



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (IdiPAZ)

***CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DEL
DEFECTO ASOCIADO A PATOLOGÍA INFECCIOSA SEVERA
COMPATIBLE CON DEFICIENCIA DE PROPERDINA (CFP)
EN UN PACIENTE CON MENINGITIS MENINGOCÓCICA
RECURRENTE***

Autor: Ana Mei Agudo Riba

Tutores: Alberto López Lera y Fernando Corvillo Rodríguez

Tutor UPM: Miguel Ángel Torres Lacruz

Junio de 2019



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE
BIOSISTEMAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DEL DEFECTO ASOCIADO A
PATOLOGÍA INFECCIOSA SEVERA COMPATIBLE CON DEFICIENCIA DE
PROPERDINA (*CFP*) EN UN PACIENTE CON MENINGITIS
MENINGOCÓCICA RECURRENTE**

TRABAJO FIN DE GRADO

Ana Mei Agudo Riba

MADRID, 2019

Directores: Alberto López Lera y Fernando Corvillo Rodríguez (Instituto de
Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ))

Tutor UPM: Miguel Ángel Torres Lacruz (Dpto: Biotecnología – Biología
Vegetal. ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid)



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**TÍTULO DEL TFG - CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DEL
DEFECTO ASOCIADO A PATOLOGÍA INFECCIOSA SEVERA COMPATIBLE
CON DEFICIENCIA DE PROPERDINA (*CFP*) EN UN PACIENTE CON
MENINGITIS MENINGOCÓCICA RECURRENTE**

**Memoria presentada por Ana Mei Agudo Riba para la obtención del título
de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

Fdo: Ana Mei Agudo Riba

VºBº Tutores y Directores del TFG

**Dr. Alberto López Lera y Dr. Fernando Corvillo Rodríguez
Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ)**

VºBº Tutor UPM

**D. Miguel Ángel Torres Lacruz
Dpto de Biotecnología - Biología Vegetal
ETSIAAB - Universidad Politécnica de Madrid**

Madrid, 25 de junio, 2019

Agradecimientos

A Alberto López Lera y a Fernando Corvillo Rodríguez por acogerme en su grupo de investigación y darme la posibilidad de participar en un proyecto tan bonito. También, por lo cómoda que han hecho mi estancia en el IdiPAZ, por su entrega, por enseñarme y ayudarme tanto y por su vocación científica y docente.

A los técnicos, doctorandos y personal, en general, de nuestro laboratorio, que me han tratado como a una más y me han hecho sentir especialmente a gusto.

A Miguel Ángel Torres Lacruz por sus ánimos, sus recomendaciones y su ayuda incondicional, tanto con el trabajo en sí mismo como con la parte burocrática asociada a él.

A Luis Fernández Pacios por su infinita paciencia.

A toda personita que, a lo largo de estos meses, ha escuchado y aguantado mis historietas relacionadas con este proyecto y se saben de memoria en qué consiste.

Índice general

CAPÍTULO 1: Introducción y objetivos	1
1.1 Funcionamiento del sistema del complemento.....	1
1.2 Meningitis y sepsis meningocócicas	4
1.3 Properdina	5
1.4 Deficiencias en la vía alternativa: P, FB y FD	6
CAPÍTULO 2: Material y métodos	8
2.1 Muestras biológicas.....	8
2.2 Determinación de niveles plasmáticos de C3, C4 e Igs.....	8
2.3 Cuantificación de FB.....	8
2.4 Cuantificación de P	9
2.5 <i>Western blot</i>	9
2.6 Ensayo hemolítico para medir la actividad de la vía clásica (CH50).....	10
2.7 Ensayo hemolítico para medir la actividad de la vía alternativa (AP50)	10
2.8 Análisis genético	10
2.9 Análisis computacional	11
CAPÍTULO 3: Resultados y discusión	12
3.1 Estudio inmunológico del sistema del complemento	12
3.2 Secuenciación y análisis computacional	16
Modelización.....	19
Conclusiones	23
CAPÍTULO 4: Referencias	25
Anexo A	29

Índice de tablas

Tabla 1. Parejas de cebadores utilizadas para la amplificación de los exones (1 al 10) de la P y tamaños (pb) de los amplicones para cada pareja	11
Tabla 2. Volúmenes (μ l) de cada reactivo de PCR agregados a un tubo de reacción	11
Tabla 3. Niveles plasmáticos en el paciente y de referencia de C3, C4, IgG, IgA, IgM, FB (mg/dl) y P (μ g/ml), y actividad (U/ml) en el paciente y de referencia para los ensayos CH50 y AP50.....	12
Tabla 4. Cambios localizados en el ADN del paciente respecto a la secuencia de referencia e información relativa a ellos	17
Tabla A1. Datos relativos a los anticuerpos utilizados en los ensayos ELISA para el FB y la P, y los anticuerpos empleados en el <i>western blot</i>	29

Índice de figuras

Figura 1. Formación del MAC a través de las tres vías (clásica, alternativa y vía de las lectinas) de activación del sistema del complemento y puntos clave de acción de la P	3
Figura 2. Correlación entre la información contenida en el ARN mensajero (ARNm) y los diferentes dominios de la properdina	5
Figura 3. Modelos de la estructura de un monómero, un dímero, un trímero y un tetramero (de izquierda a derecha) de P	6
Figura 4. <i>Western blot</i> para la detección de P en el suero del paciente.....	14
Figura 5. Cromatograma de la región de interés obtenido para el exón 8 en un control (izquierda) y en el paciente de estudio (derecha)	16
Figura 6. Cromatograma de la región de interés obtenido para el exón 10 en un control (izquierda) y en el paciente de estudio (derecha)	17
Figura 7. Representación gráfica del modelo estructural de la P sin mutar	20
Figura 8. Representación gráfica de los valores de potencial electrostático en la región de interés (circunferencia roja), en la proteína sin mutar (izquierda) y en la proteína mutada (derecha)	22

Lista de símbolos

(NH₄)₂S₂O₈: Persulfato amónico

°C: Grados centígrados

Å: Angstroms

CaCl₂: Cloruro de calcio

g: Gramos

h: Horas

H₂O: Agua

HCl: Ácido clorhídrico

kcal/mol: Kilocalorías/mol

kDa: Kilodalton

kJ/mol: Kilojulios/mol

kT/e: constante de Boltzmann por temperatura / carga del electrón

L: Litros

M: Molar

Mg: Magnesio

mg/dl: Miligramos/decilitro

MgCl₂: Cloruro de magnesio

min: Minutos

ml: Mililitros

mM: Milimolar

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

NaN₃: Azida de sodio

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

p/v: Peso/volumen

pb: Pares de bases

rpm: Revoluciones por minuto

U/ml: Unidades/mililitro

T: Temperatura

ΔG: Variación de