio de Análisis clínicos del Hospital Universitario Virgen del Rocío mediante nefelometría con el equipo BN®II (Dade Behring, Marburg, Germany). Los valores de referencia para las distintas edades están reflejadas en las tablas 5 y 6.

Tabla 4: Título medio de anticuerpos específicos frente a toxoide tetánico, Haemophilus influenzae tipo B, y polisacárido capsular de pneumococo en función de la edad. Tomada de Schauer U et al. 2003.

IgG type	Antibody titers (geometric means) and ranges with respect to age ^a							
	Mean antibody titer (range) at age:							
	0.5-1 yr (n = 35)	1-2 yr (n = 30)	2-3 yr (n = 33)	3-4 yr (n = 45)	4-8 yr (n = 83)	8-12 yr (n = 56)	12-18 yr (n = 31)	Adult (n = 73)
TT IgG (IU/ml)	0.44 (0.02-3.12)	0.69 (0.04-3.92)	1.20 (0.16-7.87)	0.98 (0.11-7.79)	0.80 (0.09-12.87)	1.65 (0.28-18.78)	2.30 (0.26-15.44)	1.24 (0.05-39.62)
TT IgG (mg/liter)	7.48 (0.34-53.0)	11.73 (0.68-66.6)	20.4 (2.72-133.8)	16.66 (1.87-132.4)	13.6 (1.53-218.8)	28.05 (4.76-319.3)	39.1 (4.42-262.5)	21.08 (0.85-673.5)
TT IgG1 (mg/liter)	6.6 (0.3-126.4)	17.1 (1.4-208.0)	12.9 (1.7-99.8)	11.5 (1.2-108.7)	14.3 (0.9-228.5)	29.2 (2.6-323.5)	29.8 (4.9-180.0)	13.2 (0.7-258.1)
Hib IgG (mg/liter)	0.84 (0.08-9.2)	2.54 (0.16-40.8)	3.06 (0.22-42.8)	2.05 (0.19-21.6)	2.08 (0.15-29.5)	2.48 (0.16-37.2)	1.90 (0.10-34.5)	1.32 (0.09-19.5)
PCP IgG (mg/liter)	9.2 (0.9-93.0)	4.6 (0.9-29.2)	12.3 (1.4-110.4)	14.6 (0.8-262.1)	45.5 (9.2-225.9)	59.5 (11.0-320.8)	65.9 (8.7-502.6)	43.8 (10.0-191.2)
PCP IgG2 (mg/liter)	7.6 (0.5-117.3)	6.5 (0.5-87.0)	13.1 (1.2-142.8)	11.7 (1.2-113.4)	9.7 (0.8-122.4)	11.6 (1.2-107.1)	11.4 (1.9-69.2)	20.5 (4.7-89.4)

^a The IgG concentrations for tetanus toxoid in mg/liter were calculated based on 1 IU/ml = 17 mg/liter. Values in parentheses represent normal ranges (3rd and 97th percentiles). TT, tetanus toxoid; Hib, *H. influenzae* capsule polysaccharide; PCP, pneumococcus capsule polysaccharide; n, number of sera.

Tablas 5 y 6 . Valores normales para la edad de las diferentes clases y subclases de Igs. Tomados de Conley ME et al. 1996.

EDAD	IgG mg/dl	+/-	IgM mg/dl	+/-	IgA mg/dl	+/-
RECIÉN NACIDO	1031	200	11	5	1	2
1-3 MESES	430	119	30	11	11	7
4-6 MESES	427	186	43	17	14	9
7-12 MESES	661	219	54	23	19	9
13-24 MESES	762	209	58	23	25	12
25-36 MESES	892	183	61	19	36	19
3-5 AÑOS	929	228	56	18	47	14
6-8 AÑOS	923	256	65	25	62	23
9-11 AÑOS	1124	235	79	33	66	30
12-16 AÑOS	945	124	59	20	74	32
ADULTO	1158	305	99	27	100	31

VALORES DE REFERENCIA DE IgE TOTAL (mg/dl)

Recién nacido: <1.5
 Hasta 1 año: <15
 De 1 a 5 años: <60
 De 6-9 años: <90
 De 10-15 años: <200
 Adulto: <100

EDAD	IgG1 (mg/L)	IgG2 (mg/L)	IgG3 (mg/L)	IgG4 (mg/L)
0-1 MESES	2400-10600	870-4100	140-550	40-560
1-4 MESES	1800-6700	380-2100	140-700	<30-360
4-6 MESES	1800-7000	340-2100	150-800	<30-230
6-12 MESES	2000-7700	340-2300	150-970	<30-430
1-1.5 AÑOS	2500-8200	380-2400	150-1070	<30-620
1.5-2 AÑOS	2900-8500	450-2600	150-1130	<30-790
2-3 AÑOS	3200-9000	520-2800	140-1200	<30-1060
3-4 AÑOS	3500-9400	630-3000	130-1260	<30-1270
4-6 AÑOS	3700-11000	720-3400	130-1330	<30-1580
6-9 AÑOS	4000-10800	850-4100	130-1420	<30-1890
9-12 AÑOS	4000-11500	980-4800	150-1490	<30-2100
12-18 AÑOS	3700-12800	1060-6100	180-1630	<40-2300
ADULTO	4900-11400	1500-6400	200-1100	<80-1400

3.9. Cuantificación de isohemaglutininas

Las isohemaglutininas son anticuerpos de clase IgM presentes, de forma natural, en el suero y dirigidos contra antígenos de grupo sanguíneo. Su cuantificación es una prueba que ayuda al diagnóstico de un defecto de anticuerpos. Títulos bajos son comunes tanto en agammaglobulinemia como en IDVC; por lo que son útiles, pero no determinantes. Aunque hay que tener en cuenta que en IDCV con niveles normales de IgM, las isohemaglutininas pueden ser normales, mientras que no suele ser así en una agammaglobulinemia.

La cuantificación se realizó mediante hemaglutinación en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

3.10. Métodos de estudio de la actividad del complemento

Las pruebas de laboratorio para determinar la actividad funcional de la vía clásica del complemento (CH50) se basan en la formación de un complejo hemolítico al añadir anticuerpos que reaccionan con antígenos de superficie en eritrocitos de carnero. Cuando se activa el complemento por los anticuerpos fijados por los antígenos en la superficie celular, esta célula se lisa y se libera la hemoglobina. Como la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM) requiere la acción secuencial de los 9 componentes de las vías clásica (C1, C2 y C4) y terminal (C3, C5, C6, C7, C8 y C9), se puede calcular la cantidad de complemento activo titulando la fuente (suero en la mayoría de los casos) de forma que sólo se lise una porción de las células presentes. Los resultados se expresan como el recíproco de la dilución del suero que causó la lisis del 50% de las células del ensayo. El CH50 es el mejor ensayo para detectar alteraciones en la vía clásica del complemento, ya que cuando se detecta una actividad nula o reducida implica que, al menos uno de los componentes necesarios, está ausente o en concentraciones bajas (Wen L et al. 2004).

3.11. ESTUDIOS GENÉTICOS

3.11.1. Extracción de DNA

Como material de partida se utilizó sangre periférica fresca o conservada a -20°C , obtenida por venopunción en tubos estériles con EDTA como anticoagulante.

Extracción de DNA genómico a partir de sangre total:

- Se dispensan 100 μl de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5ml previamente esterilizado en autoclave y se añade 1ml de tampón TE (ver Apéndice). Se mezcla con vórtex y se centrifuga a 13.000xg durante 10s.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en 1ml de tampón TE, centrifugando a continuación durante 10s a 13.000xg.
- Se repite esta operación hasta eliminar cualquier resto de hemoglobina, ya que el grupo hemo inhibe la PCR. Normalmente es suficiente con hacerlo dos veces más. El precipitado obtenido puede ser almacenado a -80°C hasta su uso.
- Se resuspende el botón celular en 200 μl de tampón K (proteinasa K, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en 200 μl de un tampón tris 20mM pH 8 que contiene 0-5% de tween-20) y se incuba 45 min en un baño termostático a 56°C para digerir las proteínas.
- Se incuba 10min a 95°C para inactivar la proteinasas K. Se centrifuga durante 5 min a 13.000xg para eliminar los restos celulares no digeridos.

El DNA así obtenido está preparado para su amplificación mediante PCR y puede conservarse a -20°C durante varios años.

Otras muestras se extrajeron mediante cromatografía para obtener mayor concentración de DNA y con mayor pureza. Para ello, partimos de un volumen de 200 μl de sangre y se empleó el kit comercial QiAamp (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.11.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de sangre total empleando el kit comercial QIAmp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Como material de partida se utilizó sangre periférica fresca obtenida por venopunción en tubos estériles con EDTA como anticoagulante.

El método se basa en la lisis de la muestra en condiciones altamente desnaturizantes para inactivar las RNasas y posterior adsorción específica del material previamente purificado en membranas de sílica-gel.

El RNA así obtenido está preparado para ser empleado como molde para la síntesis de cDNA, debiendo conservarse a -80°C.

3.11.3. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA a partir del mRNA obtenido en el apartado anterior se utilizó el kit Super Script™ First Strand Syntesis System for RT-PCR (Invitrogen, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de un cebador específico se elabora una copia de cDNA, utilizando como molde el mRNA. Una vez obtenido el híbrido, se añade RNasa-H para degradar el RNA, quedando la cadena sencilla de cDNA.

Este cDNA obtenido está preparado para su amplificación mediante PCR y puede conservarse a -20°C durante varios años.

3.11.4. Análisis molecular del gen BTK

Se describen, a continuación, los parámetros empleados para la amplificación del gen BTK. Las amplificaciones de los distintos fragmentos de DNA se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2400.

3.11.4.1. Diseño de los cebadores

Para la amplificación de los 19 exones del gen que codifica la proteína *Btk* se emplearon 19 parejas de cebadores (o "primers"). En la tabla 7 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados. Los cebadores resaltados en negrita fueron descritos previamente por Vorechovsky y col. (1998). El resto fueron diseñados específicamente para este trabajo. En su diseño se tuvo en cuenta que el producto de PCR incluyera, además de la secuencia codificante del exón correspondiente, aproximadamente 50 pb de la región intrónica en los sentidos 3' y 5'.

También se tuvo en cuenta que la temperatura de hibridación fuera muy similar entre todos los cebadores diseñados, con objeto de utilizar las mismas condiciones de PCR y disminuir al máximo el tiempo requerido para amplificar todo el gen. La temperatura de hibridación se calculó según la siguiente fórmula:

Temperatura de hibridación = Temperatura de fusión -5°C . Siendo la temperatura de fusión la siguiente: Temperatura de fusión = $2x (A+T) + 4x (C+G)$.

Todos ellos fueron sintetizados por Invitrogen.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen BTK.

EXÓN	CEBADOR	TAMAÑO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO (pb)
1	1F 5' ACGGCAGCAGGGAACCAG3' 1R 5'TTGGAGGGATACACAGATTCA3'	341
2	2F 5' ATTAATGTCCTGGGTCCTCAG 3' 2R 5'CCTTGATATCTGAAACTCAG3'	254
3	3F 5'CCATTTCTTCCTCATTCTAC3' 3R 5'GCATCACCAGTCTATTACAG3'	215
4	4F 5'GAGCAATGCATCAACCAATAACC3' 4R 5'TTACAGGGGCCTTTCGAGATTG3'	156
5	5F 5'GCTGAAGTCTGTGTTTCATCG3' 5R 5'CCTTCCTTCTTTCTTTGG3'	157
6	6F ¹ 5'TCTTCCTCCATGTCAGATGTG3' 6R 5'GTGATGGAAACAGTCAAAGG3'	226
7	7F 5'CACTGGCTTCTGTTTTGC3' 7R ¹ 5'AGCACCCAGTTCCCTGTAT3'	110
8	8F 5'CCTACCTTTTCTCCTAACTAC3' 8R 5'CCCATTTTATCTCGTGCTC3'	211
18	18F ² 5'GCACGCTGGGAAGTACTTGG3' 9R ² 5'CCTGGAAGATTGTGGACTGAC3'	379
9	9F 5'AGGTGCTGGATGAACTGC3' 9R 5'CCTGGAAGATTGTGGACTG3'	134
10	10F 5'ATGACCAGGAGCCACTCAAG3' 10R 5'TGCAAGGAGAATGCTGTGTG3'	131
11	11F 5'GACAGCTTCTTTTCGTTG3' 11R 5'CCTTGGAATAGTACGACTC3'	126
12	12F 5'GACCTTTGTGCCAAGTTAC3' 12R 5'CTTCTCAGTTGCCCTGGT3'	196
13	13F 5'GAGGCTTTAAGTGAGGATGTGTG3' 13R 5'CTACCCCAGAGAAATAAGGAG3'	175
14	14F 5'CCCAAAGAATCACACCAAGAC3' 14R 5'CCAGCAAATAGATTGAGAGTTG3'	240
15	15F 5'TAGTTCCTTGCCCTTCCTG' 15R 5'CTAGGCCAATCCTTCTAAG3'	265
16	16F 5'GTCTCACTGGTCTCTGTTTGC3' 16R 5'GGGAAAGATGAAAAAGCCACAC3'	119
17	17F 5'CAAGCCTCCAAATCCTAATG3' 17R 5'GGAAGAATGAAAGCAAGAAC3'	274
18	18F 5'ACCCCTGCTATCCAAAAAGAC3' 18R 5'TGGGCAAGTAGATTCAAG3'	265
19	19F5'CTAGCCACTCTAACACTTTAC3' 19R5'AAGCTTGGGATTCCTCTG3'	172

^{1,2} Pareja de cebadores empleados para amplificar el intrón 6 y el intrón 8 del gen BTK, respectivamente..

3.11.4.2. Amplificación del gen BTK

A continuación, se detallan los reactivos y parámetros utilizados para la amplificación.

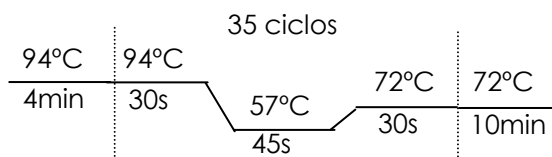
Reactivos	Concentración final
DNA	10ng/ μ l
Tampón PCR*	1x
Cebadores	0.5 μ M
dNTPs	300 μ M
Taq polimerasa (Amersham Biosciences)	0.01U/ μ l

*Ver Apéndice

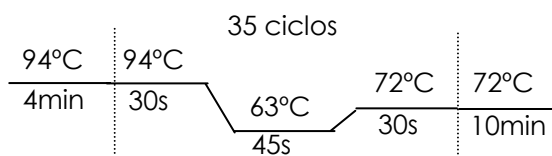
Las reacciones se prepararon con ddH₂O esterilizada en autoclave, en un volumen final de 30 μ l.

Las amplificaciones de los distintos exones del gen se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2400.

Parámetros de PCR



Para el exón 1 las condiciones fueron diferentes



3.11.4.3. Amplificación de cDNA de BTK

Los cebadores utilizados habían sido descritos previamente (Kristufek D, 2006) y fueron sintetizados por Invitrogen (Tabla 8):

Tabla. 8. Cebadores empleados para amplificar el cDNA de BTK

Cebadores	Tamaño del fragmento amplificado(pb)
F5'CCTTCCTCTCTGGCTGTAA3' R3'CCTCCCATCTTTATGACACCA3'	2.621

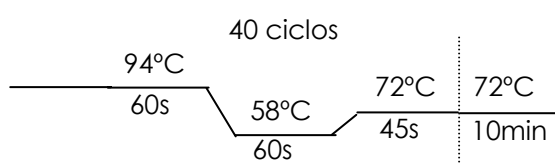
Se emplearon las siguientes condiciones para amplificar el cDNA de BTK:

Reactivos	Concentración final
cDNA	10ng/ μ l
Tampón PCR*	1x
Cebadores	0.5 μ M
dNTPs	300 μ M
Taq polimerasa (Amersham Biosciences)	0.01U/ μ l

*Ver Apéndice

El volumen final de la reacción se ajustó con ddH₂O a 30 μ l.

Parámetros de PCR



Como control positivo de la prueba se amplificó en paralelo, y con las mismas condiciones empleadas para amplificar el cDNA de BTK, un fragmento del gen ABL, localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34), que se expresa de forma constitutiva. Para ello, se emplearon una pareja de

cebadores ya descritos en la literatura (van Dongen JJM et al. 1999). El fragmento amplificado, de 210 pb, se corresponde con la secuencia de cDNA incluida entre el exón 2 y 3 del gen ABL (Fig. 5)

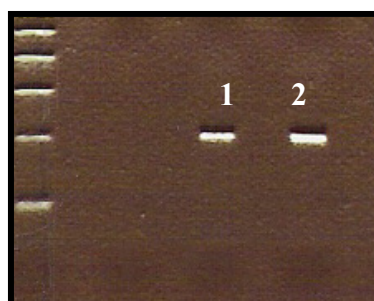


Fig. 5. Amplificación de cDNA del gen ABL como control positivo en dos individuos control

3.11.4.4. Visualización de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis submarina en gel de agarosa en tampón TBE 0.5x. La concentración de agarosa depende del tamaño del fragmento de DNA; para fragmentos inferiores a 200pb se utilizó agarosa al 3-4% y para el resto al 2%.

Para ello, se disuelve la cantidad deseada de agarosa en TBE 0.5x y se calienta hasta su disolución total en un horno microondas. Se deja enfriar ligeramente y se añade bromuro de etidio a una concentración final de 0.5µg/ml. Posteriormente, se vierte sobre un molde previamente sellado y se deja enfriar hasta que se solidifique.

Se mezclan 4µl del producto de PCR con 1µl de tampón de carga 5x (ver Apéndice) y se dispensan en los pocillos del gel sumergido en TBE 0.5x. Se reserva un pocillo para el marcador de peso molecular (Escalera de 100pb, Amersham Biosciences). El gel se somete a electroforesis en tampón TBE 0.5x a 200V durante 15min. A continuación, se visualizan las bandas con un transiluminador de luz ultravioleta.

Una vez que un fragmento de DNA amplificado ha sido sometido a electroforesis en un gel de agarosa, también es posible recuperar este fragmento, purificarlo y prepararlo para su reamplificación y posterior secuenciación. Para ello, se cortó la banda de interés con un bisturí bajo la luz

ultravioleta del transiluminador. Posteriormente, se introdujo el fragmento de gel en una punta de pipeta con algodón y a su vez ésta se introdujo en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml y se congeló a -80°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a $13.000\times g$ durante 1 minuto para recuperar el DNA contenido en el fragmento de gel. Posteriormente, se preparó la muestra para secuenciación, teniendo en cuenta el aumento de volumen final.

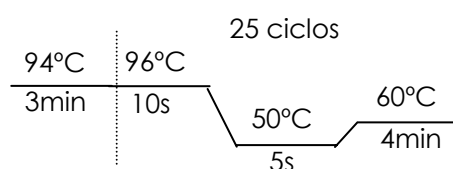
3.11.5. Secuenciación

3.11.5.1. Secuenciador automático ABI Prism 310 (Perkin-Elmer)

Los productos de PCR se purificaron mediante columnas de sephacryl S-400 y se reamplificaron utilizando el "ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems®, USA) bajo las siguientes condiciones:

Reactivos	Cantidad
DNA	5 μl del producto de PCR
"Terminator Ready Reaction Mix"	4 μl
Cebadores (3 μM)	1 μl

El proceso de reamplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2400 en las siguientes condiciones:



Los productos se purificaron mediante precipitación con MgCl_2 /etanol (ver Apéndice) para retirar el exceso de nucleótidos marcados. Cada precipitado se resuspende en 12.5 μl de "Template Supression Reagent" y se calienta a 95°C durante 3 min para su desnaturalización. La secuenciación,

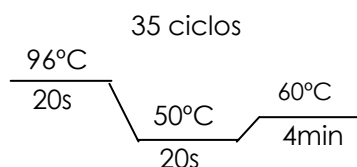
mediante electroforesis capilar, se llevó a cabo en el equipo ABI Prism® 310 Genetic Analyzer siguiendo las instrucciones del manual del fabricante, disponible en la página web: <http://www3.appliedbiosystems.com/index.htm>.

3.11.5.2. Secuenciador automático CEQ™ 8000 (Beckman-Coulter)

Tras purificar el producto de la PCR del modo descrito anteriormente, se reamplifica utilizando el “CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit” (Beckman Coulter, USA), bajo las siguientes condiciones:

Reactivos	Cantidad
DNA	1 μl del producto de PCR
“DTCS Quick Start Master Mix”	4 μl
Cebadores (3 μM)	1 μl
ddH ₂ O	4 μl

El proceso de reamplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2400 en las siguientes condiciones:



Tras la amplificación se lleva a cabo una precipitación con etanol:

- Se añaden a cada tubo 10 μl de ddH₂O y 4 μl de solución de parada (mezclar en el momento 2 μl de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2 μl de EDTA-Na₂ pH 8.0)
- Se añaden cada tubo 60 μl de etanol/ddH₂O 95% (v/v), previamente enfriado a -20°C, mezclar y se centrifuga a 14.000 rpm a 4°C durante 15min, retirando el sobrenadante.
- Se lava 2 veces con 200 μl de etanol/ddH₂O 70% (v/v) previamente enfriado a -20°C. Centrifugar a 14.000 rpm 5min a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Secar.

- Las muestras se resuspenden en 40µl de tampón de carga (Sample Loading Solution).

La secuenciación mediante electroforesis capilar se llevó a cabo en el equipo CEQ 8000 siguiendo el manual de instrucciones del fabricante, disponible en la página web: www.beckman.com/products.

El análisis de las secuencias se realizó comparando los resultados de las secuencias obtenidas con la secuencia del gen BTK disponibles en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI Reference Sequence: NM_000061.2 y EMBL: HSU78027).

3.11.6. Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Una vez identificadas las mutaciones responsables en los casos índice, se extendió el estudio a los familiares de los pacientes que manifestaron su deseo de descartar o confirmar la presencia de la mutación o el estado de portadora. Para ello, se diseñó una estrategia individualizada para cada mutación basada en un análisis mediante PCR-RFLP. Este método consiste en la amplificación por PCR y posterior digestión con enzimas de restricción de la zona de DNA deseada, donde el patrón de tamaños de los fragmentos de restricción difiere entre la secuencia normal y la mutada. Esta técnica se ha empleado para confirmar el patrón heterocigoto en las posibles portadoras, así como para detectar mutaciones en los familiares de los casos índice. En su diseño se emplearon los programas de análisis "DNA Strider™ 1.1" y "NEB Cutter®". Ambos programas están disponibles en las páginas Web: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> y <http://www.dnastar.com/products/lasergene.php>, respectivamente.

3.11.6.1. Análisis mediante PCR-RFLP del exón 1 con la enzima de restricción Ddel

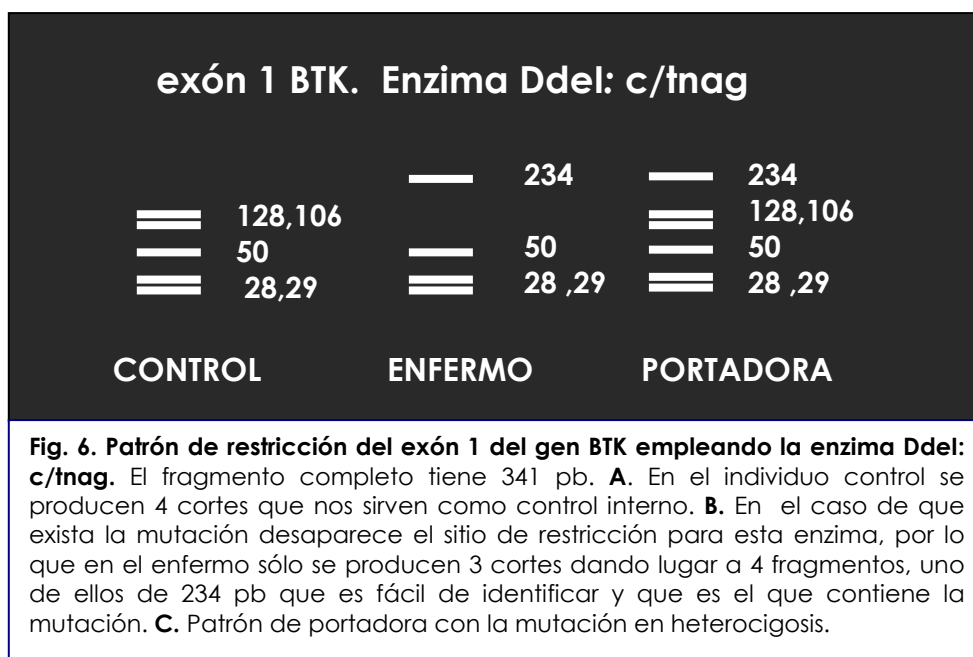
Se amplificó el exón 1 del gen BTK (341 pb) con los cebadores que aparecen en la tabla 7 para, a continuación, digerirse 5µl del fragmento amplificado con la enzima de restricción Ddel (New England Biolabs, USA).

Reactivos	Concentración final
DNA	Dilución 1:6 del producto de PCR
Tampón NEB4*	1x
Enzima Ddel	4U

(Ver Apéndice)

El volumen final de las reacciones fue de 30µl, y fue ajustado con ddH₂O esterilizada en autoclave. La mezcla se incubó durante 1h a 37°C y posteriormente se sometió a electroforesis submarina en un gel de agarosa al 3% en TBE 0.5x (Ver Apéndice).

La enzima sólo digierá el fragmento amplificado si presenta una G en la posición 35420 del DNA, dando lugar a los patrones de restricción descritos en la Fig. 6.



3.11.6.2. Análisis mediante PCR-RFLP del exón 18 con la enzima de restricción NlaIII

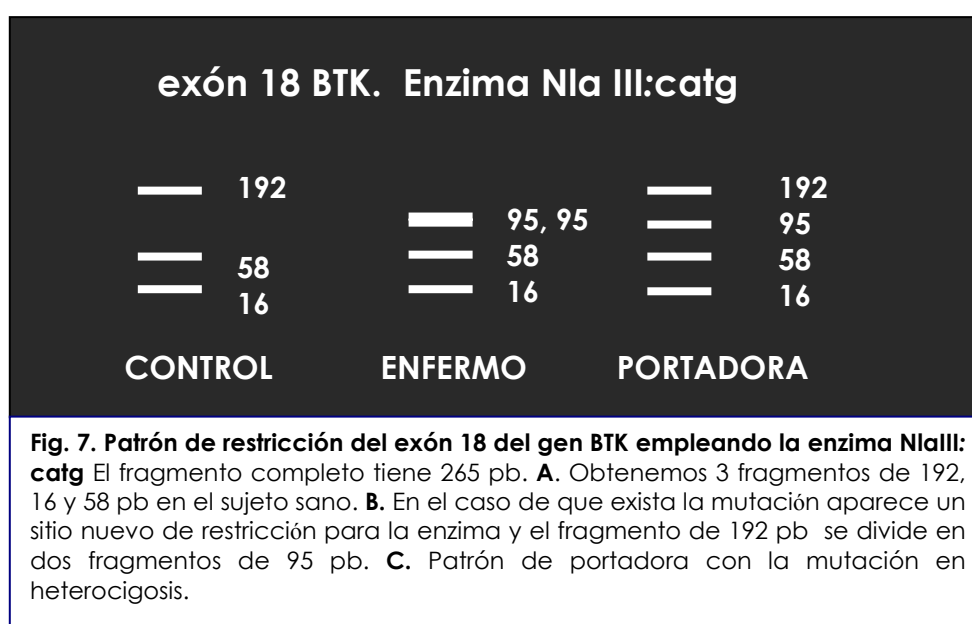
Se amplificó el exón 18 del gen BTK (265 pb) con los cebadores que aparecen en la tabla 7 y, a continuación, 5µl del fragmento amplificado se digirieron con la enzima de restricción NlaIII (New England Biolabs, USA).

Reactivos	Concentración final
DNA	Dilución 1:6 del producto de PCR
Tampón NEB4*	1X
Enzima NlaIII	6U

(Ver Apéndice)

Las reacciones se prepararon con ddH₂O esterilizada en autoclave, en un volumen final de 30µl. La mezcla se incubó durante 1h a 37°C, posteriormente se sometió a electroforesis submarina en un gel de agarosa al 3% en TBE 0.5x (Ver Apéndice).

El fragmento amplificado contiene una zona de corte para la enzima de restricción que nos sirve como control interno indicador de que la digestión ha funcionado correctamente, dando lugar a los patrones de restricción descritos en la Fig. 7:



4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos clínicos y analíticos de los pacientes se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows. Versión 14.0. Un valor de p inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Para calcular la incidencia y la prevalencia del síndrome de Bruton en nuestra población se consultaron los datos correspondientes al número de habitantes y de nacidos vivos en la provincia de Sevilla, teniendo en cuenta el periodo comprendido entre el nacimiento del primer y del último paciente diagnosticado y excluyendo a los pacientes que no hubieran nacido en la provincia. Estos datos están disponibles en las páginas Web del Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es>) y del Instituto Andaluz de Estadística (<http://www.juntadeandalucia.es:9002/mapa>).

5. APÉNDICE

Soluciones y reactivos:

-Bromuro de etidio 10mg/ml

Disolver 100mg de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA) en un volumen final de 10ml de ddH₂O. Se almacena a temperatura ambiente protegido de la luz.

-EDTA 0.5M pH 8.0

Disolver 93g de EDTA (Sigma-Aldrich) y 10g de NaOH en 400ml de ddH₂O. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10N. Ajustar a 500ml con ddH₂O. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

-Marcador de peso molecular (Escala de 100pb)

Preparar a una concentración final de 0.1 µg/µl. Mezclar 100 µl del marcador, 700 µl de TE y 200 µl de tampón de carga 5x. Almacenar a 4°C.

-Mezcla para PCR

Mezclar 35.7 µl de tampón de PCR, 20 µl de glicerol 87%, 2.9 µl de dNTPs 2.5mM, 3.6 µl de rojo cresol y 95 µl de ddH₂O.

-MgCl₂ 1M

Disolver 203.3g de MgCl₂ en 1l de ddH₂O. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

-NaOH 10N

Disolver 200g de NaOH en un volumen final de 500ml de ddH₂O esterilizada en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

-Proteínasa K

Disolver 49.5mg de proteínasa K (Sigma-Aldrich) en 1.5ml de ddH₂O estéril. Almacenar a -20°C.

-Precipitación con MgCl₂/Etanol

Añadir 9.5µl de MgCl₂ 2mM y 27.5µl de etanol por cada 10µl de PCR. Incubar 10-15 min a T^a amb. Centrifugar 20 min a 14000 rpm. Lavar con 250µl de etanol al 75% (v/v en ddH₂O). Centrifugar 10 min a 14000 rpm. Secar durante 10 min a T^a amb.

-Tampón de carga

Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0.25% (p/v), xilenocianol (Sigma-Aldrich) al 0.25% (p/v) y glicerol (Merck, Darmstadt, Alemania) al 30% (v/v) en ddH₂O. Conservar a 4°C.

-Tampón L 10x

Tris-HCl 100mM (pH 7.5), MgCl₂ 100mM, Ditiotreitól 10mM. Conservar a -20°C.

-Tampón H 10x

Tris-HCl 100mM (pH 7.5), MgCl₂ 100mM, Ditiotreitól 10mM, KCl 1M. Conservar a -20°C.

-Tampón NEB4

Acetato potásico 50mM, Tris-acetato 20mM, Acetato magnésico 10mM, Ditiotreitól 1mM, (pH 7.9). Conservar a T^a ambiente.

-Tampón para PCR 10x

KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, Tris-HCl 10mM, pH 8.3. Suministrado junto a la Taq polimerasa. Almacenar a -20°C.

-Tampón REact[®]3

50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl. Conservar a 4°C o a -20°C.

-Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X

Trizma base 89mM, H₃BO₃ 89mM, EDTA 2mM, pH 8.0.

-Tampón TE

Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM, pH 8.0.

RESULTADOS

En el periodo comprendido entre enero de 1999 y mayo de 2008 se realizaron 1612 estudios de inmunodeficiencia a 1243 pacientes remitidos, desde los diferentes centros, al Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla por sospecha de inmunodeficiencia. De ellos, 369 fueron segundos estudios. En 362, de los 1243 pacientes, no se encontraron alteraciones del sistema inmunitario, en 183 se hallaron defectos leves del sistema inmunitario o de su función y 101 presentaban defectos combinados de difícil filiación. Finalmente, se encontraron alteraciones inmunitarias en 597 pacientes que se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Alteraciones inmunitarias encontrados en los pacientes estudiados en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla	
Alteraciones encontradas (Pacientes n=597)	%
Inmunodeficiencias combinadas T y B	0,83
Defectos predominantemente de células T	5,52
Deficiencias predominantemente de anticuerpos (n=421)	70,5%
Hipogammaglobulinemia: (12,1%)	8,54
Síndrome de Bruton: (2,37%)	1,67
Portadoras de síndrome de Bruton: (2,37%)	1,67
Disminución del número de células B: (2,13%)	1,5
Ausencia de expresión de CD19:(0,23%) (pendiente de confirmar)	0,16
Déficit de BAFFR (CD268):(0,23%)	0,16
Deficiencias de Subclases de IgG (IgG1,IgG2,IgG3,IgG4), únicas o combinadas): (7,8%)	5,52
Inmunodeficiencia Variable Común: (13,7%)	9,7
Déficit de IgA: (22,5%)	15,9
Disminución anticuerpos específicos (HiB, PCP y/o TT): (36,3%)	25,6
Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos	4,18
Deficiencias del sistema del complemento	8,37
Defectos congénitos de número, función o ambos del sistema fagocítico	4,85
Defectos de la inmunidad innata	1,17
Inmunodeficiencias asociadas a otros trastornos congénitos o hereditarios	1,84
Trastornos autoinflamatorios	1,5
Enfermedades con disregulación inmunológica	0,16
Inmunodeficiencias primarias sin catalogar	0,83

Así pues, los defectos encontrados con mayor frecuencia fueron las deficiencias predominantemente de anticuerpos (70,5%) y, dentro de este grupo, las alteraciones en los niveles y/o en la producción de anticuerpos IgG e IgG2 específica frente a polisacárido capsular de neumococo e IgG específica frente a Haemophilus B humano y toxoide tetánico (36,3%), seguido de déficits de IgA (22,5%), IDVC (13,7%) y de hipogammaglobulinemia (12,1%).

1. ESTUDIO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE BRUTON

Se han detectado un total de 10 casos de deficiencia de Btk, que suponen el 1,67% del total de los síndromes de Inmunodeficiencia Primaria y el 2,37% de los defectos de anticuerpos diagnosticados en el Servicio de Inmunología. El estudio se ha ampliado a los familiares de 8 de ellos. A continuación, se detallan los resultados obtenidos, agrupados por familias, excepto en un caso en el que no se pudo ampliar el estudio, que se analiza individualmente. En la tabla 2 se resume la nomenclatura empleada.

Tabla 2. Resumen de casos de enfermedad de Bruton caracterizados en este estudio y nomenclatura empleada

FAMILIA	PACIENTES
A	A.1
B	B.1 B.2 B.3
C	C.1
D	D.1
E	E.1
F	F.1 F.2 F.3

1.1 FAMILIA A

1.1.1. Resumen del caso índice. Paciente A.1.

Se trataba de un paciente varón de 3 años en el momento del estudio. Desde los 4 meses de vida había presentado infecciones de repetición graves por neumococo, tales como neumonía y otitis supurada que le ocasionó una otorrea crónica, así como miocarditis al año de vida. A los 18 meses de vida se estudió en la consulta donde se constató una disminución de los niveles séricos de todas las inmunoglobulinas. El diagnóstico de sospecha inicial fue de una inmunodeficiencia por déficit de anticuerpos, probablemente un Síndrome de Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC), iniciándose tratamiento con gammaglobulina intravenosa (IgIV) a una dosis de 400 mg/kg. Entre sus antecedentes familiares constaban un tío materno fallecido a edad temprana por causas no bien definidas, al parecer por "procesos respiratorias y alteraciones crónicas de la sangre" que hacían pensar que pudiera tratarse de una inmunodeficiencia.

Teniendo en cuenta los antecedentes familiares, con tres años de edad, se remitió al Servicio de Inmunología con sospecha de Síndrome de Bruton.

1.1.1.1. Resultados. Paciente A.1.

El estudio inicial reveló los siguientes hallazgos (tablas 3 y 4):

Tabla 3: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente A.1.

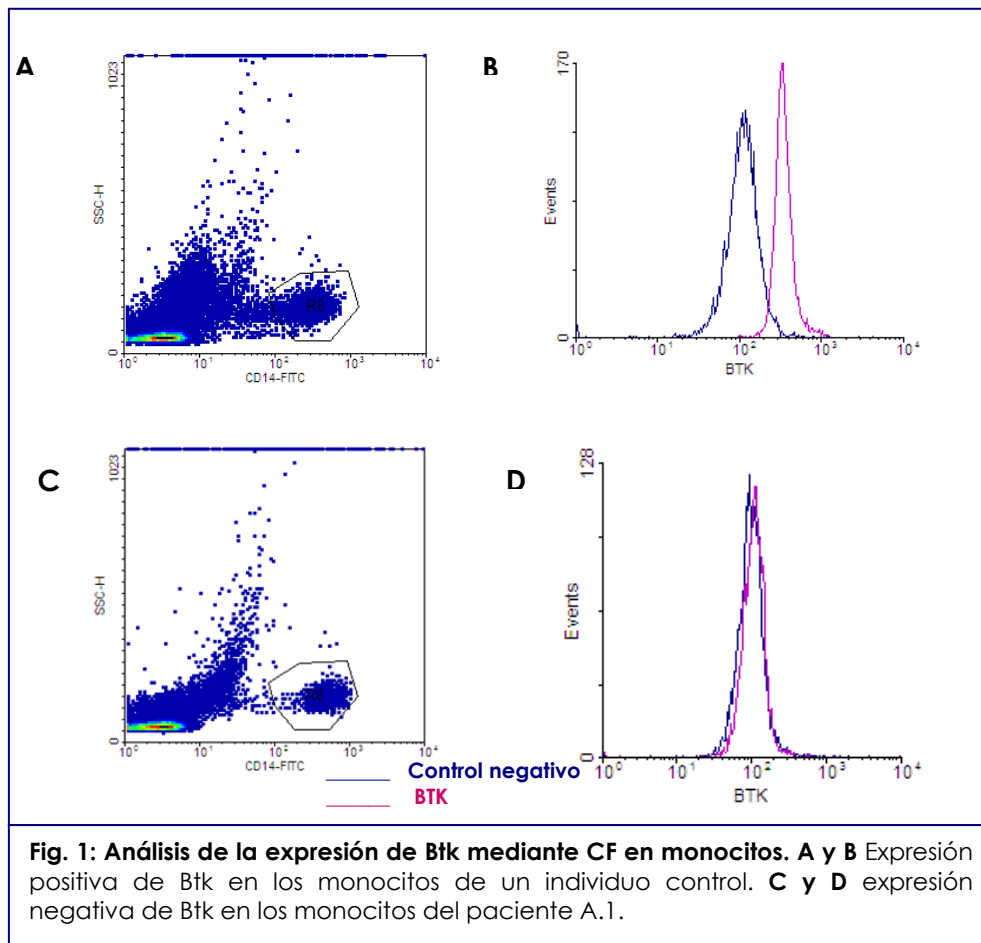
Linfocitos (2.320 cels/μl)	cels/μl	%
LT CD3+:	2134	92%
LT CD4+:	1670	72%
LT CD8+:	533	23%
Linfocitos B		%
LB CD19+:	0	0 %
LB CD20+:	23	1 %
LB CD24+:	23	1 %
LB CD22+:	0	0%
Células NK(CD3-/(CD16+56)+:	232	10%

Tabla 4: Niveles séricos de Igs en el paciente A.1.

Isotipo de Ig	mg/dl (Inicio síntomas)	mg/dl (Diagnóstico)
IgG:	110	980*
IgM:	<15	<22
IgA:	<10	<16
IgE:	<19.1	ND

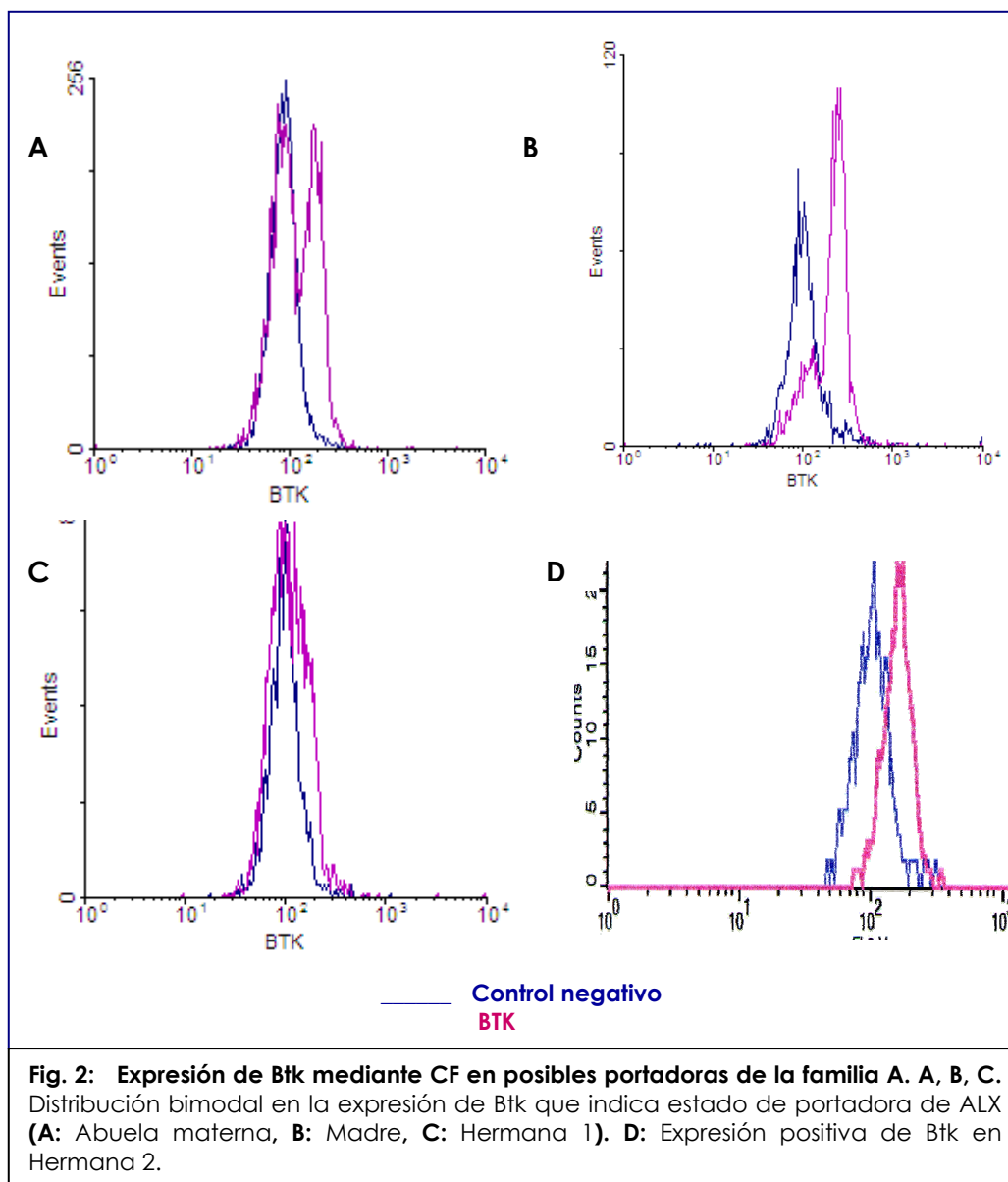
* Paciente en tratamiento con IgIV

Así pues, tenía cifras normales de linfocitos T y células NK, así como ausencia de linfocitos B, para cuyo estudio se emplearon varios marcadores de linfocitos B, acompañado de niveles casi inapreciables de inmunoglobulinas. El estudio analítico reveló, además, niveles de factores del complemento normales, así como de la actividad hemolítica de la vía clásica del complemento (CH50). La expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos fue normal, así como la expresión de CD40L (CD154) tras estimulación con ésteres de forbol e ionomicina (PMA + IO). La capacidad oxidativa de granulocitos era también normal. Se realizó entonces el análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo, observándose una ausencia de expresión de dicha proteína (Fig. 1).

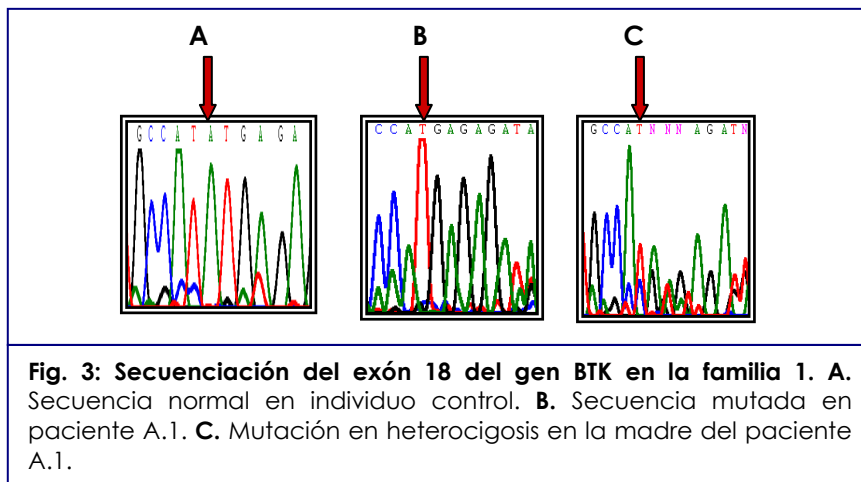


1.1.2. Estudio de Portadoras. Familia A

Se procedió al análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo de las posibles portadoras en la familia, detectándose el estado de portadora en la abuela, la madre y una de las hermanas del paciente (hermana 1), al observarse un patrón de expresión bimodal. En la otra hermana (hermana 2) se observó un patrón normal de expresión de Btk (Fig. 2).



Al proceder a la secuenciación del gen en el caso índice, se encontró una mutación no descrita previamente en la posición 598 del cDNA (exón 18), una delección de 2 pares de bases (AT). El cambio provocaba la aparición de un codón de parada (Y598X) que daría lugar a una proteína de un 87% de su tamaño normal en caso de ser secretada. El estudio familiar demostró que la madre del paciente portaba un alelo con la misma mutación (Figs. 3 y 4).



Exón 18	68165delAT/68166delTA/68167delAT	Y598X
Secuencia silvestre		
GGG AAG ATG CCA TAT G.....		
G K M P Y E.....		
Secuencia mutada		
GGG AAG ATG CCA TGA		
G K M P X		
Fig. 4. Representación esquemática de la mutación encontrada en el exón 18.		

Se diseñó un método basado en PCR-RFLP, descrito con detalle en el apartado Pacientes, Material y Métodos, para analizar la mutación hallada en el exón 18 en el resto de las posibles portadoras de la familia. Se confirmó que la abuela materna y la hermana 1 eran heterocigotas para dicha mutación, mientras que la hermana 2 no la presentaba, confirmando, así, el patrón de expresión de Btk observado mediante citometría de flujo y demostrando el estado de no portadora de la hermana 2 (Figs. 5 y 6).

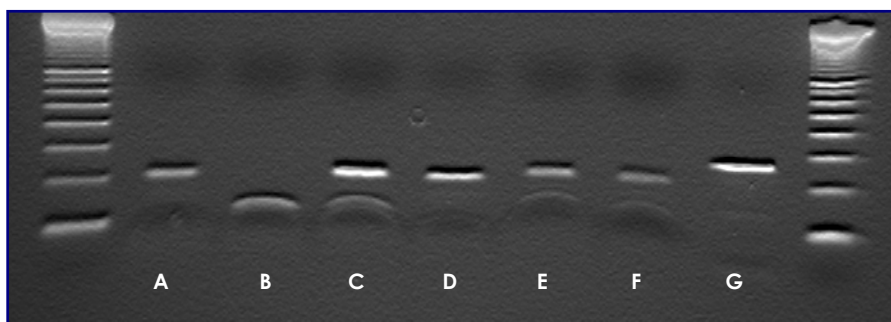


Fig. 5. Análisis mediante PCR-RFLP del exón 18 de BTK con la enzima NlaIII . El fragmento completo es de 265 pb. Tras digestión con la enzima NlaIII obtenemos 3 fragmentos de 192, 16 y 58 pb en el sujeto control. En el caso de que exista la mutación, aparece un sitio nuevo de restricción para la enzima y el fragmento de 192 pb se divide en un doblete de 95 pb. **A y G.** Individuos control. **B.** Paciente A.1. **C.** Madre. **D.** Hermana 2. **E.** Abuela materna. **F.** Hermana 1.

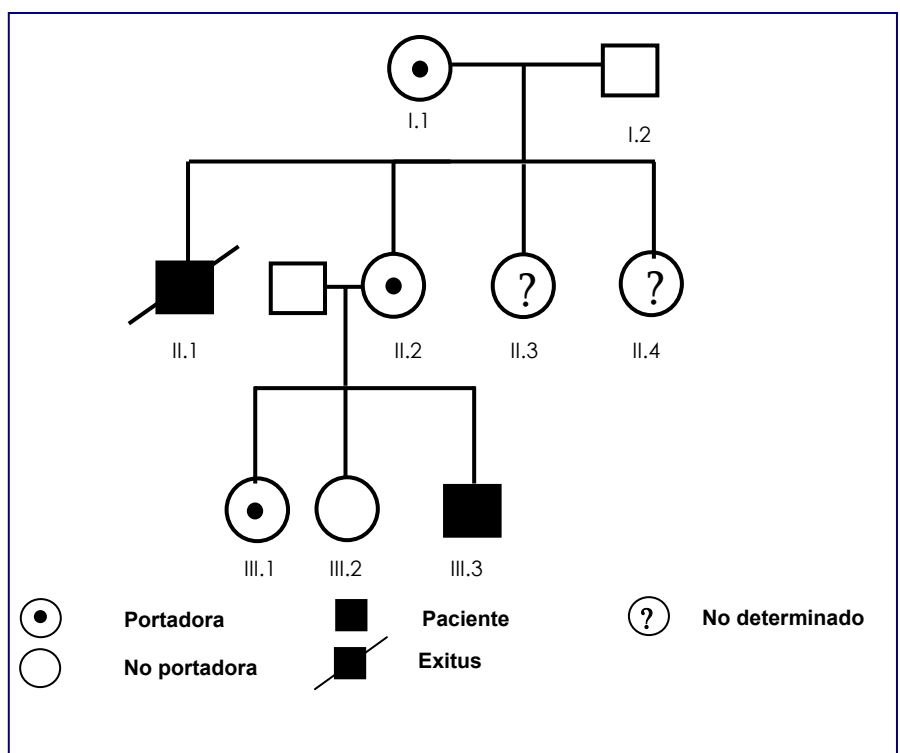


Fig. 6. Árbol genealógico de la familia A. I.1. Abuela materna. II.2. Madre. III.1. Hermana 1. III.2. Hermana 2. III.3. Paciente A.1

Esta mutación fue registrada en BTKbase Mutation registry for X-linked agammaglobulinemia (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase/index.php?content=bioinformatics>).

1.2 FAMILIA B

En esta familia se diagnosticaron tres casos de síndrome de Bruton que, dada la diferencia de edad, fueron detectados progresivamente, así como tres mujeres portadoras. A continuación, se exponen los resultados de forma individualizada para cada uno de los casos estudiados.

1.2.1. Resumen caso clínico. Paciente B.1.

El paciente B.1 era un varón de 20 años en el momento del estudio. Las primeras manifestaciones clínicas consistieron en infecciones de repetición de tipo bronquitis y neumonías recurrentes que se iniciaron a los 4 meses de vida. A los 10 años de edad fue estudiado en la consulta, donde se observaron niveles muy disminuidos de todas las inmunoglobulinas. La sospecha clínica inicial fue de un Síndrome de Bruton, debido a que entre los antecedentes familiares constaban un varón, primo hermano de la rama materna del paciente, que había fallecido a los pocos años de edad y que padecía una inmunodeficiencia por déficit de anticuerpos, de la que no se pudo concretar el origen. Por este motivo, se inició el tratamiento del paciente con IgIV. Posteriormente, y como consecuencia de los procesos infecciosos respiratorios tan frecuentes, desarrolló una Enfermedad Pulmonar Crónica, con deterioro de la función respiratoria que fue confirmada mediante espirometría. A los 2º años de edad fue remitido al Servicio de Inmunología para completar el estudio inmunológico y confirmar la sospecha de síndrome de Bruton.

1.2.1.1. Resultados Paciente B.1.

El estudio inmunológico reveló los siguientes hallazgos (tablas 5 y 6):

Tabla 5: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente B.1.

Linfocitos T (2260 cels/ μ l)	cels/μl	%
LT CD2+:	2010	89%
LT CD3+:	1740	77%
LT CD4+:	949	42%
LT CD8+:	700	31%
Linfocitos B		%
LB CD19+:	0	0 %
LB CD20+:	22	1 %
Células NK (CD3-/(CD16+56)+:	565	25%

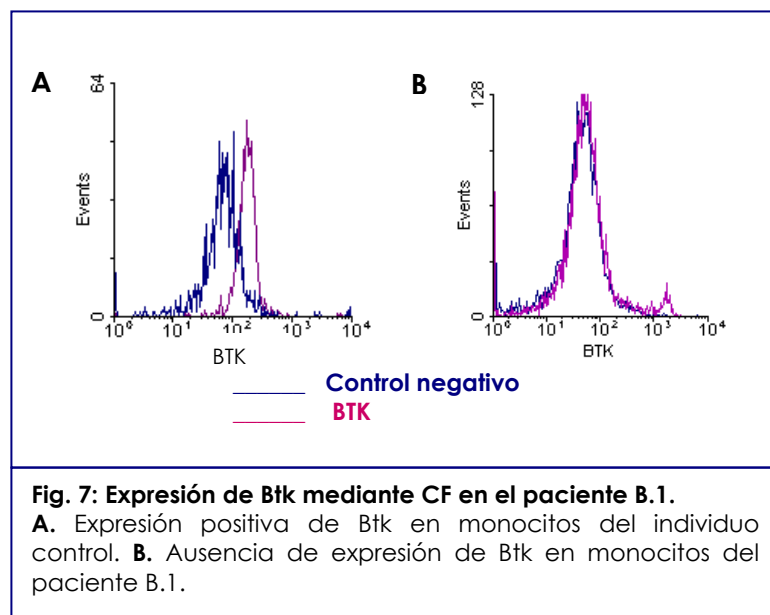
Tabla 6: Niveles séricos de Igs en el paciente B.1.

Isotipo Ig	mg/dl (Inicio síntomas)	mg/dl (Diagnóstico)
IgG:	115	1050*
IgM:	<15	<22.1
IgA:	<10	<16.8
IgE:	<19.1	<19

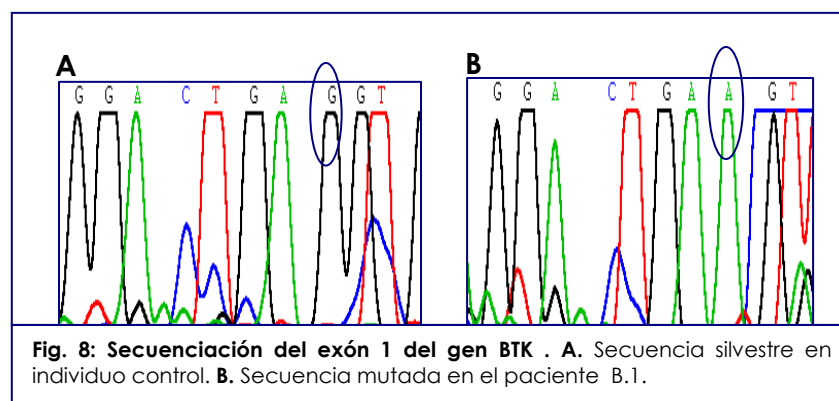
*Paciente en tratamiento con IgIV

Por tanto, presentaba cifras normales de linfocitos T y células NK y ausencia de linfocitos B con niveles muy reducidos de inmunoglobulinas. El estudio analítico reveló resultados normales en los siguientes parámetros: fórmula leucocitaria, estudio de factores del complemento y CH50. Se estudió la capacidad de oxidación de neutrófilos, que resultó ser normal. La expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos era normal, así como la expresión de CD40L (CD154) tras estimulación con PMA+IO.

Se realizó el análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo, donde se observó ausencia de expresión de dicha proteína (Fig. 7).



Mediante secuenciación del gen BTK se detectó una mutación en el exón 1, situada en una región no codificante, no descrita previamente. Dicha mutación consiste en un cambio de G por A al final de dicho exón (Figs. 8 y 9).



Exón 1 35420 A/G

Secuencia silvestre:

...GCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGG GGTATGGCAG...

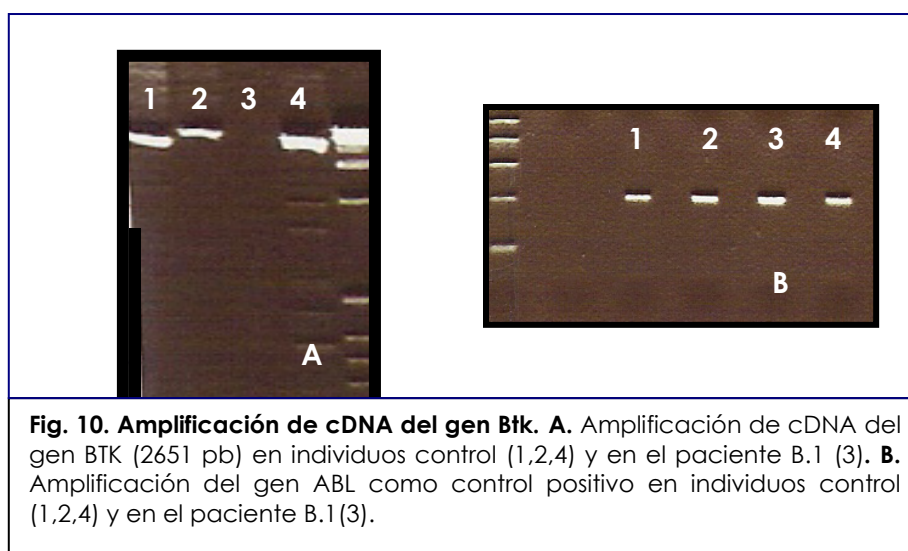
Secuencia mutada:

...GCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAAGTGGGTCTGG GGTATGGCAG...

Fig. 9. Detalle de la mutación encontrada en el exón 1.

Mutaciones similares descritas en esta zona del gen se corresponden con una disminución muy importante en la actividad transcripcional (Conley ME et al. 1998, Eun-Kyeong Jo et al. 2001), de modo que, ante este hallazgo, se procedió a tratar de comprobar si existía mRNA, empleando la siguiente estrategia: se procedió a extraer mRNA total de la muestra de sangre del paciente B.1 y, mediante RT-PCR, comprobar la presencia de cDNA del gen BTK.

En la Fig. 10 se muestra la ausencia de cDNA de BTK en este paciente. Como control positivo se empleó la amplificación del gen ABL para confirmar que la retrotranscripción a partir de mRNA total había sido adecuada (ver Pacientes, material y métodos).



La mutación fue registrada igualmente en la base de datos <http://bioinf.uta.fi/BTKbase/index.php?content=bioinfor/ldbases>.

1.2.2. Resumen caso clínico. Paciente B.2.

Este paciente era un varón de 9 años en el momento del estudio y era sobrino del paciente B.1. Desde los 4 meses de vida hasta los dos años sufrió infecciones respiratorias de repetición en forma de bronquitis, además de episodios de diarreas frecuentes. Fue remitido a la consulta al año de edad, donde se observaron niveles muy disminuidos de todas las inmunoglobulinas séricas. Dados los antecedentes familiares, además de su relación con el paciente B.1 y con un familiar varón muerto a edad temprana por lo que parecía ser una inmunodeficiencia por déficit de anticuerpos de la que no se llegó a precisar su origen, se inició tratamiento con IgIV ante la sospecha clínica de un Síndrome de Bruton. Desde los 6 años de edad el paciente presentó muy buena evolución, presentando únicamente algún proceso vírico leve.

Al año fue remitido al Servicio de Inmunología para completar el estudio inmunológico y confirmar la sospecha de Síndrome de Bruton.

1.2.2.1. Resultados. Paciente B.2.

El estudio inmunológico reveló los siguientes hallazgos (tablas 7 y 8):

Tabla 7: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente B.2.

Linfocitos (2490 cels/μl)	cels/μl	%
LT CD2+:	2415	97%
LT CD3+:	1892	76%
LT CD4+:	1369	55%
LT CD8+:	398	16%
Linfocitos B		%
LB CD19+:	0	0%
LB CD20+:	24	1%
LB CD21+/CD7-:	48	2%
Células NK(CD3-/(CD16+56)+:	647	26%

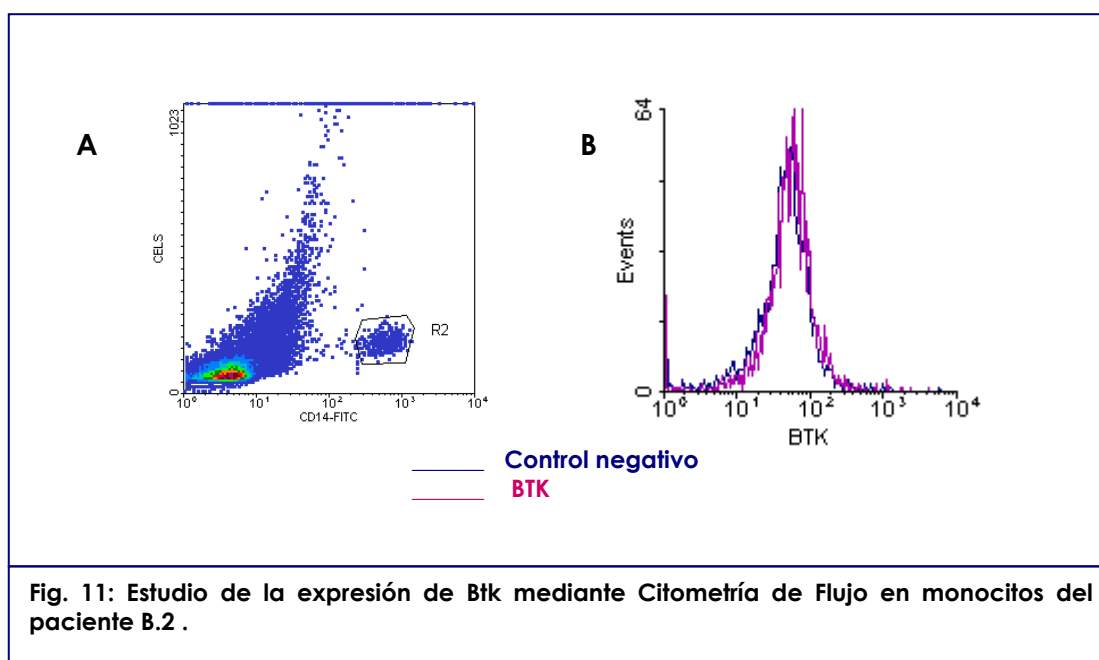
Tabla 8: Niveles séricos de Igs en el paciente B.2.

Isotipo Ig	mg/dl (Inicio síntomas)	mg/dl (Diagnóstico)
IgG:	70	1030*
IgM:	<16	<21,8
IgA:	<6	<16,1
IgE:	<19.1	<19

* Paciente en tratamiento con IgIV

Así pues, tenía cifras normales de linfocitos T y células NK y ausencia de linfocitos B con niveles casi inapreciables de inmunoglobulinas. El estudio analítico reveló, además, resultados normales en la fórmula leucocitaria, estudio de factores del complemento y CH50, junto con ausencia de isohemaglutininas. La capacidad de oxidación de neutrófilos fue normal, así como la expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos y la expresión de CD40L (CD154) tras estimulación con PMA+IO. Los niveles de anticuerpos frente a influenza, rotavirus, adenovirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus respiratorio sincitial y micoplasma fueron negativos.

En el análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo se constató la ausencia de expresión de dicha proteína (Fig. 11).



Mediante secuenciación del gen BTK observamos que existía la misma mutación descrita en su tío materno (paciente B.1) en el exón 1 y tampoco presentaba expresión de cDNA de BTK (no mostrado).

1.2.3. Resumen caso clínico. Paciente B.3.

Este paciente nació durante el transcurso del presente trabajo. Es hermano del paciente B.2 y sobrino del paciente B.1, por lo que el diagnóstico se efectuó en los primeros días de vida, así como el inicio del tratamiento con IgIV. Desde su nacimiento, el paciente no ha llegado a presentar una patología infecciosa relevante.

1.2.3.1. Resultados. Paciente B.3.

El estudio inmunológico reveló los siguientes hallazgos (tablas 9 y 10):

Tabla 9: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente B.3.

Linfocitos (2800 cels/ μ l)	cels/μl	%
LT CD2+:	2492	89%
LT CD3+:	2128	76%
LT CD4+:	1764	63%
LT CD8+:	392	14%
Linfocitos B		%
LB CD19+:	56	2%
LB CD20+:	0	0%
LB CD22+:	140	5%
LB CD21+/CD7-:	28	1%
Células NK(CD3-/(CD16+56)+:	532	19%

Tabla 10: Niveles séricos de Igs en el paciente B.3.

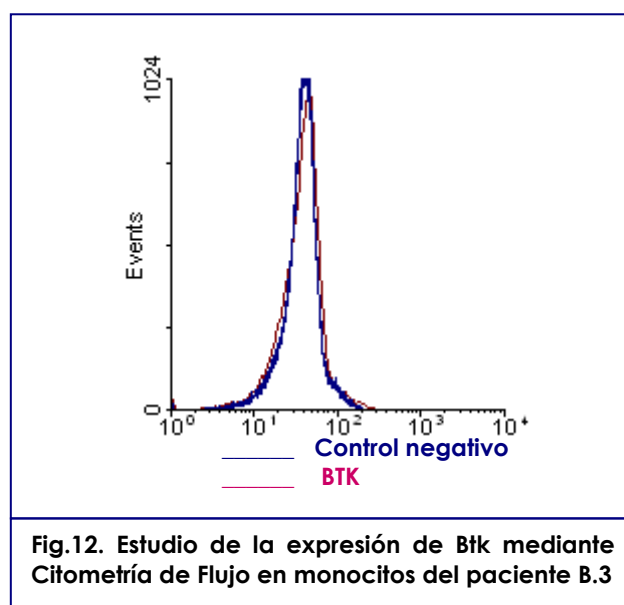
Isotipo Ig	mg/dl
IgG:	664*
IgM:	<16
IgA:	<24
IgE:	<19.1

*IgG de origen materno

Así pues, el paciente presentaba cifras normales de linfocitos T, con un porcentaje disminuido de células TCD8+, así como niveles normales de células NK y niveles muy reducidos de linfocitos B. La fórmula leucocitaria, los niveles de complemento y CH50 eran normales. Los niveles séricos de IgA e IgM fueron indetectables, siendo normales los niveles de IgG que, dada la edad del paciente (7 días), se consideraron de origen materno. En una determinación realizada con posterioridad (20 días) y previa al inicio del tratamiento con IgIV se pudo objetivar que los niveles séricos de IgG estaban disminuidos (313 mg/dl), así como los de IgA e IgM. Se pudo constatar la ausencia de isohemaglutininas, aunque dada la edad del paciente, este dato no es muy valorable.

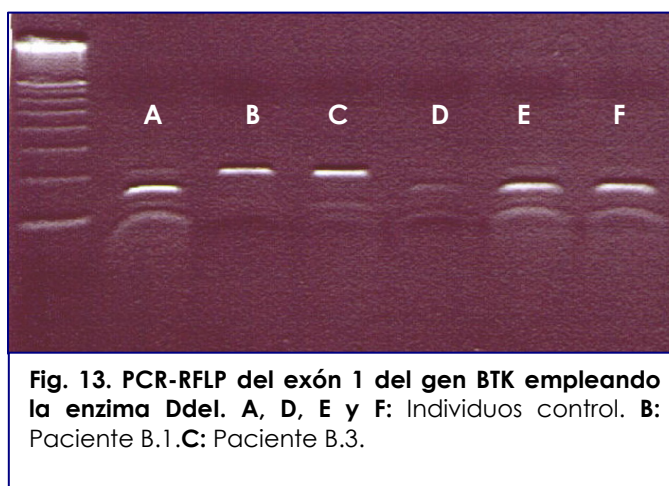
El estudio de capacidad de oxidación de neutrófilos, la expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos, así como la expresión de CD40L(CD154) tras estimulación con PMA+IO, fueron normales.

El estudio mediante citometría de flujo puso de manifiesto una ausencia de expresión de BTK en los monocitos del paciente (Fig. 12).



1.2.3.2. Estudio mediante PCR-RFLP.

Al tratarse de un miembro de la misma familia, para la que ya habíamos definido la mutación responsable (Figs. 8 y 9), se diseñó un método basado en PCR-RFLP con la enzima Ddel sobre el exón 1 de BTK (ver Pacientes Material y Métodos). En el caso de portar el defecto genético descrito anteriormente, en los pacientes B.1 y B.2 (Fig. 9) desaparecía el sitio de restricción para esta enzima. El fragmento completo tiene 341 pb. En el individuo sano se producen 4 cortes que nos sirven como control interno. En el caso de que exista la mutación desaparece el sitio de restricción para la enzima, por lo que en el enfermo sólo se producen 3 cortes dando lugar a 4 fragmentos, uno de ellos de 234 pb que es fácil de identificar y que es el que contiene la mutación (Fig.13).



1.2.4. Estudio de portadoras

Se procedió al análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo en las posibles portadoras en la familia. En la siguiente figura (Fig.14) se muestra el árbol genealógico de la familia, así como los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de Btk. No fue posible confirmar el estatus de portadora, mediante estudio genético, en la abuela ni en las hermanas debido a que no se disponía de muestras de DNA de las mismas.

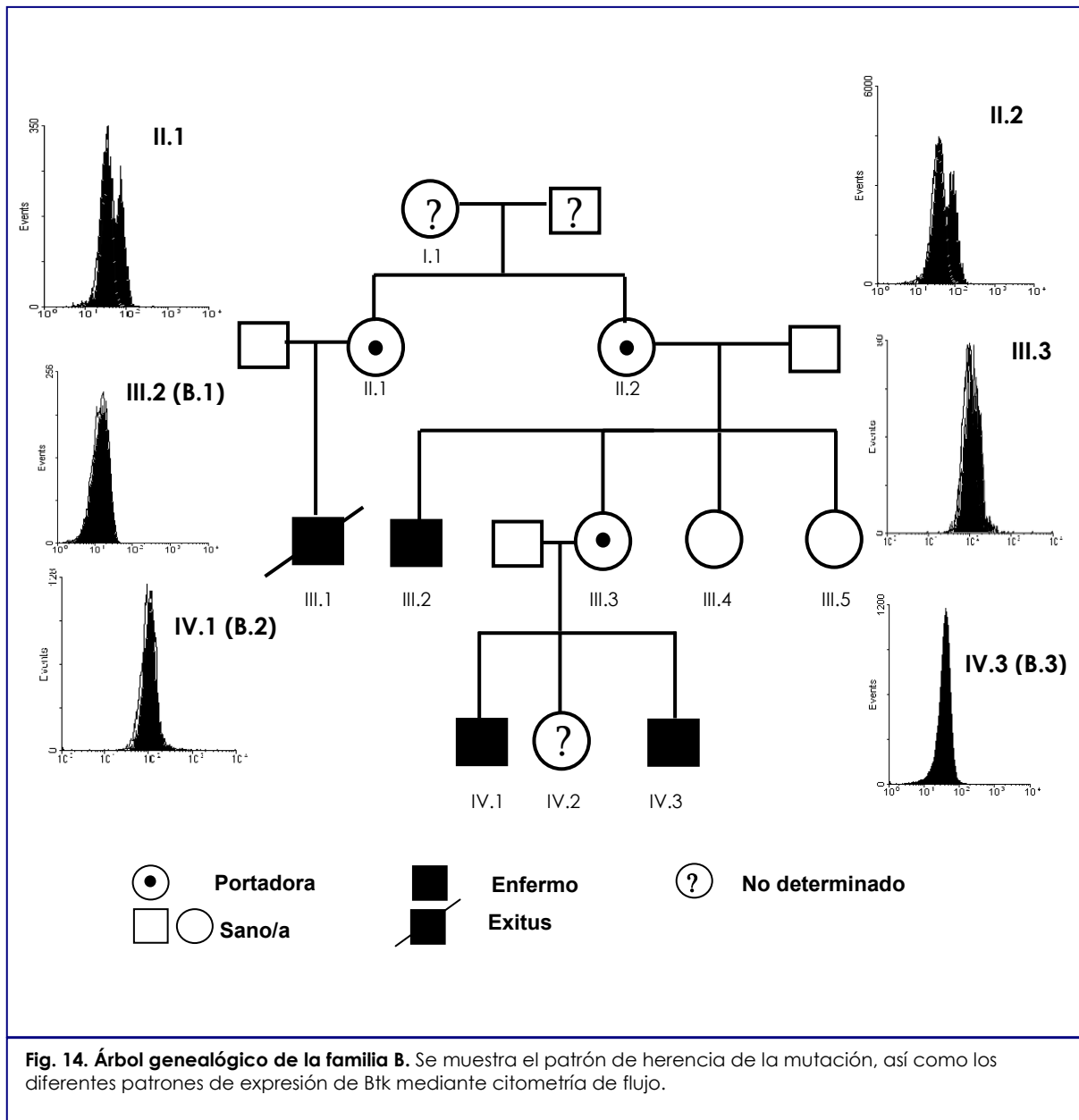


Fig. 14. Árbol genealógico de la familia B. Se muestra el patrón de herencia de la mutación, así como los diferentes patrones de expresión de Btk mediante citometría de flujo.

1.3 FAMILIA C

1.3.1. Resumen Caso clínico Paciente C.1.

Este paciente, de origen marroquí fue remitido a los 8 años de edad al Servicio de Inmunología procedente de Málaga para confirmación de la sospecha de Síndrome de Bruton. De este paciente no fue posible recoger suficientes datos correspondientes a su evolución clínica. Cuando se practicó el presente estudio estaba en tratamiento con IgIV con periodicidad mensual y a una dosis de 400 mg/kg.

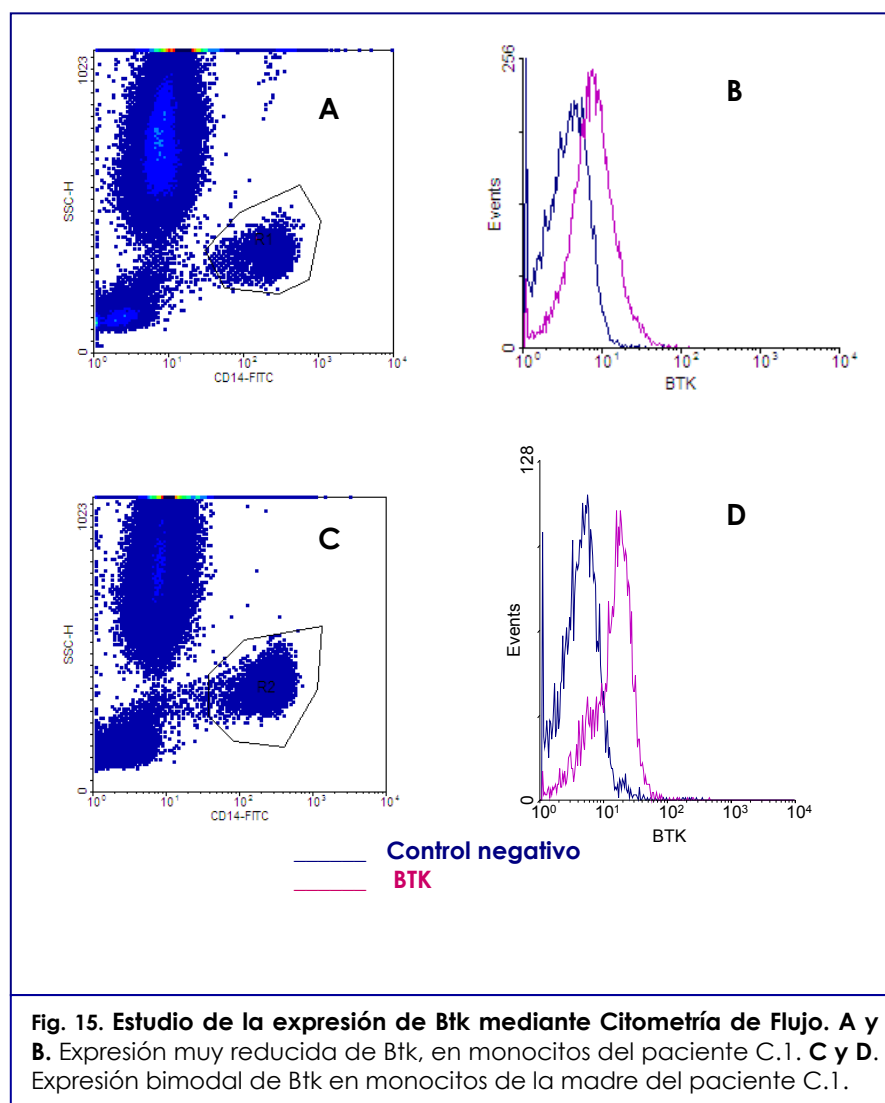
El estudio practicado en su Hospital de origen había revelado una ausencia de linfocitos B (0.9%) junto con niveles séricos de inmunoglobulinas muy disminuidos (Tabla 11). El resto del estudio analítico practicado a este paciente no revelaba alteraciones significativas.

Tabla 11: Niveles séricos de Igs en el paciente C.1 al inicio de los síntomas (5 meses de vida).

Isotipo Ig	mg/dl
IgG:	152
IgM:	11
IgA:	<6
IgE:	<17

1.3.1.1. Resultados Paciente C.1.

El análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo reveló una expresión muy disminuida de dicha proteína (Fig. 15). En paralelo se realizó el estudio a su madre que también presentaba un patrón de expresión de Btk bimodal.



Mediante secuenciación del gen BTK se observó que existían dos mutaciones no descritas previamente en el exón 6 del paciente C.1. Estas mutaciones consistían en una duplicación de 22 pb en la posición 602 del cDNA (ins/dup 602cDNA), además de un cambio de T>A en la posición 606

del cDNA (606 T>A). Esta duplicación se origina en el aa 158 de la proteína y originaba un codón de parada en la posición 201 en el dominio TH de la proteína (Fig. 16), y que daría lugar a una proteína de 1/3 de su tamaño normal en caso de ser secretada.

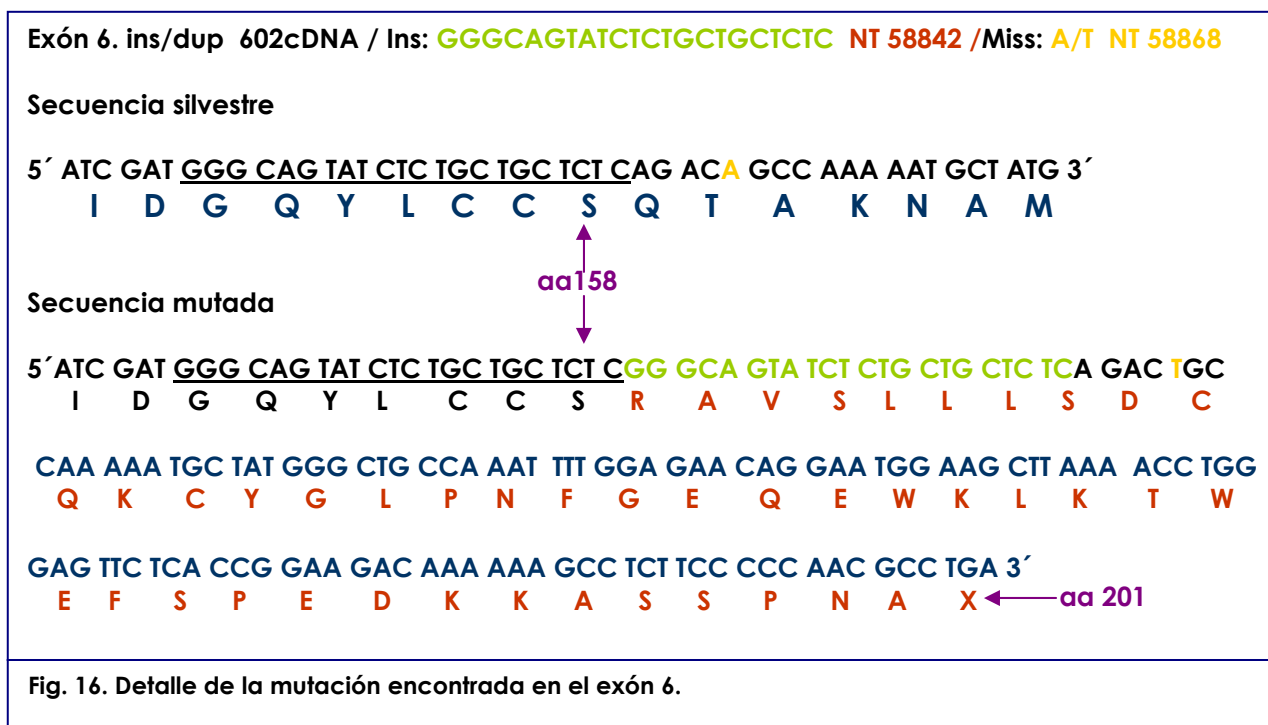


Fig. 16. Detalle de la mutación encontrada en el exón 6.

La mutación fue registrada en:

<http://bioinf.uta.fi/BTKbase/index.php?content=bioinfor/IDbases>

1.3.2. Estudio de portadoras

Para confirmar la condición de portadora de la madre del paciente, se realizó una amplificación mediante PCR convencional del exón 6, observándose que ésta portaba un alelo con un tamaño correspondiente al alelo sano y una segunda banda de tamaño mayor que se correspondía con el tamaño del alelo mutado. Para averiguar si el cambio 606T>A también procedía de la madre o aparecía de *novo* en el paciente, se procedió a la secuenciación de ambas bandas del exón 6 en el gen BTK de la madre y se observó que, efectivamente, la ins/dup 602cDNA iba acompañada del

cambio T>A, mientras que la banda de menor tamaño portaba la secuencia normal, confirmando así que ambas mutaciones procedían de la madre (Fig. 17).

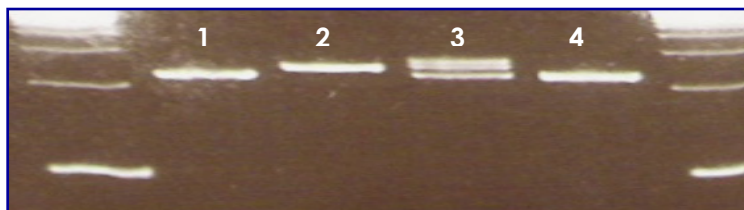


Fig. 17. Amplificación mediante PCR del exón 6 del gen BTK. **1 y 4**, Individuos control. **2**, Paciente C.1: se amplifica una sola banda de mayor tamaño debido a la presencia de la mutación. **3**, Madre del paciente C.1: aparece un doblete correspondiente al alelo sano y al alelo mutado, respectivamente.

1.4. Familia D

2.4.1. Resumen Caso clínico Paciente D.1.

Este paciente, también de origen marroquí, fue remitido al servicio de Inmunología a los 3 años de edad desde Málaga para confirmar la sospecha diagnóstica de síndrome de Bruton.

Desde los 5 meses de vida había presentado bronquitis y neumonías de larga evolución. A los 17 meses fue estudiado en Málaga, detectándose niveles séricos muy reducidos de todas las clases de inmunoglobulinas y de linfocitos B (0,7%). A pesar de que no existían antecedentes familiares de inmunodeficiencia, se sospechó que el paciente podría padecer un Síndrome de Bruton, por lo que se inició tratamiento con IgIV a una dosis de 400 mg/kg. Finalmente, a los 3 años de edad se remitieron muestras de sangre del paciente y de su familia a nuestra unidad para confirmar esta sospecha.

1.3.1. 1. Resultados Paciente D.1.

Los únicos datos disponibles de este paciente son los reflejados en las tablas 12 y 13:

Tabla 12: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente D.1 (3 años de vida).

Linfocitos (2573 cels/μl)	cels/μl	%
LT CD3+:	2405	93,5 %
Linfocitos B		%
LB CD19+:	18	0,7 %

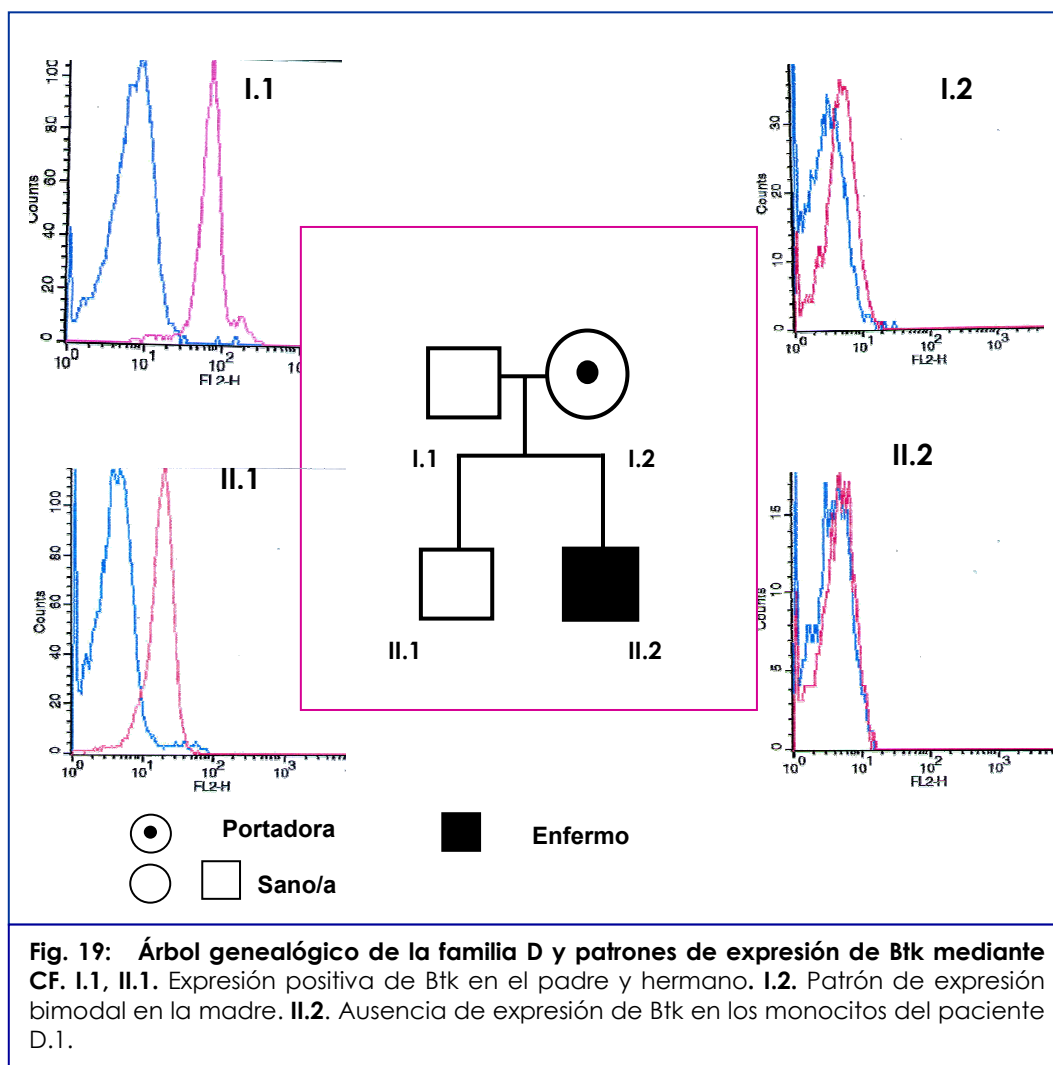
Tabla 13: Niveles séricos de Igs en el paciente D.1 al inicio de los síntomas (5 meses de vida).

Isotipo Ig	mg/dl
IgG:	105
IgM:	10,5
IgA:	<25
IgE:	ND

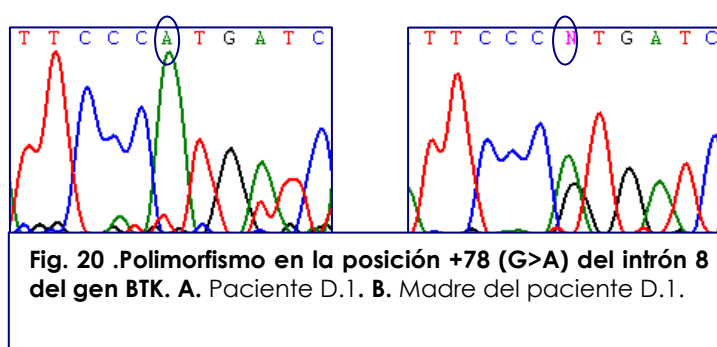
Por tanto, el paciente presentaba cifras normales de linfocitos T con niveles prácticamente ausentes de linfocitos B y de inmunoglobulinas. Los

estudios analíticos revelaron, además, una fórmula leucocitaria, estudio de factores del complemento, CH50 y una actividad respiratoria oxidativa en granulocitos normales. Tanto la expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos, como la expresión de CD40L(CD154) tras estimulación con ésteres de forbol e ionomicina eran también normales. Se constató una ausencia de isohemaglutininas.

Mediante citometría de flujo se realizó el análisis de la expresión de Btk en todos los miembros de esta familia, observándose una ausencia de expresión de Btk en los monocitos del paciente. El padre y el hermano mayor presentaban una expresión normal de Btk, mientras que su madre presentaba un patrón bimodal, sugestivo de un estado de portadora (Fig. 19).



Mediante secuenciación del gen Btk se observó que no existía ninguna mutación ni en el paciente, ni en la madre del paciente, en toda la zona rastreada del gen Btk (exones y zonas de "splicing", incluyendo al menos 50 pb en sentido 5' y 3' de cada uno de los intrones). Tan sólo se pudo constatar la presencia de un polimorfismo, previamente descrito en la literatura (Hagemann et al. 1994), en la posición +78 del intrón 8, consistente en un cambio de G>A (Fig. 20). Este polimorfismo se hallaba presente en heterocigosis en la madre del paciente.



A raíz de este hallazgo, se investigaron otros tres polimorfismos silentes, descritos anteriormente en la literatura, en el gen BTK del enfermo, la madre y el hermano del paciente, para comprobar si existía un determinado haplotipo asociado a la condición de deficiente. Los polimorfismos estudiados fueron: el cambio G>A en la posición +178 del intrón 6 (SNP: rs:2071222), el cambio T>C en la posición +70 del intrón 8 (Hagemann TL et al. 1995) y el cambio C>T en la posición 2031 del exón 18 (de Weers M 1994) que no originan ningún cambio de aminoácido en la proteína. Las frecuencias de los diferentes alelos están descritas en la tabla 14.

Tabla 14. Frecuencia en la población general de los diferentes alelos estudiados.

Polimorfismo	Intrón 6+178 G/A	intrón 8 +70 T/C	intrón 8 +78 G/A	exón 18 C2031T
Alelo 1	G (81%)	T (95%)	G (71%)	C (89%)
Alelo 2	A (19%)	A (5%)	A (29%)	T (11%)

Los resultados muestran que el paciente D.1 heredó de la madre el haplotipo GTAC (las siglas se corresponden con los nucleótidos encontrados) y el hermano sano presentaba un haplotipo diferente, ATGC, indicando que, cada uno había heredado un cromosoma X diferente de la madre. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Variantes del gen BTK en los distintos miembros de la familia D.

Polimorfismo	Intrón 6+178 G/A	intrón 8 +70 T/C	intrón 8 +78 G/A	exón 18 C2031T
Madre	G A	T T	A G	C C
Paciente D.1	G	T	A	C
Hermano	A	T	G	C

No fue posible realizar estudios adicionales a este paciente, tales como extracción de mRNA para comprobar la presencia de cDNA de BTK.

1.5. FAMILIA E

1.5.1. Resumen Caso clínico Paciente E.1.

Este paciente era un varón de 16 años en el momento del estudio, fue estudiado por primera vez en la consulta a los 5 meses de vida derivado desde las consultas de Hematología por presentar neutropenia periódica. A partir de los 5 meses de edad comenzó con episodios de infecciones orales de repetición, deposiciones diarreicas frecuentes, así como un episodio grave de sepsis por pseudomonas. Al detectarse niveles muy bajos de inmunoglobulinas y ante la ausencia de antecedentes familiares relevantes, se sospechó inicialmente una IDVC, iniciándose, por primera vez al año de vida, tratamiento con inmunoglobulina intramuscular y dos años mas tarde con IgIV hasta la actualidad.

A los 16 años de edad fue remitido al Servicio de Inmunología para descartar un posible síndrome de Bruton.

1.5.1. 1. Resultados Paciente E.1.

Se encontraron los siguientes resultados en el estudio inmunológico (tablas 16 y 17):

Tabla 16: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente E.1.

Linfocitos B	cels/μl	%
LB CD19+:	12	0.1 %
LB CD20+:	0	0 %

Tabla 17: Niveles séricos de Igs en el paciente E.1.

Isotipo Ig	mg/dl (Inicio síntomas)	mg/dl (Diagnóstico)
IgG:	118	1020*
IgM:	<15	<21
IgA:	<10	<16
IgE:	<19	<19

- Paciente en tratamiento con IgIV

En el momento del estudio mostraba niveles prácticamente ausentes de linfocitos B y de inmunoglobulinas, y el estudio analítico practicado presentó resultados normales en la fórmula leucocitaria, el estudio de factores del complemento, CH50, así como en la actividad respiratoria oxidativa de los granulocitos. La expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos, así como la expresión de CD40L (CD154) tras estimulación con ésteres de forbol e ionomicina, también fueron normales. Se observó una ausencia de isohemaglutininas.

En el análisis de la expresión de Btk mediante citometría de flujo en el paciente y en la madre, se observaba una ausencia de expresión de dicha proteína en el paciente, aunque su expresión era normal en la madre. Una hermana del paciente y su padre no pudieron ser estudiados (Fig. 21).

Mediante secuenciación del gen BTK se pudo observar que no existía ninguna mutación en toda la zona rastreada del mismo ni en el paciente, ni en su madre. Se incluyeron todos los exones y zonas de splicing incluyendo al menos 50 pb en sentido 5' y 3' de los intrones. Tan sólo se pudo constatar la presencia de un cambio de T>G en la posición 789 del cDNA en el paciente; un cambio que no había sido descrito previamente en la literatura y que no provocaba ningún cambio de aminoácido (V219V) (Fig. 22). No pudo ser estudiado en individuos control para descartar que se tratara de un polimorfismo al no disponer de un método que resultara económico y eficaz, como podría ser mediante PCR-RFLP, siendo únicamente posible analizarlo mediante secuenciación. (Este cambio también ha sido registrado en la base de datos <http://bioinf.uta.fi/BTKbase/index.php?content=bioinfor/IDbases>).

El estudio de los polimorfismos ya conocidos del gen BTK descritos en el paciente anterior, únicamente reveló que la madre era heterocigota para el cambio A>G en la posición +78 del intrón 8 (tabla 18).

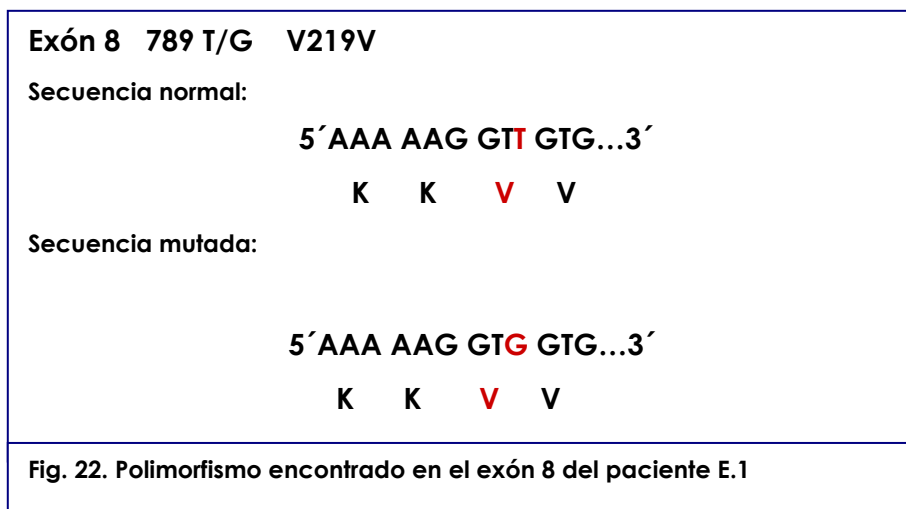
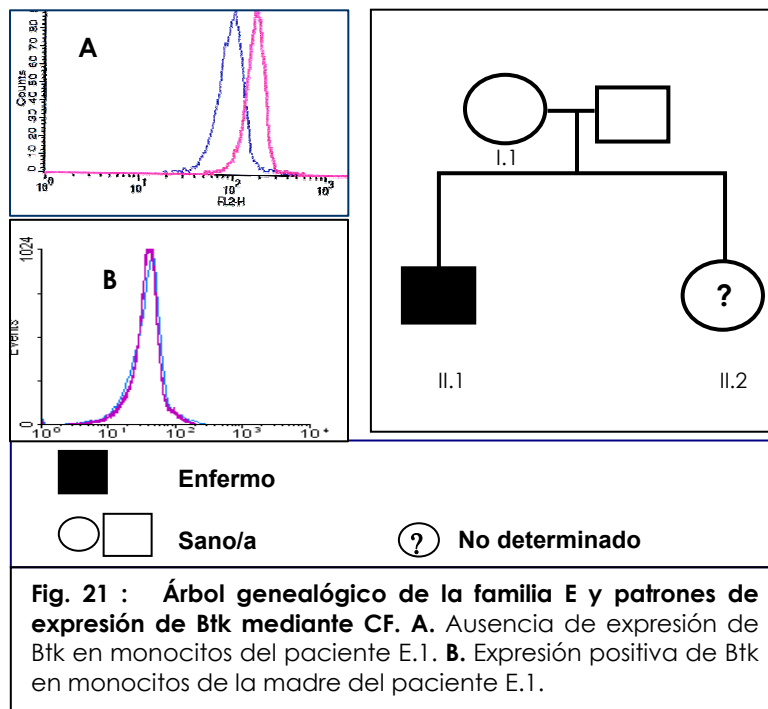


Tabla 18. Variantes del gen BTK en los distintos miembros de la familia E.

Polimorfismo	intrón6+178 G/A	intrón 8 +70 T/C	intrón 8 +78 G/A	exón 18 C2031T
Madre	G G	T T	A G	C C
Paciente E.1	G	T	G	C

Con objeto de confirmar la posible existencia de un defecto en la traducción y síntesis del mensajero de la proteína Btk, se procedió a la extracción de mRNA, observándose que, tanto la expresión como el tamaño del cDNA de BTK, eran muy similares a los del individuo control (Fig. 23).

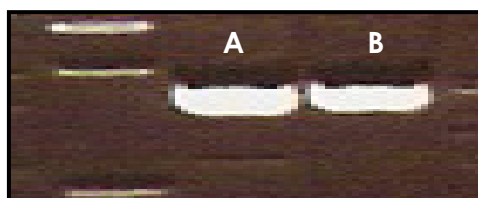


Fig. 23. Amplificación del cDNA de BTK a partir de mRNA. A. Individuo control. B. Paciente E.1

1.6. FAMILIA F

En esta familia se han descrito tres nuevos casos de síndrome de Bruton. El primer paciente estudiado fue el paciente F.1. Con posterioridad fueron diagnosticados los pacientes F.2 y F.3. A continuación, se detallan las formas de presentación clínica y las características individuales de cada uno de ellos.

1.6.1. Resumen Caso clínico Paciente F.1.

Se trataba de un varón de 30 años en el momento del estudio, con dos hermanos varones sanos. Comenzó con infecciones del tracto urinario de repetición a los 2 años, sufrió un episodio de meningoencefalitis y procesos infecciosos muy frecuentes. A pesar de ello, en los estudios practicados, los anticuerpos frente a diferentes microorganismos fueron negativos. A partir de los 3 años de edad, comenzó a presentar artritis en todas las articulaciones derechas. Fue estudiado por primera vez en la consulta a los 10 años, objetivándose, en aquella ocasión, un descenso muy marcado de los linfocitos B (2%) junto con un descenso de todas las inmunoglobulinas y ausencia de isohemaglutininas, por lo que se inició tratamiento con IgIV ante la sospecha de una inmunodeficiencia de anticuerpos.

Alrededor de la segunda década de la vida comenzó a desarrollar una afectación neurológica progresiva que se ha mantenido sin diagnóstico final tras múltiples estudios, aunque se han descartado varias enfermedades por depósito, como la enfermedad de Wilson, entre otras. La sospecha diagnóstica ante este cuadro neurológico incluyó la posibilidad de que se tratara de una infección por enterovirus, una infección por virus lento debida a la enfermedad de base del paciente, o incluso que pudiera tratarse de un efecto secundario del tratamiento con IgIV.

1.6.1.1. Resultados Paciente F.1.

El estudio se realizó tan sólo en el paciente y en la madre, los otros dos hermanos no pudieron ser estudiados.

El estudio inmunológico reveló los siguientes hallazgos (tablas 19 y 20):

Tabla 19: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente F.1.

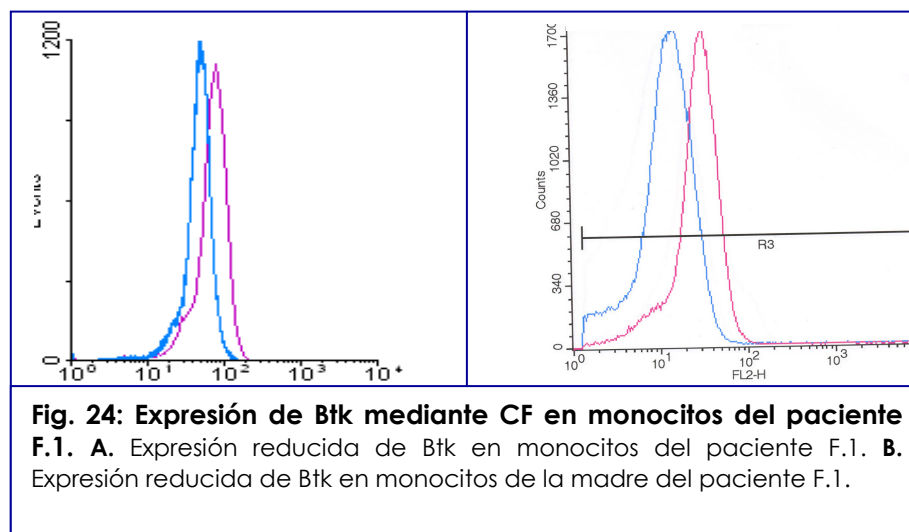
Linfocitos B	cels/μl	%
LB CD19+:	24	2 %
LB CD20+:	24	2 %
LB CD22+:	24	2 %

Tabla 20: Niveles séricos de Igs en el paciente F.1.

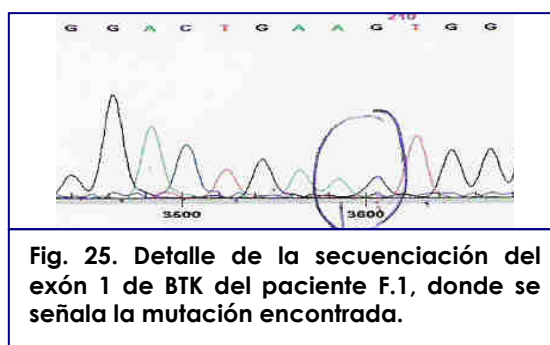
Isotipo Ig	mg/dl (Inicio síntomas)
IgG:	104
IgM:	<16
IgA:	<24
IgE:	<19

Por tanto, presentaba cifras muy reducidas de linfocitos B con niveles muy reducidos de inmunoglobulinas y subclases de IgG. El resto del estudio reveló niveles normales de factores del complemento, así como de su actividad hemolítica (CH50). Los estudios de funcionalidad linfocitaria también fueron normales.

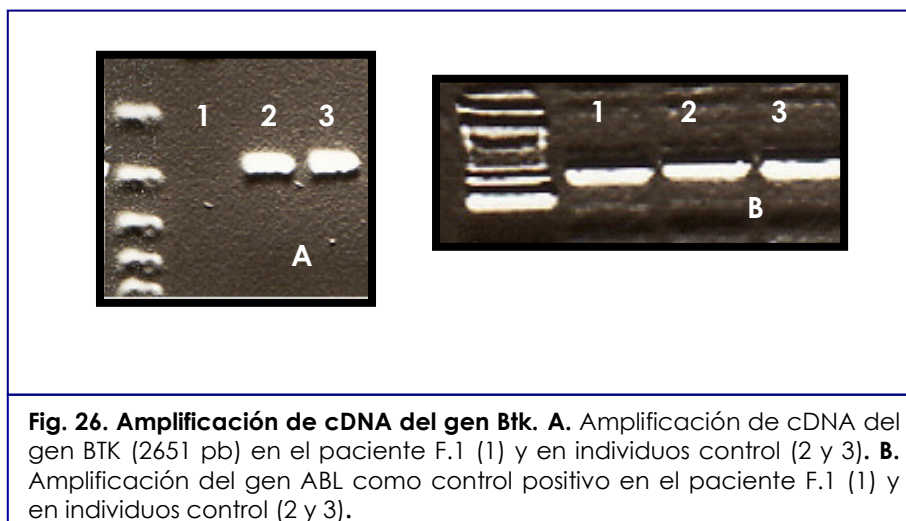
Se realizó el análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo, observando una expresión muy disminuida de dicha proteína en los monocitos del paciente y de su madre (Fig. 24).



Mediante secuenciación del gen BTK se observó que este paciente presentaba la misma mutación descrita para el caso índice de la familia B, concretamente, un cambio de G por A al final del exón 1 (Figs. 8, 9 y 25).



Se procedió a extraer mRNA total y se realizó una retrotranscripción para obtener cDNA y comprobar la ausencia de cDNA de BTK en este paciente (Fig. 26). Como control positivo se empleó la amplificación del gen ABL para confirmar que la retrotranscripción a partir de mRNA total había sido adecuada.



1.6.1.2. Estudios empleando PCR-RFLP

Mediante PCR-RFLP del exón 1 con la enzima Ddel, tal y como se diseñó para la familia B, se observó que la madre del paciente F.1 era heterocigota para esta misma mutación. Al tratarse de la misma mutación descrita en la familia B y ante la dificultad de confirmar la existencia de un ancestro común en ambas familias, se procedió a analizar, mediante PCR-RFLP, el exón 1 de BTK en 100 individuos control procedentes del mismo área geográfica, así como en 20 pacientes con IDVC para descartar que pudiera tratarse de un polimorfismo. Ninguno de ellos presentó la mutación (Fig. 27).



1.6.2. Resumen Casos clínicos Pacientes F.2 y F.3.

Se trataba de dos varones de 17 meses de edad en el momento del estudio, nacidos de un parto gemelar. La abuela materna de los pacientes es hermana de la abuela materna del paciente F.1. El paciente F.2 fue estudiado por primera vez en consulta a los 16 meses de vida. Presentaba una

cardiopatía congénita consistente en un ventrículo derecho de doble salida con una comunicación interventricular (CIV), que había sido intervenida de forma satisfactoria, aunque con una CIV residual. Desde los 3 primeros meses de vida presentó bronquitis y neumonías de repetición, así como varios episodios de gastroenteritis (disbacteriosis por *enterococcus* sp. en cultivo de heces) y conjuntivitis (*streptococcus viridans* en cultivo de exudado conjuntival).

En un primer estudio del paciente F.2 se detectó un descenso de todos los isotipos de inmunoglobulinas, por lo que se remitió al Servicio de Inmunología para estudio de posible síndrome de Bruton, teniendo en cuenta los antecedentes familiares, e iniciándose tratamiento con IgIV con una dosis de 400 mg/kg con una periodicidad de 4 semanas. El paciente F.3 estaba sano en el momento del estudio y no presentaba ningún síntoma característico de la enfermedad.

1.6.2.1. Resultados Pacientes F.2 y F.3.

El estudio inmunológico practicado los pacientes F.2 y F.3 reveló los siguientes hallazgos (tablas 21 y 22):

Tabla 21: Inmunofenotipo mediante CF en el paciente F.2.

Linfocitos (915cels/ μ l)	cels/μl	%
LT CD3+:	866	94,7%
LT CD4+:	680	74,4 %
LT CD8+:	69	7,6 %
Linfocitos B		%
LB CD19+:	36	4 %
LB CD20+:	36	4 %
LB CD21+:	45	5 %
LB CD22+:	36	4 %
Células NK(CD3-/(CD16+56)+:	100	11 %

Tabla 22: Niveles séricos de Igs en el paciente F.2

Isotipo Ig	mg/dl (al diagnóstico)
IgG:	70
IgM:	<25
IgA:	<21
IgE:	<8

Así pues, el paciente F.2 presentaba linfopenia con niveles muy reducidos de linfocitos B. Todas las subclases de IgG estaban disminuidas (IgG1: 510 mg/L; IgG2: 127 mg/L con niveles no evaluables de IgG3 e IgG4:<3 mg/L) y los niveles de anticuerpos específicos frente a polisacárido capsular de neumococo e IgG específica frente a Haemophilus B humano y toxoide tetánico se hallaban por debajo del rango protector. Los estudios de funcionalidad linfocitaria fueron normales.

Por su parte, el paciente F.3 presentaba niveles séricos indetectables de IgA y muy disminuidos de IgG a expensas de las subclases IgG1 (531 mg/L) e IgG2 (132 mg/L), con niveles normales para su edad de IgG3 (32 mg/L) y no evaluables de IgG4 (<3 mg/L). Los niveles de IgE eran normales para su edad. Presentaba además un número muy reducido de linfocitos B (0,9%) (tablas 23 y 24).

Tabla 23: Inmunofenotipo mediante CF en el Paciente F.3.

Linfocitos (3.729 cels/ μ l)	cels/ μ l	%
LT CD3+:	3508	94,1 %
LT CD4+:	2531	67,9 %
LT CD8+:	872	23,4 %
Linfocitos B		%
LB CD19+:	33	0,9 %

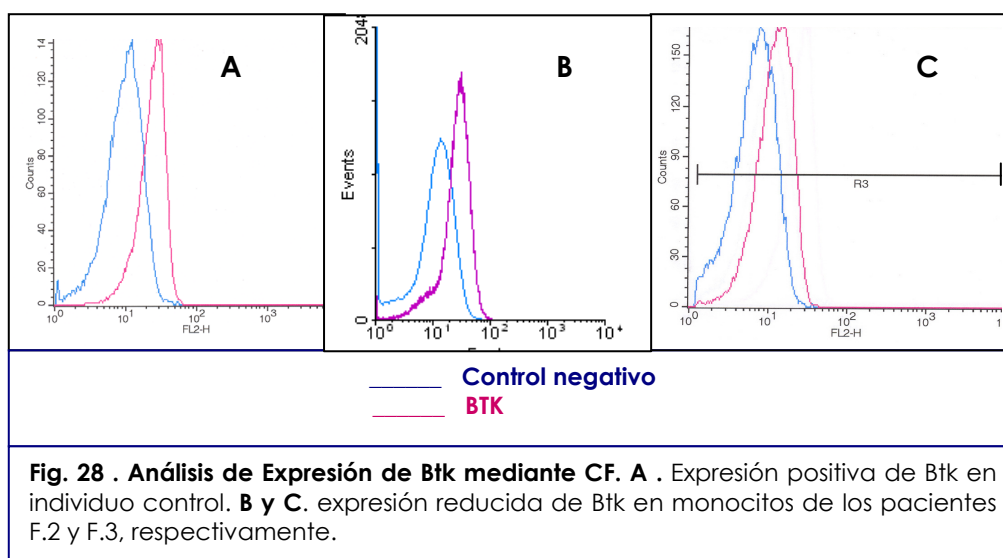
Tabla 24: Niveles séricos de Igs en el paciente F.3

Isotipo Ig	mg/dl (al diagnóstico)
IgG:	85
IgM:	<21
IgA:	<25
IgE:	18,1

Los anticuerpos IgG específicos frente a Haemophilus B e IgG2 específicos frente a polisacárido capsular de neumococo estaban por debajo del límite de detección de la técnica (ver pacientes y métodos).

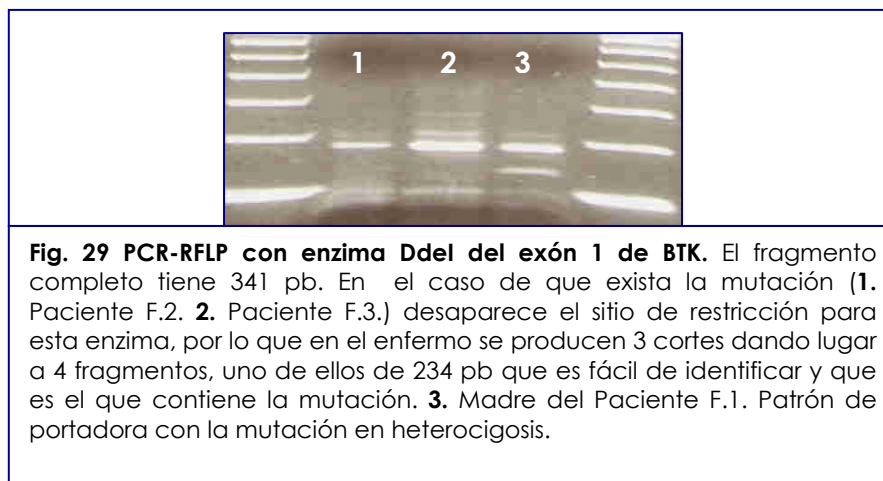
Los niveles de factores del complemento fueron normales, a excepción de una discreta disminución de C1q. La actividad hemolítica de la vía clásica del complemento (CH50) fue normal. La expresión del marcador temprano de activación celular CD69 en respuesta a mitógenos fue también normal, así como la expresión de CD40L(CD154) tras estimulación con ésteres de forbol e ionomicina.

Se realizó el análisis de expresión de Btk mediante citometría de flujo en los dos pacientes, observándose una expresión disminuida de dicha proteína en ambos (Fig. 28).

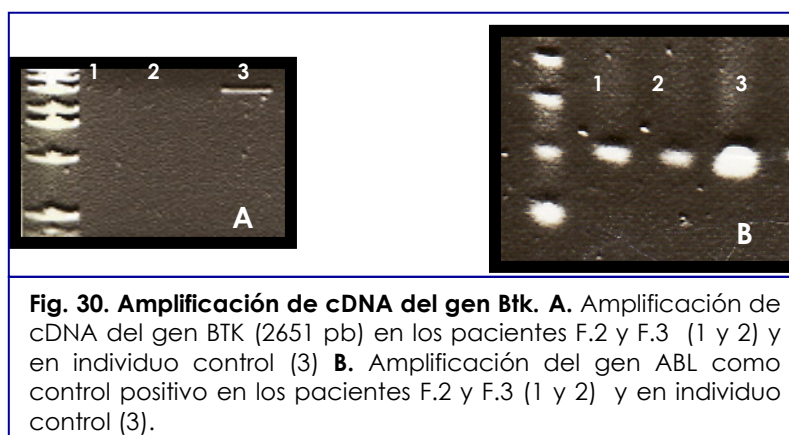


1.6.2.2. Análisis mediante PCR-RFLP

Siendo los dos hermanos familiares del paciente F.1, se procedió a analizar el exón 1 del gen BTK mediante PCR-RFLP con la enzima Ddel para confirmar que ambos portaban la misma mutación que su familiar (Fig. 29).



Se procedió a extraer mRNA total de los dos pacientes y se realizó una retrotranscripción para obtener cDNA y comprobar la ausencia de cDNA de BTK en ambos (Fig. 30).



1.6.3. Estudio de Portadoras

El estudio fue ampliado a los familiares que lo solicitaron para detectar posibles portadoras mediante citometría de flujo y PCR-RFLP. La madre de ambos pacientes y la abuela resultaron ser portadoras del defecto, mientras que una tía materna no portaba la mutación (Fig. 31). Esta última fue además confirmada mediante secuenciación del exón 1 del gen BTK (Fig. 32).

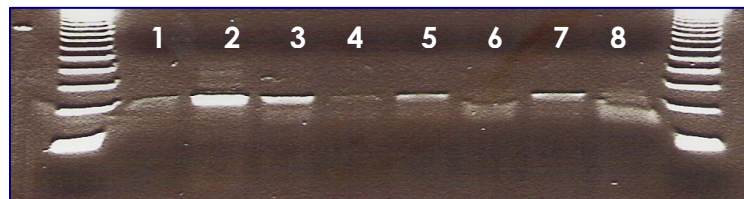


Fig. 31. PCR-RFLP con enzima Ddel del exón 1 de BTK. 1. Paciente F.1. **2.** Paciente F.2. **3.** Madre de los pacientes F.2 y F.3. **4.** Paciente F.3. **5.** Abuela materna de los pacientes F.2 y F.3. **6** Tía materna de los pacientes F.2 y F.3. **7.** Madre de los pacientes F.2 y F.3 (bis). **8.** Madre del Paciente F.1 como control.

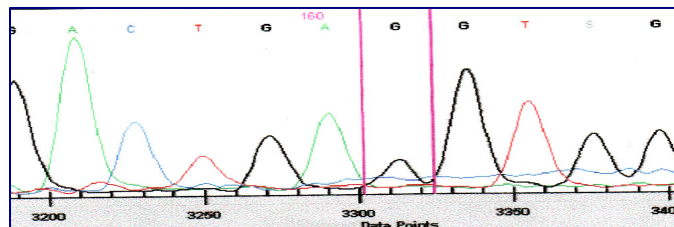


Fig. 32. Detalle de la secuenciación del exón 1 de BTK de la tía de los pacientes F.2 y F.3, confirmando que no es portadora de la mutación.

2. ANÁLISIS DE LAS FORMAS DE PRESENTACIÓN CLÍNICA DEL SÍNDROME DE BRUTON. REVISIÓN DE LOS 10 CASOS ESTUDIADOS.

En la tabla 25 se presenta un resumen de los datos clínicos de los 10 pacientes estudiados.

Tabla 25. Resumen de los datos clínicos de los pacientes estudiados. FAM: Familia. PID: Identificación del paciente. DGCO: Diagnóstico. HF: Historia Familiar. N: Negativo. ND: No determinado. P: Parcial. S: Sí.												
FAM	PID	INICIO SÍNTOMAS (MESES)	DGCO IDCV (AÑOS)	DGCO BRUTON (AÑOS)	INICIO IgIV (AÑOS)	CD19+ (LB) (%)	BTK CF	BTK-mRNA	IgG mg/dl	IgM mg/dl	IgA mg/dl	HF
A	A.1	4	1,6	3	1,6	0	N	ND	110	<15	<10	S
B	B.1	4	-	20	10	0	N	N	115	<15	<10	S
	B.2	4	-	9	1	0	N	N	70	<16	<6	S
	B.3	-	-	0	0	2	N	N	313	<16	<24	S
C	C.1	5	-	8,5	1	0,1	P	ND	152	11	<6	N
D	D.1	5	-	3,2	1,4	0,7	N	ND	105	<10,5	<25	N
E	E.1	5	1	16	1	0,1	N	S	118	<15	<10	N
F	F.1	24	12	30	12	2	P	N	104	<16	<24	N
	F.2	3	-	1,4	1,4	4	P	N	70	<25	<21	S
	F.3	-	-	1,4	1,4	0,9	P	N	85	<21	<25	S

Se estudiaron un total de 10 pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico definitivo de Síndrome de Bruton (Conley ME et al. 1999). Las variables analizadas fueron: edad (en meses) de inicio de los síntomas, edad (en años) del diagnóstico como IDCV, edad (en años) del diagnóstico como síndrome de Bruton, edad (en años) de inicio del tratamiento con IgIV, porcentaje de linfocitos B mediante CF, expresión de Btk mediante CF, expresión de mRNA de Btk, niveles de IgG, IgA e IgM, presencia o no de antecedentes familiares de enfermedad, el tipo de infecciones padecidas y la aparición de secuelas y/o complicaciones a consecuencia de las mismas.

La edad de inicio de los síntomas varió entre los 3 y los 24 meses, con un promedio de 6 meses. El paciente B.3 no llegó a presentar síntomas, ya que, al existir antecedentes familiares se instauró tratamiento con IgIV. En el caso del

paciente F.3, que no había presentado síntomas característicos de la enfermedad, a pesar de portar la misma mutación que su hermano mellizo, se instauró también tratamiento sustitutivo con IgIV al constatar un descenso global de inmunoglobulinas en suero y ausencia de células B circulantes.

La edad en la que se confirmó el diagnóstico fue muy variable, oscilando entre 3 días y 30 años, con una media de 9,25 años. Cinco pacientes fueron diagnosticados antes de los 5 años de edad y en los otros cinco, aunque el diagnóstico fue confirmado más tarde, existía sospecha de IDVC en dos de ellos, por lo que ya estaban en tratamiento con IgIV.

Dos pacientes fueron remitidos para ser estudiados a fin de confirmar la sospecha diagnóstica desde otros hospitales dentro de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

La edad de inicio del tratamiento con IgIV estuvo comprendida entre el primer y el segundo año de vida, con la excepción del paciente B.3, en el que se inició a los pocos días del nacimiento y los pacientes B.1 y F.1 en los que se inició a los 10 y 12 años de edad respectivamente. La media fue de 3,08 años.

La confirmación del diagnóstico definitivo de síndrome de Bruton estuvo basada en la ausencia o disminución de la expresión de Btk mediante citometría de flujo. En 8 de los pacientes se pudo confirmar además el defecto genético responsable. En tres familias se diseñó un método personalizado basado en PCR-RFLP para identificar a las portadoras de esa familia y poder realizar de esta forma un diagnóstico más rápido y diagnóstico prenatal si se precisara. Se identificaron un total de 10 mujeres portadoras del síndrome de Bruton, habiéndose descartado la condición de portadora en otras dos.

3. PERFIL DE INFECCIONES Y RELACIÓN CON EL INICIO PRECOZ DEL TRATAMIENTO CON IgIV.

Casi todos los pacientes fueron ingresados con infecciones de repetición antes del diagnóstico, con excepción de los pacientes B.3 y F.3, en cuyas familias ya se había identificado el defecto responsable, lo que facilitó su diagnóstico a los 3 días de vida y 1,4 años, respectivamente. A estos pacientes se le instauró tratamiento sustitutivo con IgIV de inmediato, y, hasta

el momento no han presentado infecciones recurrentes y no han sido ingresados.

Aunque el espectro de síntomas variaba de un enfermo a otro, la forma más habitual de presentación fueron las infecciones bacterianas de repetición, principalmente del tracto respiratorio y digestivo (Tabla 26).

La enfermedad dejó secuelas en los tres pacientes que recibieron el tratamiento con IgIV más tarde. El paciente A.1 a los 1,6 años de edad, el paciente B.1 a los 10 años y el paciente F.1 a los 12 años. Las secuelas que presentaron fueron: otorrea crónica, enfermedad pulmonar crónica y deterioro neurológico postencefalítico, respectivamente. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre la edad de inicio del tratamiento con IgIV y la presencia o no de secuelas o complicaciones. Aunque el tamaño de la muestra no fue muy grande, existía una correlación positiva entre la demora en el inicio del tratamiento y la aparición de complicaciones ($p=0.02$) (tabla 27).

Tabla 26. Infecciones más frecuentes detectadas en los pacientes estudiados.

TIPO DE INFECCION	Nº DE PACIENTES	%
Neumonía	4	40
Bronquitis	4	40
Otitis media aguda	1	10
Artritis	1	10
Sepsis	2	20
Sinusitis	1	10
Gastroenteritis aguda	4	40
Meningitis	1	10
Osteomielitis	1	10
Infecciones del tracto urinario	1	10
Encefalitis	1	10

Tabla 27. Perfil de infecciones y desarrollo de complicaciones. FAM: Familia. **Neum:** Neumonía. **Bronq:** Bronquitis. **OMA:** Otitis media aguda. **GEA:** Gastroenteritis aguda. **ITU:** Infecciones del tracto urinario.

FAM	PID	Neum	Bronq	OMA	Artritis séptica	Sepsis	Sinusitis	GEA	ITU	Encefalitis	Miocarditis	Inf. virales	INICIO IGIV* (AÑOS)	COMPLICACIONES*
A	A.1	+		+							+	+	1,6	+
B	B.1	+	+										10	+
	B.2		+					+				+	1	
	B.3												0	
C	C.1	+											1	
D	D.1	+											1,4	
E	E.1					+	+	+				+	1	
F	F.1				+	+		+	+	+		+	12	+
	F.2	+	+					+					1,4	
	F.3												1,4	

* Coeficiente de correlación de Pearson entre la edad de inicio del tratamiento con IgIV y la presencia o no de secuelas o complicaciones $p=0.02$.

4. INCIDENCIA Y PREVALENCIA DEL SÍNDROME DE BRUTON EN LA PROVINCIA DE SEVILLA.

Para calcular la incidencia del síndrome de Bruton en nuestra población se tuvo en cuenta el periodo comprendido entre la fecha de nacimiento del paciente mayor y del paciente más joven incluidos en este trabajo y que hubieran nacido en la provincia de Sevilla.

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística y del Instituto Andaluz de Estadística, la cifra de nacidos vivos en la provincia de Sevilla en el periodo fue de 649.435, por lo que, si consideramos que se han diagnosticado 8 pacientes, la incidencia de la enfermedad para el periodo sería de 1/81.000 nacidos vivos.

Teniendo en cuenta que la población de la provincia de Sevilla era de 1.835.077 habitantes, la prevalencia de la enfermedad sería de 1/230.000 habitantes.

Según el Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias, cuyo funcionamiento se inició en el año 2004, existían 96 casos registrados a fecha

de diciembre de 2008, por lo que, teniendo en cuenta que la población española era de 46.157.822 habitantes, la prevalencia de la enfermedad en España, si todos estuvieran vivos, sería de 1/480.000.

5. RESULTADOS DE LAS MODIFICACIONES INTRODUCIDAS EN EL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE Btk MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las modificaciones introducidas en el método inicial estuvieron encaminadas principalmente a reducir, tanto el tiempo empleado, como el volumen de muestra necesaria para su realización.

Mientras que con la técnica inicial, en la que se empleaba inmunofluorescencia indirecta (Futatani T et al. 1998) el tiempo aproximado de realización era de aproximadamente 5,5 horas, con la primera modificación introducida, también mediante inmunofluorescencia indirecta, se redujo a 3 h y, por último, empleando inmunofluorescencia directa a 2.5 h.

Estas modificaciones fueron ensayadas en 10 individuos control para ajustar la concentración de los diferentes AcMo y en 8 pacientes con síndrome de Bruton con mutaciones en el gen BTK y 7 portadoras ya estudiados por el método tradicional. En las figuras 34 y 35 se muestran los diferentes patrones de expresión de Btk obtenidos.

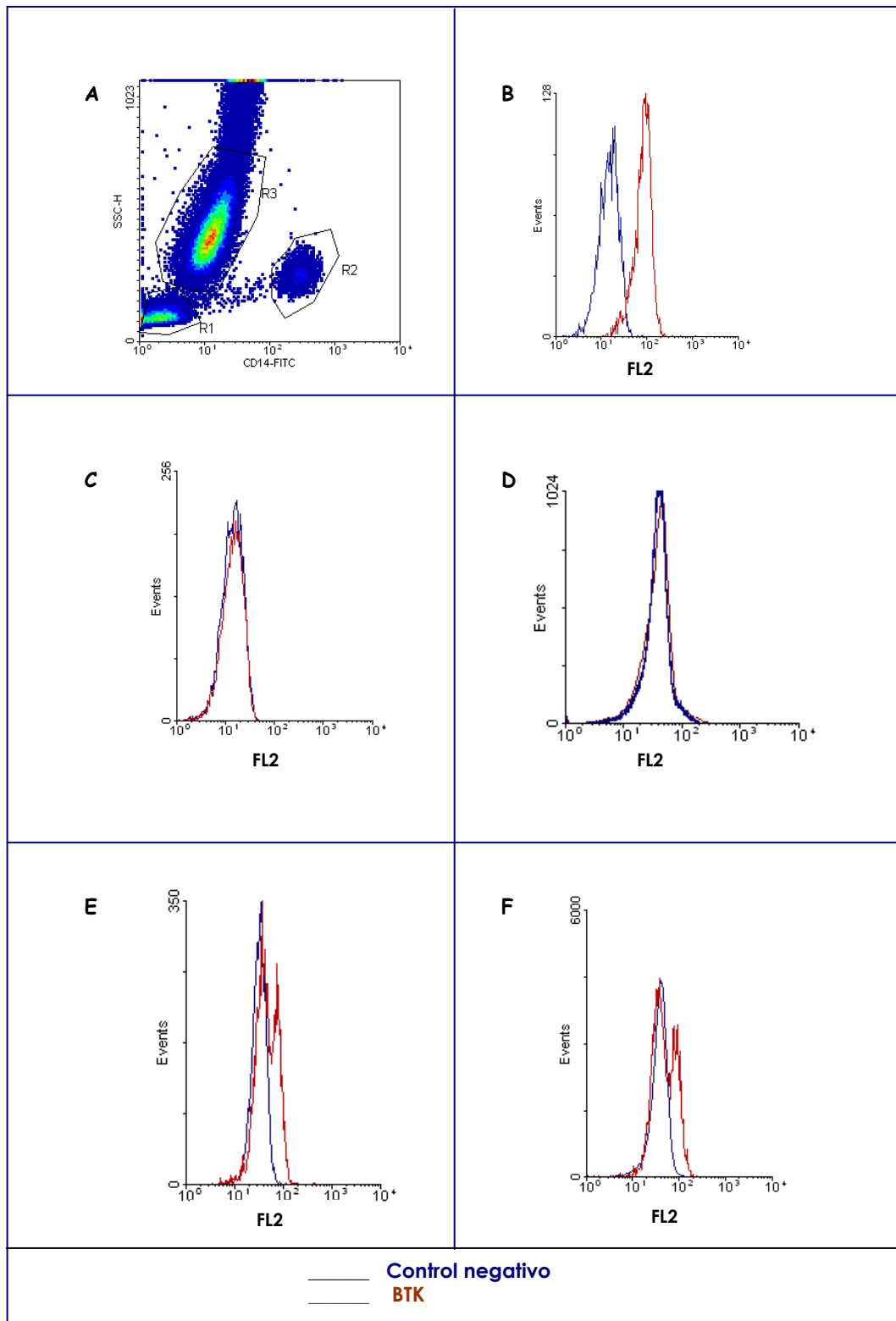
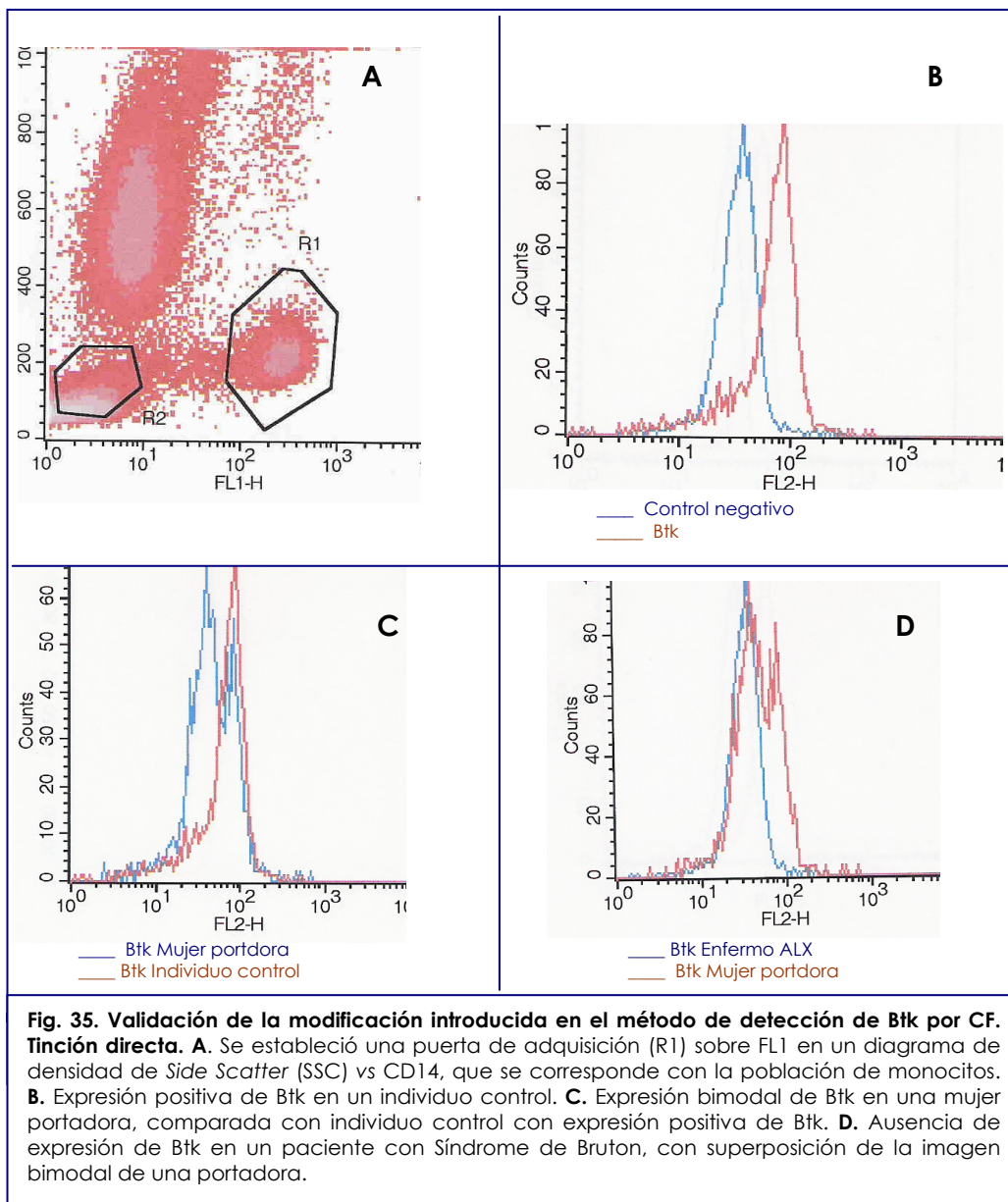


Fig. 34. Validación de la modificación introducida en el método de detección de Btk por CF. Tinción indirecta. A. Se estableció una puerta de adquisición (R2) sobre la FL1 en un diagrama de densidad de Side Scatter (SSC) vs CD14, que se corresponde con la población de monocitos. **B-F.** La evaluación de la expresión de Btk se realizó por separado en un histograma de FL2, donde se observa en color azul las células marcadas con el AcMo Mouse IgG1 como control negativo, a la que se le superpone en color rojo el histograma con las células marcadas con el AcMo Anti-Btk 48-2H. **B.** Expresión positiva de Btk en un individuo control. **C y D.** Ausencia de expresión de Btk en pacientes con Síndrome de Bruton. **E y F.** Expresión bimodal de Btk en dos mujeres portadoras.



DISCUSIÓN

La dificultad en el diagnóstico del síndrome de Bruton, aún siendo una de las inmunodeficiencias primarias mejor caracterizadas, traduce, en parte, la enorme dificultad que conlleva el diagnóstico de las inmunodeficiencias en general y de las menos conocidas en particular. El defecto genético responsable del síndrome de Bruton se conoce desde el año 1993. La gran heterogeneidad de las mutaciones descritas a lo largo de todo el gen BTK y el grado de expresión de la proteína, son responsables de la gran variabilidad fenotípica de la enfermedad. La ausencia de mutaciones en algunos casos, la expresión residual de Btk, así como algunos casos de expresión positiva de Btk y fenotipo compatible con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), o aquellos con antecedentes familiares de la enfermedad que han resultado ser también enfermos, pero que nunca habían presentado clínica, y conocidas como formas variantes (Fontán G 2001), hacen que el diagnóstico de este síndrome sea bastante complejo, de modo que algunos casos de ALX hayan sido catalogados como Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC). Por otra parte, desde el punto de vista del patrón de herencia de la enfermedad, es muy importante, ante un paciente con hipogammaglobulinemia, identificar si se trata de un síndrome de Bruton, ya que el interés de hallar el defecto genético subyacente responde a la necesidad no sólo de identificar tanto a las mujeres portadoras, sino también a las no portadoras y poder realizar diagnóstico prenatal y ofrecer consejo genético.

Debido a la heterogeneidad encontrada al analizar, tanto la forma de presentación clínica, como la expresión de Btk y las alteraciones genéticas que originan el síndrome de Bruton en las diferentes familias estudiadas, la discusión de los resultados se ha realizado caso por caso. A continuación, se discuten las posibles consecuencias de los defectos encontrados en cada familia, el patrón hereditario, las diferentes manifestaciones clínicas y se comparan con los casos descritos anteriormente en la literatura.

1.1. FAMILIA A. Paciente A.1.

La mutación Y598X encontrada en el gen que codifica la proteína Btk en el caso índice de esta familia, provoca la aparición de un codón de

parada que haría que la proteína Btk resultante careciera de los 87 aa carboxi-terminales, lo que daría lugar a una proteína de un 87% de su tamaño normal en caso de ser secretada. La mutación afecta al dominio quinasa de la proteína, que es donde reside la actividad catalítica de la misma. Este defecto daría lugar a una proteína mas pequeña y no funcional en el caso de ser expresada, algo que no ocurre, tal y como ha sido comprobado mediante citometría de flujo. Esta mutación no había sido descrita previamente en la literatura (Fig. 1). Las mutaciones que alteran la pauta de lectura dando lugar a la formación de un codón de parada y frecuente pérdida de la función de la proteína, debido a una conformación inestable, están uniformemente distribuidas a lo largo de todo el gen BTK (Lindwall JM et al. 2005).

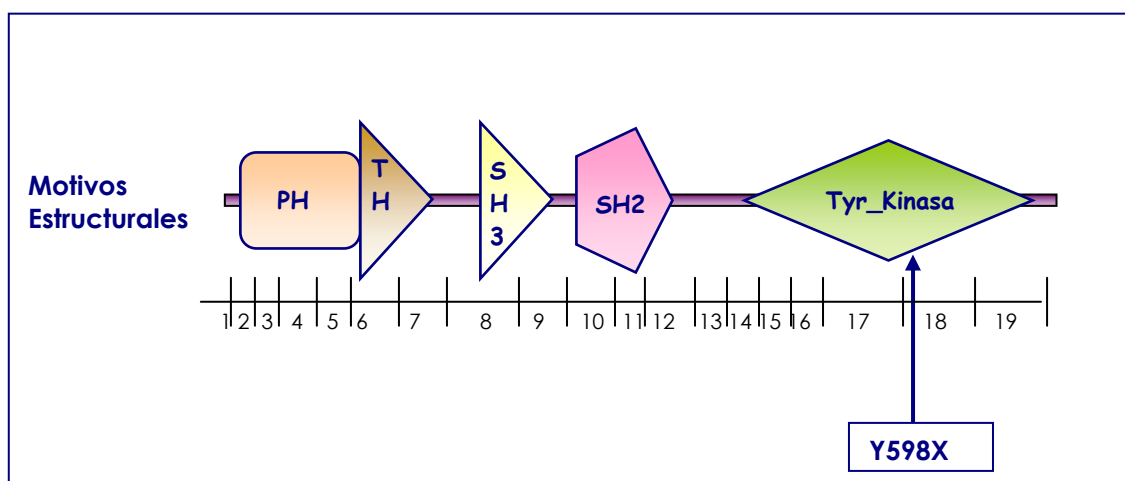


Fig 1. Localización de la mutación encontrada en el paciente 1 A. El gen BTK contiene 19 exones que ocupan 37 kb del ADN genómico. El primer exón y 30 pb del segundo constituyen la región no codificante del mismo. La proteína que codifica consta de 659 aminoácidos distribuidos en 5 dominios. Su estructura multimodular le permite interaccionar con múltiples proteínas. Desde el punto de vista funcional: dominio PH (homología con plecstrina) en la región N-terminal, seguido por el dominio TH (homología con TEC) rico en prolina; dominio SH3 (homología con SH3) que media la unión a proteínas con motivos ricos en prolina; dominio SH2 (homología con SH2) que permite la interacción con motivos de tirosina fosforilada, y una región C-terminal catalítica o dominio SH1 que posee función kinasa.(Fig. tomada de Human Protein Reference Database: www.hprd.org).

Además de otitis y neumonías de repetición por neumococo, una de las primeras infecciones graves que sufrió el paciente al año de vida fue una miocarditis de la que no fue posible identificar el agente causal. En una revisión de 201 pacientes del registro americano de síndrome de Bruton (Wilkenstein JA et al. 2006), se recoge un caso de muerte por miocarditis a

causa de diseminación de enfermedad enteroviral. Una de las principales causas de muerte en estos pacientes son las infecciones por enterovirus, para las que presentan una especial susceptibilidad (Smith E et al. 2007).

Según un trabajo de Lenderman et al. (1985) y las recomendaciones actuales (Smith E et al. 2007), lo ideal sería que el tratamiento con IgIV se iniciara entre las 6 y 8 semanas de edad en estos pacientes, debido a que el 25% de los pacientes con ALX comienzan a mostrar los primeros síntomas antes de los 4 meses de vida coincidiendo con el descenso de la IgG materna y la ausencia de síntesis de inmunoglobulinas propias (Fig. 2). En el paciente A.1 se inició tratamiento sustitutivo con IgIV a los 18 meses de vida y, como consecuencia de infecciones de repetición en el oído medio, presenta actualmente una otorrea crónica como secuela. Se ha descrito en la literatura que el retraso en el diagnóstico y, por consiguiente, en el inicio del tratamiento, puede dar lugar a la aparición de secuelas a largo plazo tales como bronquiectasias, sordera o cirrosis secundaria a hepatitis crónica (Buckley R 2003, Smith E et al. 2007).

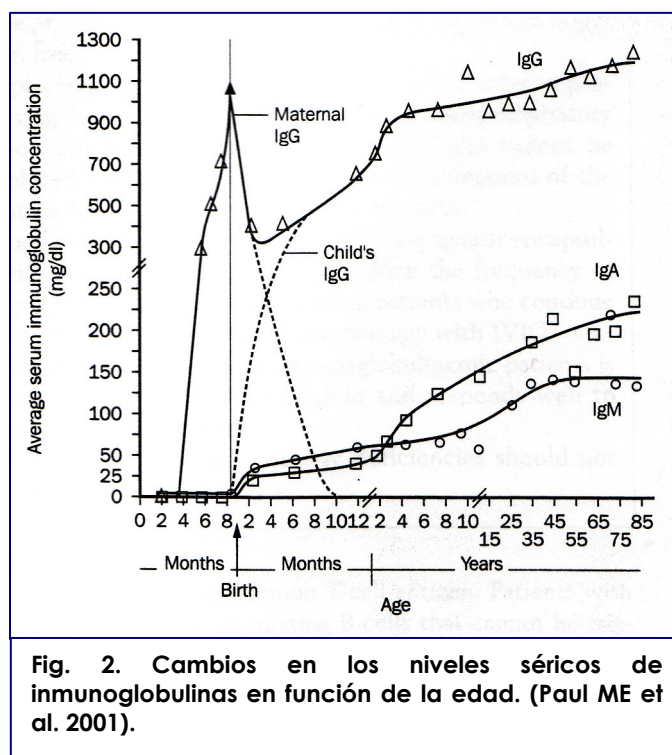


Fig. 2. Cambios en los niveles séricos de inmunoglobulinas en función de la edad. (Paul ME et al. 2001).

Es bastante probable que, según se recoge en la historia familiar del paciente A.1, que su familiar varón por parte de la rama materna fallecido a

los edad temprana, padeciera también un síndrome de Bruton. Entre 1950 y 1980, la mayoría de los pacientes afectados de síndrome de Bruton morían antes de los 20 años de vida. Algunos pacientes no sobrevivían a su primera infección grave; aproximadamente el 20% fallecían a consecuencia de infecciones enterovirales crónicas y un porcentaje importante de los pacientes debido a enfermedad pulmonar crónica (Lederman HM et al. 1985). Los avances logrados, tanto en las herramientas para el diagnóstico como en el tratamiento de esta enfermedad en los últimos 20-30 años, han conseguido que un mayor número de pacientes logren alcanzar la edad adulta, además de una gran mejoría en su calidad de vida (Howard V et al. 2006).

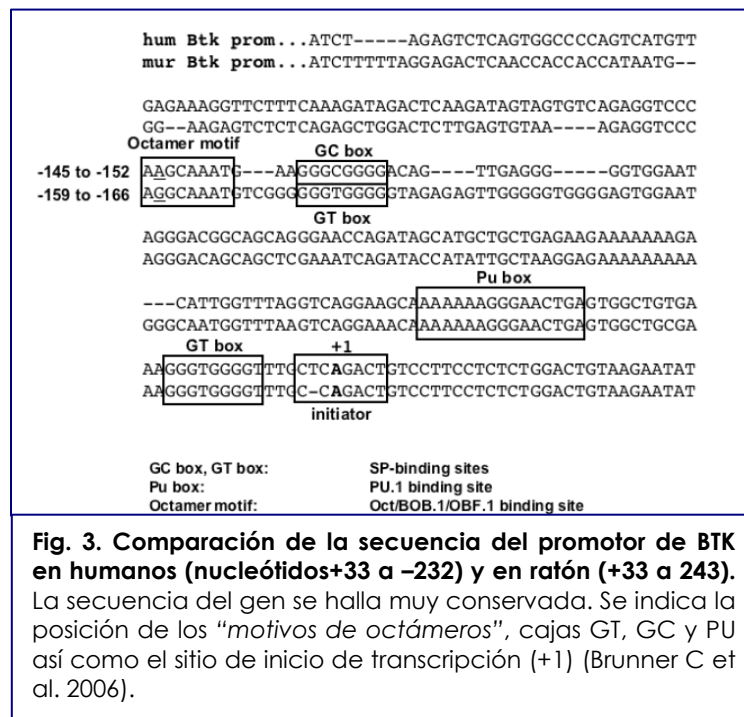
La ausencia de expresión de la proteína Btk detectada mediante citometría de flujo en el caso índice, junto con el resto de los hallazgos de laboratorio, habría sido, en principio, suficiente para establecer el diagnóstico de síndrome de Bruton, ya que existe, además, una correlación completa entre el genotipo, expresión proteica y fenotipo clínico. Sin embargo, la identificación de la mutación responsable en el caso índice ha permitido abordar el estudio del resto de la familia mediante PCR-RFLP de una manera mucho más rápida y sencilla. De esta forma, se cuenta con un análisis genético diseñado exclusivamente para ella y, en el caso de una solicitud de diagnóstico prenatal por parte de otro miembro de la familia, se puede atender la petición con mayor celeridad y certeza.

El estudio de expresión de Btk realizado a la madre y a las posibles portadoras en esta familia, revela, tal y como ya se describe en trabajos previos (Futatani T et al. 1998, Kanegane H et al. 2001), la existencia de un patrón de expresión bimodal de Btk por citometría de flujo en las diferentes portadoras.

1.2. FAMILIA B. Pacientes B.1, B.2 y B.3.

La mutación encontrada en tres miembros de esta familia, los pacientes B.1, B.2 y B.3, consiste en un cambio de G por A en el extremo 5' del exón 1. Mutaciones descritas en zonas adyacentes a esta mutación se corresponden con una disminución muy importante en la actividad transcripcional de BTK

(Rohrer J et al. 1998, Sideras P et al. 1994, Himmelmann A et al. 1996, Eun-Kyeong Jo et al. 2001). El gen que codifica la proteína Btk tiene un tamaño de 37 kb y está dividido en 19 exones, de los cuales, el exón 1 y las 30 primeras bases del exón 2 constituyen la región no codificante (5'UTR) del mRNA de BTK, donde se encuentra la zona de reordenamiento del mismo (Fig. 1). Se han identificado múltiples sitios de inicio de la transcripción que están localizados entre las bases -5 y -30 del exón 1, así como sitios para la unión de factores de transcripción, incluyendo un sitio PU.1 en la posición -61, un sitio Sp1 en la posición -169, un sitio Sp3 en la posición -38, que activan de forma sinérgica al promotor de BTK, además de otros dos elementos reguladores en las primeras 500 pb del intrón 1 (Müller et al. 1996, Eun-Kyeong Jo et al. 2001, Brunner C et al. 2006) (Fig. 3).



También es posible que esta mutación afecte a la especificidad del extremo 5' como sitio de unión de factores de transcripción y que pueda, probablemente, alterar la unión ordenada de estos factores, dando lugar a una iniciación ineficiente de la transcripción. Este hecho se ha tratado de demostrar mediante extracción de mRNA total de muestras de sangre periférica del paciente, retrotranscripción y análisis mediante PCR para comprobar que no existía cDNA de BTK.

La ausencia de expresión de Btk detectada mediante citometría de flujo en los miembros afectados de esta familia, junto con la ausencia de cDNA de BTK indica, de forma indirecta, que no existe mRNA de BTK. La explicación más plausible para ello es que la mutación afecta el paso del DNA genómico que codifica BTK a mRNA, bien porque éste último no se genera o se genera de forma errónea. Mutaciones puntuales en las zonas de "splicing" pueden afectar tanto al tamaño como a la cantidad de mRNA, dando lugar a la no producción de mRNA o a la producción de un transcrito de mRNA defectuoso que pierda una porción importante de la secuencia del gen, o bien que conserve secuencias intrónicas no codificantes en el transcrito (Puck JM et al. 2007). El mRNA defectuoso generado podría dar lugar a un cDNA de secuencia o tamaño anómalo, que pudiera no ser detectado con los cebadores empleados para este trabajo.

Las mutaciones en la región promotora de un gen son, en general, poco frecuentes. En el caso, por ejemplo, de la hemofilia B, que es otra enfermedad ligada al cromosoma X, tan sólo el 1,2% de los pacientes presentan mutaciones en el promotor del gen responsable de la enfermedad (Gianelli F et al. 1996) y en el caso concreto del síndrome de Bruton, tan sólo se ha descrito una mutación puntual en la región promotora del gen BTK (Holinski-Feder E et al. 1998).

Hay que resaltar que, hasta la fecha, no se ha descrito ninguna mutación en el exón 1 del gen BTK. Tan sólo se han descrito tres mutaciones en zonas adyacentes y siempre localizadas en el intrón 1.

Rohrer J et al. presentaron en 1998 un estudio realizado en 4 generaciones de una misma familia, en el que se describía una mutación en la zona de procesamiento del intrón 1, consistente en un cambio T>G en la posición +6 de dicho intrón y cuya consecuencia era la creación de un nuevo sitio de unión de factores de transcripción Sp1 idéntico a otro localizado en la posición +20 y +28 del intrón 1, dando lugar a la producción de niveles muy reducidos de mRNA. Jo et al. en 2001, describen una nueva mutación, consistente en un cambio de G>A en la posición +5 del intrón 1 de BTK, cuya consecuencia final era una actividad transcripcional extremadamente reducida y presencia de cDNA normal. Por otra parte, López-Granados E et al.

describen, en el año 2005, una mutación en la primera base del intrón 1, inmediatamente adyacente a la que se describe en la familia B y en la que no existe tampoco actividad transcripcional.

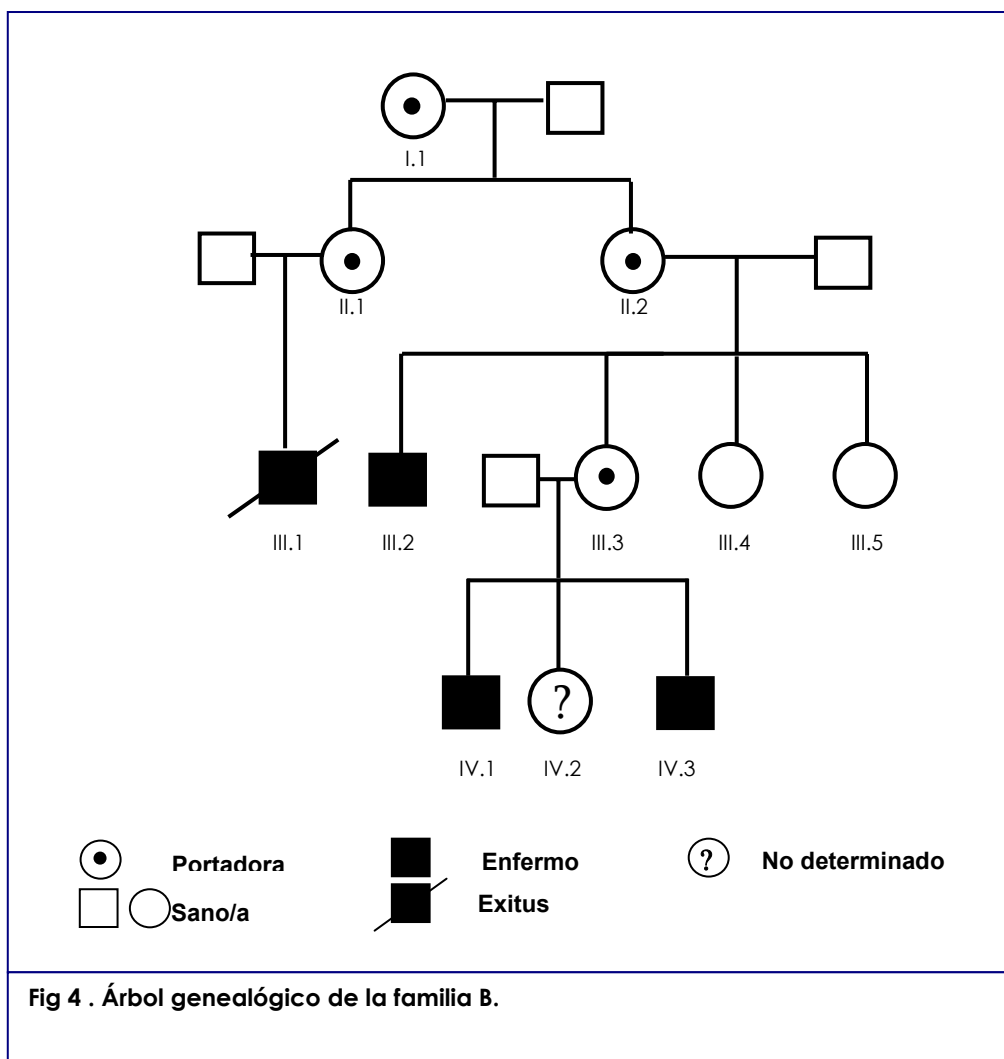
El rastreo completo del gen BTK en los pacientes de la familia B ha confirmado que no existe otro defecto subyacente, ya que el resto del gen presentaba una secuencia silvestre o normal. El hecho de que este defecto no se encuentre en 100 individuos control analizados y que sólo lo presenten los pacientes en hemicigosis y las portadoras en heterocigosis durante cuatro generaciones, indica que se trata del defecto responsable del síndrome de Bruton en esta familia.

Sin un tratamiento adecuado, estos pacientes suelen morir a edades tempranas por infecciones severas o desarrollar patologías pulmonares crónicas que disminuyen la esperanza de vida en la mayoría de los casos (Buckley R 2003). La probabilidad total de desarrollar una enfermedad pulmonar crónica es del 80% después de 17 años de seguimiento (Plebani A et al. 2002). Por lo general, con un diagnóstico y un inicio del tratamiento temprano estos pacientes pueden llevar una vida libre de infecciones, evitando las consecuencias que éstas conllevan (d'Audigier C et al. 2006).

Los avances, tanto en las herramientas para el diagnóstico de ALX, como en los tratamientos empleados (antibióticos e IgIV) han modificado el pronóstico a lo largo de varias generaciones de los miembros de una familia afectados de ALX. Observando el pedigrí de la familia B (Fig. 4), se puede comprobar cómo el individuo I.1 debe ser portadora obligada de la enfermedad y ha engendrado a su vez, dos hijas portadoras. Es interesante destacar que la mujer portadora II.1 tuvo un hijo varón que falleció a edad temprana y que, aunque no disponemos de información completa, debía tratarse de un caso de ALX. Por otra parte, el hijo mayor de la portadora II.2, (Paciente B.1) pudo ser diagnosticado de ALX y recibir tratamiento con IgIV y, a pesar de haber sobrevivido a múltiples infecciones respiratorias, ha desarrollado una enfermedad pulmonar crónica con bronquiectasias. Las generaciones más jóvenes de esta familia presentan un pronóstico más esperanzador. Ya en la cuarta generación, se observa cómo el paciente B.2 (IV.1) fue diagnosticado y tratado a una edad más temprana que el paciente

B.1 y, aún habiendo padecido infecciones de repetición, no presenta, hasta el momento, secuelas de las mismas. Y ya, por último, el paciente B.3 (IV.3), que fue diagnosticado y tratado inmediatamente tras el nacimiento, ni tan siquiera ha sufrido infecciones relevantes. Se puede deducir por ello que, tanto el diagnóstico como el tratamiento precoz contribuyen a mejorar la expectativa y calidad de vida de estos pacientes.

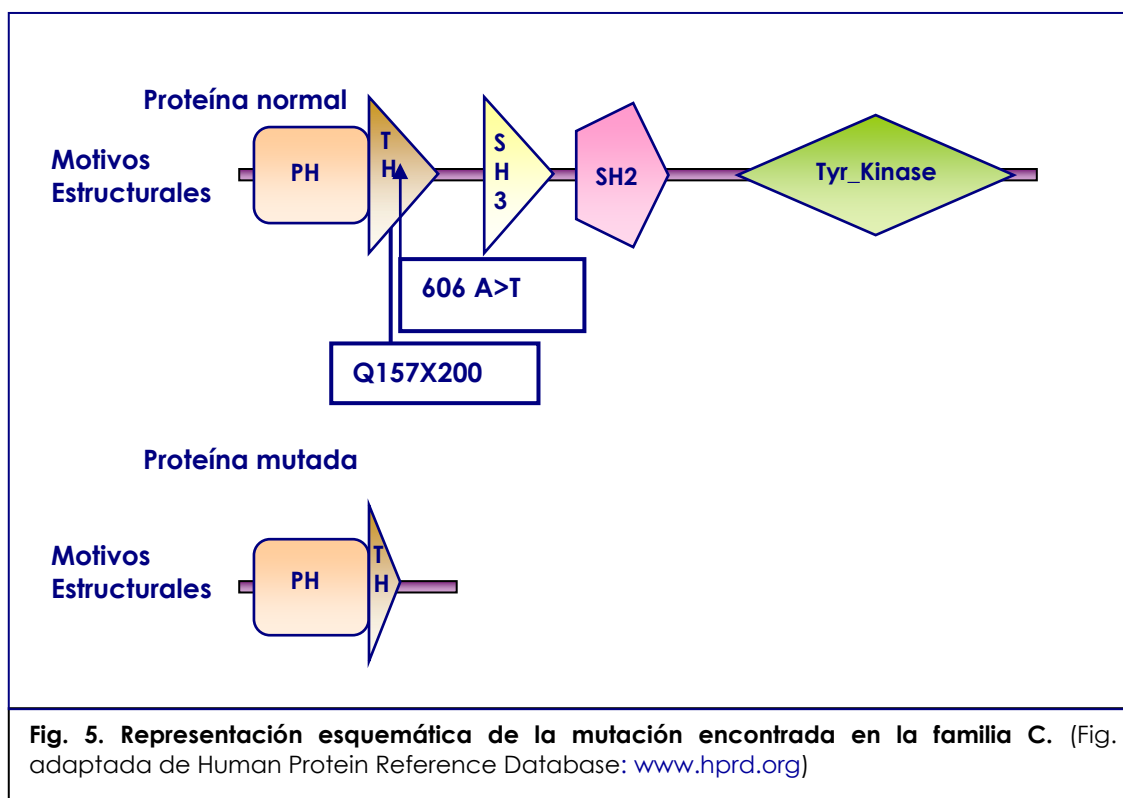
En resumen, las mejoras introducidas en la metodología existente, junto con el diseño de la metodología apropiada para la ampliación del estudio en esta familia ha permitido, por una parte, el diagnóstico precoz de uno de los pacientes, disminuyendo así las probabilidades de padecer complicaciones derivadas de su enfermedad y, por otra parte, se ha determinado la condición de portadoras en varias mujeres de la familia. El hecho de identificar la mutación responsable, permite que exista la posibilidad de ofrecer consejo genético y realizar diagnóstico prenatal si se precisa.



1.3. FAMILIA C. Paciente C.1.

En esta familia se ha encontrado un defecto genético complejo: dos nuevas mutaciones en el exón 6 del gen BTK que no habían sido descritas previamente en la literatura.

Por una parte, una duplicación de 22 pb en la posición 602 del cDNA (ins/dup 602cDNA, Q157X200) que genera un codón de parada en el dominio TH, que daría lugar a una proteína de un tercio de su tamaño normal en caso de ser secretada (Fig. 5).



Existía una expresión residual de Btk en los monocitos del paciente C.1 detectada mediante citometría de flujo. Podría ocurrir que, a pesar de que la mutación genera un codón de parada, se lograra finalmente sintetizar una proteína defectuosa, cuyo tamaño sería un tercio del tamaño normal o que generase un nuevo epítipo y que éste pudiera, finalmente, ser reconocido por el anticuerpo monoclonal empleado (MoAb 48-2H). Este anticuerpo monoclonal fue generado frente al dominio SH3 de la proteína Btk, por lo que,

en principio, no sería posible que reconociese la proteína defectuosa, ya que el codón de parada se genera mucho antes. Sin embargo, Futatani T et al. afirman, en 1998, que el anticuerpo monoclonal 48-2H es también capaz de reconocer algunas proteínas Btk mutadas artificialmente, entre las que se encuentran Arg28Pro, Gln41Lys, Trp124Gly o Tyr223Phe. Por lo que habría sido necesario ampliar el estudio de este paciente con otros anticuerpos monoclonales anti-Btk para confirmarlo.

Desafortunadamente, no se ha podido determinar si existe algún defecto a nivel de mRNA o del cDNA de BTK.

Por otra parte, se describe una segunda mutación consistente en un cambio A>T en la posición 606 del DNA (606 A>T), localizada también en la región TH. Esta región, por lo general, suele estar menos afectada que el resto de los dominios por mutaciones de cambio de sentido (missense). Este cambio, por sí solo, no provocaría ningún cambio de aminoácido en la secuencia normal, por lo que podría incluso tratarse de un polimorfismo, aunque no ha sido descrito previamente en la literatura.

Se ha podido comprobar, mediante secuenciación, que ambas mutaciones proceden de la madre, y que ambas proceden del mismo alelo.

1.4. FAMILIA D. Paciente D.1.

El patrón encontrado en el análisis de la expresión de Btk mediante CF, junto con el número reducido de linfocitos B, nos confirmó el diagnóstico previo de síndrome de Bruton en el paciente D.1. La madre del paciente presentaba un patrón de expresión de Btk mediante CF que demostraba ser portadora de la enfermedad. A pesar de haber rastreado todo el gen BTK en el paciente y en la madre, tanto en la región codificante y en, al menos 50 pares de bases en las regiones limítrofes exón/intrón, no se ha conseguido encontrar mutación alguna que justifique la ausencia de expresión de Btk .

Aproximadamente en un 15% de los pacientes con fenotipo de ALX, aún con ausencia de expresión de la proteína, no se encuentra ninguna mutación en el gen BTK (Conley ME et al. 1998, Aghamohammadi A et al. 2006, Smith E et

al. 2007). Gaspar et al. describen, en 1998, dos casos de ALX donde no encuentran ninguna mutación, en ausencia de expresión de Btk que confirmaban su deficiencia. En ambos casos había expresión de mRNA, pero no había proteína, lo que atribuían a una inestabilidad de la proteína mutante. Por otra parte, Hashimoto S et al. en 1996, describen algunos pacientes que reúnen los criterios diagnósticos de síndrome de Bruton y, a pesar de mostrar una ausencia de actividad quinasa de la proteína, no presentan mutaciones en regiones codificantes del gen BTK.

Ello puede ser debido a la incapacidad del método empleado para identificar la mutación ante la existencia, en algunos casos, de duplicaciones de exones completos (Kristufek K 2006). No obstante, una ausencia selectiva de mRNA de BTK o de la proteína se considera suficiente para establecer el diagnóstico de síndrome de Bruton (Smith E et al. 2007).

Las mutaciones pueden localizarse en secuencias reguladoras o intrónicas, alterando la expresión o la función de la proteína. Las variantes que afectan a los niveles de expresión del gen no siempre están junto a la secuencia codificante, se conocen ejemplos de regiones control, potenciadoras ("*enhancers*"), y otras secuencias que alteran la expresión y que están a 10, 100 ó más kb de distancia de las secuencias codificantes en las que influyen. Se han descrito mutaciones en la zona promotora del gen a cientos de bases de distancia de la región codificante (Puck JM et al. 2007).

El estudio de los diferentes haplotipos formados por 4 polimorfismos conocidos en el gen BTK en los miembros de esta familia ha permitido descubrir que el paciente y su hermano han heredado, cada uno, un cromosoma X diferente de la madre. Aunque no haya sido posible encontrar la mutación responsable, sería posible emplear estos polimorfismos, junto con la expresión de la proteína Btk mediante CF, como marcadores para identificar el alelo asociado a la condición deficiente en el estudio de nuevas portadoras en la familia. En un trabajo realizado por Hagemann TL et al. en 1995 se emplearon dos polimorfismos, uno en la posición +70 y otro en la posición +78 del intrón 8, para comprobar el origen ligado al cromosoma X de la enfermedad durante cuatro generaciones, sugiriendo que puede ser útil, en combinación con el otro polimorfismo del exón 18, para determinar la trazabilidad del alelo

asociado con la condición deficiente en aquellos pacientes en los que no se ha podido encontrar una mutación. Por otra parte, previo al descubrimiento del gen BTK como responsable de la enfermedad, se empleaba el estudio de marcadores en el DNA del locus ligado a la enfermedad, es decir, en el cromosoma X, para la detección de portadoras y realizar diagnóstico prenatal (revisado en Sideras P et al. 1995), pudiendo aún ser empleado en familias en las cuales, no se ha identificado una mutación en el gen BTK (Smith E et al. 2007).

No se han podido realizar estudios adicionales para comprobar la expresión de mRNA o la existencia de cDNA.

1.5 FAMILIA E. Paciente E.1.

Es interesante resaltar que el primer hallazgo que motivó el estudio de este paciente fue la presencia de neutropenia, que precedió al inicio de los síntomas, a los 5 meses de vida. Las infecciones de repetición, seguidas de una sepsis por *pseudomonas*, motivaron que la sospecha diagnóstica en este paciente fuera de un posible síndrome de inmunodeficiencia, siendo catalogado inicialmente como IDVC al carecer de antecedentes familiares.

Son varios los trabajos publicados que coinciden en que la neutropenia asociada al síndrome de Bruton aparece con mayor frecuencia entre individuos sin antecedentes familiares de enfermedad, como el caso que nos ocupa. En un trabajo de Plo-Rodríguez et al. (1999), el 10,81% de los pacientes estudiados presentaban neutropenia, siendo ésta, a su vez, más frecuente dentro del grupo de pacientes sin antecedentes familiares de ALX (15% frente al 5,88% en el grupo de pacientes con antecedentes familiares de ALX).

Farrar JE et al. (1996) encuentran que un 26% de los pacientes en los que se hallaban mutaciones en BTK habían experimentado episodios de neutropenia severa. La mayoría de ellos no tenían antecedentes familiares de inmunodeficiencia. Éstos pacientes eran diagnosticados antes del primer año de vida y la presencia de neutropenia, en la mayoría de los casos, era el signo que precipitaba su estudio para el diagnóstico de una posible

inmunodeficiencia. En 6 de 13 pacientes la neutropenia se asoció con sepsis por *pseudomonas* o *estafilococos*.

Los episodios de neutropenia tienen lugar antes del tratamiento sustitutivo con inmunoglobulinas (Plo-Rodríguez E et al. 1999), coincidiendo con la presencia de infecciones. Kanegane H et al. (2005) registran un 18% de neutropenia entre los pacientes japoneses con ALX y dos muertes a consecuencia de una sepsis por *pseudomonas* antes del inicio con IgIV.

Aunque la presencia de neutropenia no se ha asociado con ninguna mutación concreta, sí que se ha observado que la mayoría de las mutaciones encontradas en estos pacientes provocan la ausencia de expresión de Btk o se trata de sustituciones de aminoácidos en sitios críticos para la función de la proteína.

A lo largo de los años se ha postulado, en algunos trabajos, que otras células hematopoyéticas, además del linaje B, podrían verse afectadas por la ausencia de Btk, pero tan sólo la granulocitopenia permanece como un hallazgo frecuente y se interpreta como secundaria a infecciones de repetición (Kozlowski C et al. 1991, Farrar JE et al. 1996). A pesar de la demostración de que Btk se expresa en otras células que no son linfocitos B, tales como monocitos, granulocitos y plaquetas, hasta el momento no hay evidencia de que un defecto funcional en otras células que no sean de la estirpe B contribuya al fenotipo de ALX (Futatani T et al. 1998, Smith E et al. 2007).

Probablemente Btk no sea necesaria para un funcionamiento normal de los neutrófilos en circunstancias normales, pero se postula que pueda jugar un papel importante en condiciones de estrés como puede ser, por ejemplo, una infección bacteriana (Farrar JE et al. 1996).

Por otra parte, la asociación entre neutropenia y ALX parece ser suficientemente frecuente como para incluir a esta última en el diagnóstico diferencial de la neutropenia durante la infancia (Plo-Rodríguez E et al. 1999).

La no detección de la proteína mediante CF, que ha sido realizada en varias ocasiones a lo largo de la vida del paciente, en presencia de mRNA, podría ser explicada por una inestabilidad de la proteína mutante. Gaspar HB et al. (1998) describen dos casos de ALX en los que no se encuentra ninguna

mutación, aún con ausencia de expresión de Btk que confirmaba su deficiencia. En ambos casos había expresión de mRNA, pero no de proteína, tal y como ocurre en este paciente, atribuyéndolo también a una inestabilidad de la proteína mutante. Otra explicación plausible para nuestro resultado sería la incapacidad del anticuerpo monoclonal empleado para detectar una proteína aberrante (Smith E et al. 2007). Como se ha discutido en el caso anterior, el anticuerpo monoclonal empleado (48-2H) está dirigido frente al dominio SH3 de la proteína. Curiosamente, la única variante encontrada en el estudio de este paciente se corresponde con un cambio, no descrito previamente, de T>G en la posición 789 del cDNA, que se corresponde con la posición +69 del exón 8, que codifica parte del dominio SH3 (Fig. 1). Este cambio, sin embargo, no provoca ningún cambio de aminoácido (V219V), no siendo previsible que induzca ninguna alteración en la proteína. Aunque no ha sido posible confirmarlo, lo más probable es que se trate de un polimorfismo.

Al igual que el caso anterior, la ausencia de mutaciones en este paciente, puede estar determinada por la incapacidad del método empleado para su detección, o bien porque la mutación responsable se encuentre localizada en secuencias reguladoras o intrónicas, a una gran distancia de las secuencias codificantes en las que influyen, alterando la expresión o la función de la proteína. En cualquier caso, la ausencia selectiva de la proteína se considera suficiente para establecer el diagnóstico de síndrome de Bruton (Smith E et al. 2007).

El diagnóstico de ALX suele ser sospechado cuando existe una hipogammaglobulinemia acompañada de antecedentes familiares; sin embargo, más del 50% de pacientes con mutaciones en el gen BTK no tienen una historia familiar de enfermedad (Conley ME et al. 1998). Basándonos en el estudio practicado mediante CF en el paciente y en la madre indicaría que se trata de un defecto "de novo" en el paciente.

Se podría pensar, en principio, que la expresión positiva de Btk en la madre excluiría su condición de portadora, y podría indicar que la mutación está producida "de novo" en el paciente sobre las células germinales de origen materno (Kanegane H et al. 2001). Sin embargo, la expresión positiva de Btk en la madre puede ser justificada de dos maneras: en primer lugar porque,

efectivamente, presente un fenotipo/genotipo silvestre en Btk (es decir, ausencia de mutaciones), en cuyo caso el paciente sería ALX "de novo". Y, en segundo lugar, porque la madre presente un fenotipo de expresión normal de Btk por CF y un genotipo de portadora debido a una lionización extrema del cromosoma X, al haberse inactivado preferentemente el cromosoma X con el gen defectuoso. Este hecho, al parecer, sucede al avanzar la edad de la portadora y explicaría que, en algunos casos, la madre no parezca portadora a pesar de que el análisis genético lo confirme (Busque L et al. 1996). En un trabajo realizado por Kanegane T et al. (2001) sobre 13 madres de pacientes con ALX que mostraban expresión normal de Btk mediante CF, se observó que 4 de ellas, sorprendentemente, eran heterocigotas para alguna mutación en el gen BTK a pesar de tener una expresión normal de Btk, posiblemente como consecuencia de una inactivación sesgada del cromosoma X "enfermo" en todas las células B. El caso más extremo publicado es el de una niña, hija de un varón con ALX, que, genotípicamente, era portadora del defecto y, sin embargo, fenotípicamente mostraba un síndrome de Bruton por inactivación sesgada del cromosoma X portador del gen BTK silvestre (Takada H et al. 2004).

Éste hecho pone de manifiesto una de las limitaciones de la CF para el diagnóstico de portadoras, ya que la presencia de Btk no excluye la posibilidad de una inactivación sesgada de uno de los cromosomas X de la madre a favor del cromosoma sano. En estos casos es necesario realizar siempre el estudio genético.

El análisis de los polimorfismos del gen BTK no resulta de utilidad en esta familia para el estudio de posibles portadoras y nuevos varones afectados de ALX, dado que sólo se dispone de un hijo varón para poder realizar el análisis y además la madre es heterocigota para una sola de dichas variantes, por lo que habría que recurrir a otro tipo de marcadores localizados en el cromosoma X.

1.6. FAMILIA F. Pacientes F.1, F.2 y F.3

Estos pacientes presentan la misma mutación descrita para la familia B, consistente en un cambio de G>A en el exón 1 del gen BTK. Como se ha discutido anteriormente, el exón 1 y parte del exón 2 no son codificantes, pero albergan zonas importantes para la regulación del mRNA. Curiosamente, al contrario que en la familia B, en este paciente encontramos una expresión muy reducida de proteína Btk mediante CF, tanto en él como en la madre, en ausencia de mRNA de BTK. Este hecho podría ser explicado por la presencia un transcrito de mRNA defectuoso que pierda una porción importante de la secuencia del gen, o bien que conserve secuencias intrónicas no codificantes en el transcrito (Puck JM et al. 2007). El mRNA defectuoso generado podría dar lugar a un cDNA de secuencia o tamaño anómalo, que pudiera no ser detectado con los cebadores empleados para este trabajo, pero que, finalmente, consiguiera dar lugar a una proteína Btk "anómala", que pudiera ser detectada por el anticuerpo monoclonal empleado.

Existen numerosos trabajos publicados tratando de establecer una correlación entre genotipo y fenotipo en el síndrome de Bruton. En estos trabajos el grado de severidad en la clínica de los pacientes es evaluada en función del inicio temprano de los síntomas, ingresos hospitalarios frecuentes e infecciones con consecuencias graves. Los criterios empleados para considerar una mutación como severa es que ésta de lugar a alteraciones en la pauta de lectura, provoque la aparición de un codón de parada o deleciones y mutaciones en zonas de procesamiento. Sin embargo, no ha sido posible establecer, hasta el momento, una relación genotipo/fenotipo en el síndrome de Bruton (López-Granados E et al. 2005, Broides P et al. 2006, Teimourian S et al. 2008).

Por otra parte, se han descrito casos en la literatura donde familias con la misma mutación presentan variabilidad en la forma de presentación de la enfermedad, oscilando entre muerte a edades tempranas por infecciones graves, e individuos que permanecen asintomáticos, aún sin tratamiento sustitutivo con IgIV, hasta la quinta década de la vida (Bykowsky MJ et al.1996,

Kornfeld SJ et al. 1997, Teimourian S et al. 2008). La variabilidad fenotípica en individuos de una misma familia con la misma mutación es difícil de explicar.

Bykowsky MJ et al. describieron, en 1996, una familia en la que varios miembros con una misma mutación que afectaba al codón de inicio (134T>C, Met>Thr) del gen BTK, presentaban diferentes fenotipos, no hallando ninguna otra mutación que lo justificara, y postularon que alguno de los hermanos pudiera ser portador de una segunda mutación en zonas intrónicas o reguladoras del gen BTK que pudiera afectar a la expresión de la primera mutación. Ésta sería una posible explicación para las diferencias halladas en este trabajo entre la familia B y la familia F, que son portadoras del mismo defecto. Los tres pacientes de la familia F presentan una expresión muy reducida de Btk, acompañada de un inicio, en general, más tardío de los síntomas, mientras que en la familia B todos los pacientes presentan una expresión completamente negativa de Btk, siendo el inicio de los síntomas más precoz (exceptuando al paciente B.3, en el que se inició el tratamiento con IgIV a los pocos días de vida).

También existen diferencias en el fenotipo entre los pacientes de la familia F. En el paciente F.1 de esta familia, el inicio de los síntomas se demoró hasta los 2 años de edad y el paciente F.3 se diagnosticó a los 18 meses de vida, momento en el que se le instaura tratamiento sustitutivo con IgIV, habiendo permanecido asintomático en todo momento y presentando, además, niveles normales para su edad de IgG3, aunque su capacidad para producir anticuerpos no pudo ser evaluada. Sin embargo, el paciente F.2 presentó síntomas a una edad muy temprana; a los 3 meses de vida. Es posible que, en el caso de este paciente, la cardiopatía de base que sufre haya precipitado el inicio de los síntomas. En esta patología, tanto la arteria pulmonar como la aorta, surgen del ventrículo derecho y, debido a que la arteria pulmonar recibe sangre de ambos ventrículos en lugar de sólo el ventrículo derecho, el flujo en los pulmones aumenta (Park MK 2008). Los pacientes con patologías cardíacas con plétora pulmonar presentan un aumento de las infecciones respiratorias (Freed MD 2002). Esta patología, añadida a la mayor susceptibilidad a padecer infecciones que confiere el

síndrome de Bruton, pueden haber contribuido a que este paciente haya manifestado síntomas de forma precoz.

En ciertos casos, una actividad parcial o defectuosa de la proteína es la causante de las formas variantes de la enfermedad, pudiendo coexistir en una misma familia que comparte la misma mutación, casos con fenotipo típico de la enfermedad con casos que presentan una clínica o fenotipo celular atípico, o incluso sin clínica de ALX (Fontán G 2001). Factores ambientales, así como la redundancia del sistema inmune, pueden ser responsables de las diferencias fenotípicas entre individuos portadores de la misma mutación en BTK, de manera que puede suceder que otros genes o productos génicos influyan en la regulación de la transcripción del mRNA, o bien que otras quinasas puedan sustituir a Btk en aquellos pacientes que presentan un fenotipo menos severo (Bykowsky MJ et al. 1996, Kornfeld SJ et al. 1997).

La existencia de un ancestro común entre la familia F y la familia B no ha podido ser confirmada, ni siquiera con el análisis de los polimorfismos conocidos y ya descritos anteriormente para el gen BTK.

El deterioro neurológico del paciente F.1 puede ser atribuible a una infección por enterovirus. Estos pacientes son susceptibles de padecer infecciones por enterovirus que causan meningoencefalitis y encefalitis crónica progresiva como complicación grave de la misma, pudiendo transcurrir un intervalo considerable entre el inicio de la infección en el sistema nervioso central y la aparición de síntomas severos (Smith E et al. 2007). Otras posibilidades, tales como una enfermedad por depósito, han sido descartadas en este paciente. El inicio precoz del tratamiento con dosis altas de inmunoglobulinas o incluso su administración intraventricular es el único tratamiento que se ha mostrado eficaz para este tipo de infecciones, posiblemente debido a un efecto antiinflamatorio (Quartier P et al. 2000). También se ha propuesto elegir la preparación de inmunoglobulinas con un mayor título de anticuerpos específicos frente al agente viral en los casos en que éste sea identificado (Smith E et al. 2007).

Curiosamente, aunque la infusión periódica de IgIV consigue que se mantengan niveles satisfactorios de anticuerpos circulantes, los pacientes con ALX sufren infecciones crónicas y potencialmente fatales por enterovirus (virus

ssRNA) (McKinney RE et al. 1987). La razón por la que estos pacientes presentan una mayor susceptibilidad a padecer este tipo de infecciones no es aún bien conocida, siendo, de hecho, la mayor causa de mortalidad en ALX (Halliday E et al. 2003). Se sabe muy poco acerca de la función de Btk en las células de estirpe mieloide y, aunque todavía queda mucho camino por recorrer, se ha implicado muy recientemente a la Btk en la respuesta inmune frente a virus de cadena sencilla de RNA (ssRNA), a través de los receptores TLR (Toll-like receptors); habiéndose observado que las células dendríticas de los pacientes deficientes en Btk presentaban una disminución muy marcada de la producción de IL-6 y de TNF- α en respuesta a la estimulación con virus ssRNA a través de TLR-8 (Sochorova K et al. 2007).

Dada la importancia crucial del reconocimiento del patógeno para el mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia, los mamíferos han desarrollado mecanismos múltiples y redundantes de vigilancia que proveen de protección suficiente frente a la mayoría de infecciones. Esta redundancia queda reflejada en los TLRs. Los TLRs son cruciales para el reconocimiento de patógenos a través de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), que son estructuras únicas de los microorganismos y ampliamente distribuidas entre los diferentes agentes infecciosos. Btk es fosforilada en respuesta a la estimulación de TLR-4 por LPS (lipopolisacáridos) y se asocia con los dominios de señalización citoplasmáticos de los TLR 4, 6, 8 y 9 conocidos como TIR (Toll-interleucina-1 receptor) (Horwood NJ et al. 2003, Kaisho T et al. 2006). El reconocimiento de PAMPs por su correspondiente TLRs da lugar a la activación de la célula presentadora de antígeno, principalmente células dendríticas, y representa un paso clave en el inicio de la respuesta inmune innata y adaptativa. Un TLR puede ligarse a múltiples vías de señalización a través de diferentes proteínas adaptadoras. Sin embargo, un defecto sutil en la vía de señalización puede causar un aumento de la frecuencia de infecciones por un patógeno concreto.

El hallazgo de una respuesta alterada de TLR-8 es interesante con respecto a la presentación clínica de los pacientes con ALX. La deficiencia de Btk no afecta al número ni a la maduración de las células dendríticas (Gray P et al. 2006), pero sí a su respuesta frente a determinados estímulos (ssRNA), lo

cual explicaría la mayor susceptibilidad de los pacientes con ALX a padecer infecciones por enterovirus (Sochorova K et al. 2007).

Con respecto a la artritis, su origen no está bien identificado. Se ha descrito la presencia de artritis hasta en el 20% de los pacientes con ALX, que suele ser monoarticular, aunque también se incluyen poliartritis. La causa de la artritis en estos pacientes suele ser, con frecuencia, desconocida, incluyendo un origen infeccioso que, hasta ahora, no ha podido ser constatado, aunque menos de la mitad de los episodios son debidos a infecciones piógenas. En contraste con la IDVC, el síndrome de Bruton no parece predisponer a padecer enfermedades autoinmunes y, debido a la agammaglobulinemia de base de estos pacientes, el estudio de autoanticuerpos no tiene ningún valor (Smith E et al. 2007).

En resumen, el diagnóstico precoz tanto del paciente F.2, que presenta una forma clásica de ALX, como del paciente F.3, que presenta una forma variante, ha permitido que ambos hayan sido tratados también de forma precoz, lo que muy probablemente contribuirá a mejorar su calidad de vida. Además, la identificación del defecto genético subyacente en esta familia ha permitido, por una parte identificar a las mujeres portadoras en la familia y por otra, no menos importante, identificar a las no portadoras.

La incidencia del síndrome de Bruton en la provincia de Sevilla para un periodo de 30 años es de 1/81.000 nacidos vivos y la prevalencia de 1/230.000 habitantes. Los datos publicados acerca de la incidencia del síndrome de Bruton son variables, oscilando entre 1/200.000 nacidos vivos (Chun JK et al. 2008) y 1/379.000 en el registro americano de inmunodeficiencias (Winkelstein JA et al. 2006). Esta proporción puede variar, además, según las razas. Esto es debido a que los datos se basan en el análisis de los pacientes que sobreviven a la enfermedad y pueden estar influenciados por distintos factores, tales como la evolución de los métodos diagnósticos y del tratamiento de la enfermedad, por lo que es posible que la incidencia real de la enfermedad sea mayor que la descrita (Smith E et al. 2007). Los avances conseguidos en el desarrollo de las herramientas disponibles para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, han hecho que la prevalencia haya aumentado y, por

consiguiente, el número de pacientes inscritos en los registros (Kanegane H et al. 2000).

RESUMEN

Los 10 pacientes diagnosticados en este trabajo cumplen los criterios de diagnóstico definitivo de síndrome de Bruton, suponiendo el 1,67% del total de inmunodeficiencias primarias y el 2,37% de los defectos de anticuerpos diagnosticados en el Servicio de Inmunología. Todos presentan una expresión negativa o muy reducida de Btk mediante CF. Pese a no incluir un número muy elevado de pacientes, se observa la diversidad, tanto en las herramientas que se han precisado para llegar a su diagnóstico, como en la forma de presentación clínica. De esta manera, se hallan representados muchos de los posibles "patrones" conocidos de esta IDP: pacientes con y sin historia familiar, ausencia de expresión de la proteína con y sin presencia de mRNA, pacientes en los que se ha hallado el defecto genético responsable y pacientes en los que no ha sido posible.

Se han encontrado mutaciones en el gen BTK en 4 de las 6 familias con fenotipo de ALX analizadas (80%). La proporción de pacientes en los que no se ha encontrado mutación es comparable a la de otros trabajos (Hagemann TL et al. 1994, Conley ME et al. 1994, Bradley LA et al. 1994).

La instauración precoz de la terapia de reemplazo con IgIV, disminuye el número de ingresos hospitalarios y la morbilidad para las complicaciones crónicas. En nuestro trabajo existe una asociación estadísticamente significativa entre la demora en el inicio del tratamiento con IgIV y la aparición de complicaciones a largo plazo. Dos pacientes asintomáticos se han beneficiado del diagnóstico y tratamiento precoz de la enfermedad.

En 8 de los pacientes estudiados, la detección (como etapa final) del defecto genético subyacente responsable permitió diseñar un método adaptado para cada familia, pudiendo diagnosticar a otros familiares afectados e individuos pertenecientes a familias distintas con el mismo defecto genético, así como identificar con certeza a las portadoras, descartar a dos

mujeres como portadoras y poder hacer un diagnóstico prenatal seguro, en el caso de que fuera solicitado.

Una de las reflexiones que pueden obtenerse de este trabajo, es que, aunque el síndrome de Bruton es una de las Inmunodeficiencias Primarias tal vez mejor caracterizadas, su diagnóstico sigue resultando complejo. Son varios los trabajos que muestran que parte de los pacientes con hipogammaglobulinemia que figuran en los registros de inmunodeficiencias primarias, y diagnosticados de IDVC, en realidad se trata de pacientes con Síndrome de Bruton (Kanegane H et al. 2000, Wilkenstein JA et al. 2006). La gran variedad de mutaciones en el gen BTK hace que el estudio genético de estos pacientes se deba realizar de forma particular para cada familia, pudiéndose invertir en ello varios meses. Otra dificultad a la hora del diagnóstico son las formas variantes que se presentan con clínica o analítica atípica, y que tienen en algunos casos un correlato a nivel molecular, mientras que otras veces se desconoce su causa.

Deleciones o mutaciones diversas en un mismo gen pueden, dependiendo de su localización, generar alteraciones cuantitativa y cualitativamente diferentes. Así, puede no expresarse su producto, expresarse parcialmente o expresarse normalmente, lo que puede acompañarse de carencia de actividad o de actividad residual. Una actividad residual puede atenuar o hacer diferente la expresividad clínica de una enfermedad. Ésto puede explicar algunas de las formas variantes, pero en otros casos nos encontramos que una misma alteración génica produce manifestaciones distintas en personas afectas de una misma familia. En estos casos se sospecha una influencia significativa de factores ambientales o que la heterogeneidad de otros loci puedan modular la actividad del gen o de su producto. Todos estos ejemplos recalcan que, si bien las IDP suelen ser sospechadas mayoritariamente por pediatras, en algunos casos pueden llegar sin diagnóstico a internistas o a especialistas de adultos. Además, es necesario conocer la clínica y analítica de estas formas variantes para realizar un diagnóstico precoz, requisito esencial para un buen resultado terapéutico (Fontan G 2001).

La incidencia del síndrome de Bruton en la provincia de Sevilla es superior a las cifras publicadas, posiblemente debido un alto índice de sospecha de la enfermedad por parte de los pediatras y por la correcta aplicación del algoritmo diagnóstico, que posibilitan la caracterización de estos pacientes.

El análisis de expresión de Btk debe ser realizado como un escrutinio inicial en el diagnóstico de ALX a todos los varones con hipogammaglobulinemia y número reducido de linfocitos B, presenten o no historia previa de enfermedad. Una vez optimizado, resulta un método relativamente simple, poco costoso y rápido en su realización. El diagnóstico de ALX, en caso de ausencia de expresión, puede estar disponible en unas 3 horas. Posteriormente, habría que proceder al análisis genético, que se puede realizar de forma programada.

La cuantificación de la proteína por CF es un primer filtro fundamental, habiendo mostrando su utilidad en los casos en que no ha sido posible identificar la mutación. La combinación de este método con el análisis molecular posibilita el diagnóstico de portadoras y no portadoras, lo que es esencial para poder realizar diagnóstico prenatal y el subsiguiente consejo genético siendo, de esta forma, ambos métodos complementarios.

El tratamiento sustitutivo del gen defectuoso sería sin duda, el futuro óptimo para aquellas enfermedades causadas por defectos monogénicos, especialmente de las células hemopoyéticas que son relativamente fáciles de manipular (Español T 2001). Es posible que en un futuro, a un plazo aún por determinar, una vez que se resuelvan los problemas técnicos actuales, y evaluando la relación riesgo-beneficio, estos pacientes puedan beneficiarse de los avances que se están produciendo en la actualidad en la investigación con células madre. Para que esto fuera posible, sería necesario conocer el defecto genético subyacente.

el análisis genético se encontró la misma mutación que en su tío, Y598X. El análisis genético del gen BTK mediante PCR-RFLP, dado que la mutación responsable del defecto en la familia A era conocida, confirmó el diagnóstico de síndrome de Bruton a los pocos días de su nacimiento, instaurándose tratamiento sustitutivo con IgIV, no habiendo precisado de ingresos hospitalarios hasta la fecha.

CONCLUSIONES

- 1.** A lo largo de 9 años de estudio sistemático de deficiencias inmunitarias en el Hospital Universitario Virgen del Rocío hemos detectado diez casos de síndrome de Bruton pertenecientes a seis familias. El estudio genético de estos casos ha permitido aportar tres mutaciones no descritas previamente, que dan lugar a la ausencia o disminución de expresión de la proteína Btk.
- 2.** El diagnóstico de síndrome de Bruton es, en este momento, un diagnóstico relativamente sencillo de realizar. En efecto, la detección de Btk por citometría de flujo es, en la actualidad, un método asequible para laboratorios dotados de esta tecnología que puede aplicarse al estudio de todos los varones con hipogammaglobulinemia y número reducido de linfocitos B, presenten o no historia previa de enfermedad.
- 3.** El estudio del gen que codifica Btk confirma que las bases moleculares de esta deficiencia son heterogéneas, ya que distintas familias portan distintas mutaciones.
- 4.** La diferente expresión fenotípica de un mismo defecto genético entre miembros de un misma familia hace sospechar de una influencia significativa de factores ambientales, o que la heterogeneidad de otros loci puedan modular la actividad del gen o de su producto.
- 5.** La identificación del defecto genético subyacente en el síndrome de Bruton posibilita la confirmación diagnóstica en pacientes sin antecedentes familiares para dicha inmunodeficiencia, permite la detección del estado de portadora y descartar a las no portadoras, dato indispensable para realizar un consejo genético adecuado, y posibilita la realización de diagnóstico prenatal.

6. El síndrome de Bruton es una inmunodeficiencia primaria bien caracterizada en la que el diagnóstico temprano es relativamente fácil de realizar. Es, pues, necesario que los médicos de Atención Primaria y los pediatras tengan en cuenta esta entidad ante individuos varones con infecciones de repetición, pues un diagnóstico precoz permite instaurar la terapia de reemplazo con IgIV, lo cual disminuye de manera notable la morbilidad, las complicaciones crónicas y los ingresos hospitalarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Elsevier. 5^o edición. Capítulo 7. Maduración linfocítica y expresión de los genes receptores de antígeno. Págs. 129-161. Capítulo 9. Activación de los linfocitos B y síntesis de anticuerpos. 2006a. Págs. 189-214.
2. Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Elsevier. 5^o edición. Capítulo 20. Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas. 2006b. Págs. 453-475.
3. Aghmohammadi A, Fiorini M, Moin M et al. Clinical, immunological and molecular characteristics of 37 Iranian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:408-14.
4. Blanco Quirós, E. Arranz Sanz, M.P. Solís Sánchez. Agammaglobulinemia De Bruton (1952-2002). Cincuenta años de inmunodeficiencias primarias. *Bol Pediatr* 2002; 42: 208-216
5. Bradley LA, Sweatman AK, Lovering R et al. Mutation detection in the X-linked agammaglobulinemia gene, BTK, using single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet* 1994;3: 79-83.
6. Broides , Yang W, Conley ME. Genotype/ phenotype correlations in X-linked agammaglobulinemia. *Clinical Immunology* 2006; 118: 195-200.
7. Brunner C, Wirth T. Btk expression is controlled by Oct and BOB.1/OBF.1 *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 6 1807–1815
8. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952;9:722-728.
9. Bruton OC. The discovery of Agammaglobulinemia. En, *Immunologic Deficiency Diseases in Man. Birth Defects Original Article Series* 1968; 4: 2-6.
10. Buckley Rebecca H. Comments to Agammaglobulinemia, by Col. Ogden C. Bruton, MC, USA, *Pediatrics*, 1998;102;213-215.
11. Buckley Rebecca H. Pulmonary complications of primary immunodeficiencies. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2003 4(Suppl 1), S223–S231.
12. Busque L, Mio R, Mattioli J, et al. Non-random X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 1996; 88:59-65.

13. Bykowsky MJ, Haire RN, Ohta Y, et al. Discordant phenotype in siblings with X-linked Agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1996; 58:477-83.
14. Campana D, Farrant J, Inamdar N, et al. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J. Immunol*, 1990; 145: 1675-80.
15. Casanova JL, Fieschi C, Ying Zhang S, et al. Revisiting human primary immunodeficiencies. *Journal of Internal Medicine* 2008; 264: 115-27.
16. Castigli E, Geha R. Molecular basis on common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 740-6.
17. Cebrián M, Redondo JM, López-Rivas A, Rodríguez-Tarduchy G, De Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur J Immunol* 1989 May;19(5):809-15.
18. Chinen J, Schearer WT. Basic and clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:411-18.
19. Chun, JK, Lee TJ, Song JW, et al. Analysis of clinical presentations of Bruton disease: A review of 20 years of accumulated data from pediatric patients at severance hospital. *Yonsey Med J* 2008;49(1): 28-36
20. Conley ME. B cells in patients with X linked agammaglobulinemia. *J. Immunol*. 1985; 134: 3070-4.
21. Conley, ME, Fitch-Hilgenberg ME, Cleveland JL et al. Screening of genomic DNA to identify mutations in the gene for Bruton's Tyrosine Kinase. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1751-56.
22. Conley ME, Stiehm E. *Immunologic Disorders: General Considerations: en Immunologic Disorders in Infants and Children*. 4ª Ed. Philadelphia: Saunders; 1996-U.
23. Conley ME, Mathias D, Treadaway J, et al. Mutations in BTK in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1998;62:1034-43.
24. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999;93:190-7

25. Conley ME, Howard V. Clinical findings leading to the diagnosis of X linked agammaglobulinemia. *J. Pediatr* 2002; 141:566-71.
26. Conley ME, Broides A, Hernández-Trujillo V, et al. Genetics analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev* 2005; 203: 216-31.
27. Cooper MD, Faulk PW, Fudenberg HH, et al. Classification of Primary Immunodeficiencies. *N. Eng Med* 1973; 288: 966-7.
28. d'Audigier C, Rodríguez C, Bertrand V. Déficits immunitaires primitifs et analyse genétique de la maladie de Bruton: quelles perspectives offre ce diagnostic génétique. *Ann Biol. Clin*,2006;64(5):421-8.
29. de Weers M. Mutation analysis of the Bruton's Tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient *xid* mice. *Hum Mol Genet* 1994;3: 161-6.
30. Duncan BK, Miller JH. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 1980; 287:560-1.
31. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B et al. Age related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992;120:216-22.
32. Español T. Tratamiento sustitutivo con progenitores en las inmunodeficiencias primarias. *Allergol et Immunopathol* 2001; 29: 116-125.
33. Español T, Hernandez M, Giner MT, et al. Directorio de pruebas diagnósticas de las inmunodeficiencias primarias. *Allergol et Immunopathol* 2005; 33: 157-61.
34. Eun-Kyeong Jo, Kanegane H, Nonoyama S, et al. Characterization of mutations, including a novel regulatory defect in the first intron, in Bruton's Kinase gene from seven Korean X-Linked Agammaglobulinemia families. *J Immunol*, 2001,167:4038-45
35. Farrar JE, Rohrer J, Conley ME. Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996; 81:271-76.
36. Fischer A. Human Primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nature Immunology* 2004; 5 23-30.

37. Fontán, G. Inmunodeficiencias primarias. Clínica y formas variantes. *Allergol et Immunopathol* 2001; 29: 101-105.
38. Freed MD. Patología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de las cardiopatías congénitas. Traducción de la décima edición en Inglés de Hurst's. *The Heart* de Valentin Fuster et al. Mc Graw Hill Interamericana-Interamericana de España, SAU. Madrid, 2002: Pags.1985-1965.
39. Futatani T, Miyawaky T, Tsukada S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application in carrier detection. *Blood* 1998; 91:595-602.
40. García Rodríguez MJ, E. López Granados E, Cambronero Martínez R et al. Diagnóstico molecular de inmunodeficiencias primarias. *Allergol et Immunopathol* 2001; 29(3): 106-125.
41. García-Rodríguez MJ, López Granados E, Ferreira Cerdán A, Fontán Casariego G. Molecular analysis of Bruton's Tyrosine Kinase Gene in Spain. *Human Mutation* 2001. Mutation in Brief/427(2001) Online.
42. Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C, Bruton's Tyrosine Kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinemia (XLA). The use of protein analysis as an indicator of XLA. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 334-8.
43. Giannelli F, Green PM, Sommer SS, et al. Haemophilia B (sixth edition): a database of point mutations and short additions and deletions. *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No. 1 103-118.
44. Good RA, Kelly WD, Rotstein J, Varco RL. Immunological deficiency diseases. Agammaglobulinemia, hypogammaglobulinemia, Hodgkin's disease and sarcoidosis. *Prog Allergy* 1962; 6:187-189.
45. Good RA. Experiments of nature in the development of modern immunology. *Immunol Today* 1991; 12: 283-286.
46. Gray P, Dunne A, Brikkos C, et al. MyD88 adapter-like(Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* 2006; 281: 10489-95.
47. Guzmán D. The ESID on line database network. *Bioinformatics* 2007; 23: 654-5.

48. Hagemann TL, Chen Y, Rosen Fs, Kwan SP. Genomic organization of the Btk gene and exon scanning for mutations in patients with X- linked agammaglobulinemia. *Hum Mol Genet* 1994;3: 1743-49.
49. Halliday E, Wilkenstein J, Webster AD. Enteroviral infections in primary immunodeficiency (PID): a survey of morbidity and mortality. *J. Infect* 2003; 46:1-8.
50. Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, et al. Identification of Brutons Tyrosine kinase (BTK) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: A nationwide study of BTK deficiency in Japan. *Blood* 1996;88:561-3.
51. Hermanzewski RA, Webster DB. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *QJ Med* 1993;86: 31-42.
52. Himmelmann A, Thevenin C, Harrison K, et al. Analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene promoter reveals critical PU.1 and Sp1 sites. *Blood* 1996;87: 1036-44
53. Holinski-Feder E, Weiss M, Brndau O, et al. Mutation screening of the BTK gene in 56 families with X-linked agammaglobulinemia (XLA): 47 unique mutations without correlation to clinical course. *Pediatrics* 1998;101: 276-84.
54. Horwood NJ, MahonT, McDaid JP, et al. Bruton's Tyrosine kinase is required for lypopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 2003; 197: 1603-11.
55. Howard V, Myers LA, Williams DA et al. Stem cell transplants for patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 2003; 107(7):98-102.
56. Howard V. The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol.* 2006;118:201-8.
57. Jo E, Kanegane H, Nonoyama S, et al. Characterisation of mutations, including a novel regulatory defect in the first intron, in Bruton's Tyrosine Kinase gene from seven korean X- linked agammaglobulinemia families. *J Immunol* 2001; 167:4038-45.
58. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signalling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 979-87.

59. Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, et al. Detection of Bruton's Tyrosine Kinase mutations in hypogammaglobulinemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:512-7.
60. Kanegane H, Futatani T, Wang Y, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carriers identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:1012-20.
61. Kanegane H. Severe Neutropenia in Japanese Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2005; 25: 490-5.
62. Kornfeld SJ, Good RA, Litman GW. Atypical X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med*.1994; 331: 949-51.
63. Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, Tang H, Sung SSJ, Fu SM, et al. A novel mutation (Cys 145->Stop) in Bruton's Tyrosine kinase is associated with newly diagnosed X-linked agammaglobulinemia in a 51 years old male. *Mol Med*.1996;2:619-23.
64. Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, et al. Extreme variation in X-linked agammaglobulinemia phenotype in a three generation family. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:702-6.
65. Kozłowski C, Evans DIK, Neutropenia associated with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Pathol* 1991;44:338-390.
66. Kristufek K. Characterization of novel Bruton's tyrosine kinase gene mutations in Central European patients with agammaglobulinemia. *Molecular Immunology* 2007; 44: 1639-43.
67. Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, et al. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on Methylation-specific PCR. *Hum Genet* 1999; 104:49-55.
68. Lederman HM, Wilkenstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine (Baltimore)* 1985;64:145-56.
69. Lindwall JM, Blomberg KE, Väliäho J, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev* 2005; 203:200-215.

70. López-Granados E, Pérez de Diego R, Ferreira Cerdán A, et al. A genotype-phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:690-7.
71. Marodi L, Notarangelo L. Immunological and genetics bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 2007: 851-861.
72. McKinney RE Jr, Katz SL, Wilfert CM. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* 1987; 9:334-56.
73. Menno C, van Zelm, M, Sc et al. An antibody deficiency síndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Eng Med* 2006; 354:1901-12.
74. Milà-Llambí J, Escobar D, Matamoros N. Registro Español de Inmunodeficiencias primarias. *Inmunología* 2005;24: 67-68.
75. Moreau T, Calmels B, Barloguis V et al. Potential application of gene therapy to X-linked agammaglobulinemia. *Current Gene Therapy* 2007;7:284-94.
76. Müller S, Sideras P, Smith CIE et al. Cell's specific expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) gene is regulated by Sp1-and Spi1/PU.1-family members. *Oncogene* 1996; 13: 1955-64.
77. Nomura K, Kanegane H, Karasuyana H et al. Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B- cell differentiation pathway. *Blood* 2000;96: 610-617.
78. Nonoyama S, Tsukada S, Yamadori T, Miyawaky T, Jin YZ, Watanabe C, et al. Functional analysis of peripheral blood B cells in patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol* 1998;161:3925-9.
79. Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A et al. Primary immunodeficiency diseases. An update. *J. Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 677-87.
80. Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, et al. International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. Primary Immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest,2005. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 883-96.

81. Park MK. Pediatric Cardiology for Practitioners, 5th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2008:287-292.
82. Paul ME. Approach to the evaluation of the immunodeficient patient. In Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW. Clinical Immunology. Mosby International limited, 2001. Págs: 33.1-33.11.
83. Plebani A, Soresina A, Rondelli R, et al. Clinical, Immunological and molecular analysis in a large cohort of patients with X-linked Agammaglobulinemia: an italian multicenter study. Clin Immunol 2002;104: 221-30.
84. Plo-Rodríguez F, García Rodríguez, MC, Ferreira Cerdán A, et al. Neutropenia as early manifestation of X-linked agammaglobulinemia. Report on 4 patients. An Esp Pediatr 1999 Sep;51 (3):235-40.
85. Puck JM, Nussbaum R. Genetic principles and technologies in the study of immune disorders. In Ochs HD, Smith CIE, Puck HM, eds. Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach. New York, Oxford University Press, New York, 2007. Pags: 16-26.
86. Quartier P, Foray S, Casanova JL, et al. Enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemia: intensive immunoglobulin therapy and sequential viral detection in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction. Pediatr Infect Dis 2000;J19:1106-8.
87. Rafi A, Matz J. An unusual case of Campylobacter jejuni pericarditis in a patient with X-linked agammaglobulinemia. Ann Allergy Asthma Immunol 2002;89:362-7.
88. Rohrer J, Parolino O, Belmont JW, Conley ME. The genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. Immunogenetics 1994; 40:319-324.
89. Rohrer J, Conley ME. Transcriptional regulatory elements within the first intron of Bruton's tyrosine kinase. Blood 1998; 91: 214-21.
90. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamin 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. Naturwissenschaften 1988; 75: 354-355.
91. Samarghiteau C, Valiaho J, Vihinem M. IDR knowledge base for Primary Immunodeficiencies. Immunome Res 2007; 3: 6-10.

92. Schauer U, Stemberg F, Rieger CH, et al. Levels of antibody specific to Tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type B, and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in healthy children and adults. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Mar 2003: 202-207.
93. Schroeder HW Jr. Primary antibody deficiencies. In Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW. *Clinical Immunology*. Mosby International limited, 2001. Pags: 33.1-33.11.
94. Sideras P, Muller S, Shiels E et al. Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol* 1994; 153: 5607-17.
95. Sideras P, Smith CIE. Molecular and cellular aspects of X-linked Agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995; 59:135-223.
96. Sigmon JR, Kasasbeh E, Krishnasamy G et al. X-linked agammaglobulinemia diagnosed late in life: case report and review of the literature. *Clinical and Molecular Allergy* 2008; 6: 5-12.
97. Smith CIE, Ochs H, Puck J. Genetically determined Immunodeficiency diseases: a perspective. In Ochs HD, Smith CIE, Puck HM, eds. *Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach*. New York, Oxford University Press, New York, 2007. Pags: 3-15.
98. Smith E, Satterthwaite ON, Witte E. X-linked agammaglobulinemia: a disease of Btk Tyrosine Kinase. In Ochs HD, Smith CIE, Puck HM, eds. *Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach*. New York, Oxford University Press, New York, 2007. Pags: 397-418.
99. Sochorova K, Horvath R, Rozkova D et al. Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF- α production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 2007;109:2553-6.
100. Stiehm ER. New and old immunodeficiencies. *Pediatr Res* 1992; 33 (supl.1): S2-S8.
101. Takada H, Kanegane H, Nomura A, et al. Female Agammaglobulinemia due to the Bruton Tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood* 2004;103:185-87.

102. Teimourian S, Nasser S, Pouladi N, et al. Genotype-Phenotype Correlation in Bruton's Tyrosine Kinase Deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008 (30): 679-83.
103. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72:279-90.
104. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901-28.
105. Vetrie D. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993;361:226-33.
106. Vorechovsky I, Zetterquit H, Paganelli R, et al. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunopathol* 1995;77:185-92.
107. Webster ADB, Janossy G. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol* 1990; 145: 1675-80.
108. Wen L, Atkinson JP, Giclas PC. Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113: 585-93.
109. Wilkenstein JA, Marino MC, Lederman HM, et al. X-linked agammaglobulinemia: report of a United States registry of 201 patients. *Medicine(Baltimore)* 2006;85:193-202.

APÉNDICE

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DEL TRABAJO RECOGIDO EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:

Se está preparando un manuscrito con los resultados de este trabajo que será enviado para su publicación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

Álvarez AJ, Barroso S, Montes MA, Lagarda L, Guzmán C, Lara JM, Rangel C, Casas C Madrazo JL, Núñez Roldán A, Sánchez B. Identificación de una nueva mutación en el gen de la BTK. XXIX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología . Cádiz , junio 2003. Inmunología 2003;22: 93-94

Alvarez AJ, Montes MA, Rangel C, Casas C Madrazo JL, Núñez Roldán A, Sánchez B. Aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico diferencial de la agammaglobulinemia ligada al sexo (XLA). XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Valladolid, 11-14 junio de 2002.

Montes MA, **Álvarez AJ**, Rangel C, Casas C Madrazo JL, Núñez Roldán A, Sánchez B. "Detección de BTK por citometría de flujo en pacientes con hipogammaglobulinemia" . XXVII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Madrid. Junio 2001. Inmunología 2001;1: 62-63.

Rangel C, Montes MA, Casas C, Madrazo JL, **Alvarez AJ**, Núñez Roldán A, Sánchez B. Detección de BTK por citometría de flujo en pacientes con hipogammaglobulinemia. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica. Segovia, 3-5 Mayo 2001. Allergol et Immunopathol 2001;29: 179.

REGISTRO DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN ESTE TRABAJO A TRAVÉS DE:

<http://bioinf.uta.fi/BTKbase/index.php?content=bioinfor/IDbases>

```
Submission_to_BTKbase
Entry:
ID #P597X598(1); confidential; MUTATION; TK
Accession A1208
Systematic name g.68165_68166delAT, c.1791_1792delAT, r.1791_1792delau,
Systematic name p.Tyr598fsX0
Description A frame shift deletion mutation in the exon 18 leading to a
Description premature stop codon in the TK domain
Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Created)
Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Last updated, Version 1)
RefNumber [1]
RefLoc Submitted (20-Apr-2008) to BTKbase.
RefLoc Antonia Álvarez-Márquez, Sonia Barroso, Berta Sánchez;
RefLoc Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del
RefLoc Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla Spain; Tel
RefLoc 0034955013224; Fax 0034955013221; e-mail
RefLoc tamexplorer@yahoo.es
Feature dna; 1
Feature /rnalink: 2
Feature /name: deletion
Feature /loc: EMBL: U78027: 68165..68166
Feature /change: -at
Feature /genomic_region: exon; 18
Feature rna; 2
Feature /dnalink: 1
Feature /aalink: 3
Feature /name: frameshift
Feature /loc: EMBL: X58957; GI:312466; HSATK: 1923..1924
Feature aa; 3
Feature /rnalink: 2
Feature /name: out of frame translation; premature termination
Feature /loc: SWISSPROT: Q06187; BTK_HUMAN: 597..598
Feature /change: PY -> PX
Feature /domain: TK
mRNA level N.D.
Protein level Absent
Kinase activity N.D.
Diagnosis Classical XLA
Symptoms recurrent pneumonia, chronic otitis
Age 1
Sex XY
Ethnic origin Caucasoid; Spain
Family history Inherited
Relative Description of pedigree:grandmother, mother and one sister
Relative are carriers and the other sister is healthy.
```

```

ID @Q157X200(1); confidential; MUTATION; TH
Accession A1209
Systematic name g.58864_58868delinsGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACT,
Systematic name c.470_474delinsGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACT,
Systematic name r.470_474delinsgggcagauaucugcugcucucagacu, p.Gln157fsX43
Description A frame shift indel mutation in the exon 6 leading to a
Description premature stop codon in the TH domain
Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Created)
Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Last updated, Version 1)
RefNumber [1]
RefLoc Submitted (20-Apr-2008) to BTKbase.
RefLoc Antonia Álvarez-Márquez, Sonia Barroso, Berta Sánchez;
RefLoc Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del
RefLoc Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla Spain; Tel
RefLoc 0034955013224; Fax 0034955013221; e-mail
RefLoc tamexplorer@yahoo.es
Feature dna; 1
Feature /rnalink: 2
Feature /name: indel
Feature /loc: EMBL: U78027: 58864..58868
Feature /change: agaca -> gggcagtatc tctgtgctc tcagact
Feature /genomic_region: exon; 6
Feature rna; 2
Feature /dnalink: 1
Feature /aalink: 3
Feature /name: frameshift
Feature /loc: EMBL: X58957; GI:312466; HSATK: 602..606
Feature aa; 3
Feature /rnalink: 2
Feature /name: out of frame translation; premature termination
Feature /loc: SWISSPROT: Q06187; BTK_HUMAN: 157..158
Feature /change: QT ->
Feature /change: RAVSLLLSDC QKCYGLPNFG EQEWKLTWE FSPEDKKASS PNAX
Feature /domain: TH
mRNA level N.D.
Protein level Much reduced
Kinase activity N.D.
Diagnosis Classical XLA
Symptoms recurrent pneumonia
Age 8
Sex XY
Ethnic origin Caucasoid; Morocco
Family history Inherited
Relative Description of pedigree:Mother is a carrier.

```

```
Submission_to_BTKbase

Entry:
-----

ID          V219V(1); confidential; MUTATION; SH3
Accession   A1207
Systematic name g.60788T>G, c.657T>G, r.657u>g, p.Val219Val
Description A point mutation in the exon 8 leading to an amino acid
Description change in the SH3 domain
Date        20-Apr-2008 (Rel. 8, Created)
Date        20-Apr-2008 (Rel. 8, Last updated, Version 1)
RefNumber   [1]
RefLoc      Submitted (20-Apr-2008) to BTKbase.
RefLoc      Antonia Alvarez-Marquez, Sonia Barroso, Berta Sanchez;
RefLoc      Servicio de Inmunologia, Hospital Universitario Virgen del
RefLoc      Rocio, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla Spain; Tel
RefLoc      0034955013224; Fax 0034955013221; e-mail
RefLoc      tamexplorer@yahoo.es
Feature     dna; 1
Feature     /rnalink: 2
Feature     /name: point
Feature     /loc: EMBL: U78027: 60788
Feature     /change: t -> g
Feature     /genomic_region: exon; 8
Feature     rna; 2
Feature     /dnalink: 1
Feature     /aalink: 3
Feature     /name: missense
Feature     /loc: EMBL: X58957; GI:312466; HSATK: 789
Feature     /codon: gtt -> gtg; 3
Feature     aa; 3
Feature     /rnalink: 2
Feature     /name: aa substitution
Feature     /loc: SWISSPROT: Q06187; BTK_HUMAN: 219
Feature     /change: V -> V
Feature     /domain: SH3
mRNA level  Normal
Protein level Absent
Kinase activity N.D.
Diagnosis   Classical XLA
Symptoms    Diagnosed as CVID and treatment with IVIG since 1 year .
Symptoms    neutropenia, digestive tract recurrent infections, sepsis
Symptoms    by pseudomonas.
Age         15
Sex         XY
Ethnic origin Caucasoid; Spain
Family history De novo
Relative    Description of pedigree:Mother and one sister are healthy.
IgA         0
IgE         <19
IgG         143
IgM         12
B cells     0
CD19       0
CD20       0
Comment     Polymorphism g/a +78 intron 8.Polymorphism a/g +178 intron
Comment     6 (snp: rs:2071222). His mother is heterocygote for the
Comment     polymorphism g/a +78 intron 8. No other variations detected
Comment     in BTK gene( exons and intron boundaries).
//
```

Submission_to_BTKbase

Entry:

ID -9(2); confidential; MUTATION;
 Accession A1206
 Systematic name g.35420G>A, c.-30G>A, r.-30g>a, p.0
 Description A point mutation in the exon 1 leading to an amino acid
 Description change
 Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Created)
 Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Last updated, Version 1)
 RefNumber [1]
 RefLoc Submitted (20-Apr-2008) to BTKbase.
 RefLoc Antonia Alvarez-Marquez, Sonia Barroso, Berta Sanchez;
 RefLoc Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del
 RefLoc Rocio, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla Spain; Tel
 RefLoc 0034955013224; Fax 0034955013221; e-mail
 RefLoc tamexplorer@yahoo.es
 Feature dna; 1
 Feature /rnalink: 2
 Feature /name: point
 Feature /loc: EMBL: U78027: 35420
 Feature /change: g -> a
 Feature /genomic_region: exon; 1
 Feature rna; 2
 Feature /dnalink: 1
 Feature /aalink: 3
 Feature /name: 5'UTR
 Feature /loc: EMBL: X58957; GI:312466; HSATK: 102
 Feature aa; 3
 Feature /rnalink: 2
 Feature /name: no translation
 mRNA level Absent
 Protein level Absent
 Kinase activity N.D.
 Diagnosis Classical XLA
 Symptoms Diagnosed as CVID and treatment with IVIG since 12
 Symptoms years.Meningoencephalitis and recurrent viral infections at
 Symptoms 8 years.(rubeola, sarampion, and pneumonia after sarampion)
 Symptoms .Arthritis. Neurological symptoms at 21 years.
 Age 29
 Sex XY
 Ethnic origin Caucasoid; Spain
 Family history Inherited
 Relative Description of pedigree:Mother is a carrier. Two healthy
 Relative brothers.A cousin with suspected XLA.
 IgA 0
 IgE <19
 IgG 120
 IgM 0
 B cells 0
 CD19 0
 CD20 2
 //
 Parameters were:
 submitter -> Antonia Alvarez-Marquez, Sonia Barroso, Berta Sanchez
 address -> Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocio,
 Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla Spain
 telephone -> 0034955013224
 fax -> 0034955013221
 email -> tamexplorer@yahoo.es
 PMID ->
 Reference ->
 numberingentry -> U78027
 dnatype1 -> point
 ntnumber1 -> 35420
 ntoril -> g
 ntmult1 -> a

```

Submission_to_BTKbase
Entry:
ID -9(1); confidential; MUTATION;
Accession A1205
Systematic name g.35420G>A, c.-30G>A, r.-30g>a, p.0
Description A point mutation in the exon 1 leading to an amino acid
Description change
Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Created)
Date 20-Apr-2008 (Rel. 8, Last updated, Version 1)
RefNumber [1]
RefLoc Submitted (20-Apr-2008) to BTKbase.
RefLoc Antonia Alvarez-Marquez, Sonia Barroso, Berta Sanchez;
RefLoc Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del
RefLoc Rocio, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla Spain; Tel
RefLoc 0034955013224; Fax 0034955013221; e-mail
RefLoc tamexplorer@yahoo.es
Feature dna; 1
Feature /rnalink: 2
Feature /name: point
Feature /loc: EMBL: U78027: 35420
Feature /change: g -> a
Feature /genomic_region: exon; 1
Feature rna; 2
Feature /dnalink: 1
Feature /aalink: 3
Feature /name: 5'UTR
Feature /loc: EMBL: X58957; GI:312466; HSATK: 102
Feature aa; 3
Feature /rnalink: 2
Feature /name: no translation
mRNA level Absent
Protein level Absent
Kinase activity N.D.
Diagnosis Classical XLA
Symptoms Recurrent pneumonia, atelectasia
Age 10
Sex XY
Ethnic origin Caucasoid; Spain
Family history Inherited
Relative Description of pedigree:A cousin death during the first
Relative years of life. His mother and one sister are carriers.
Relative His sister has two sons diagnosed as classical XLA at
Relative ages of 10 years and 3 days respectively.
IgA 0
IgE <19
IgG 115
IgM 0
B cells 0
CD19 0
CD20 1
//

```

Ha sido posible realizar este trabajo gracias a la financiación por parte del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, del Instituto de Salud Carlos Tercero y del Plan Andaluz de Investigación.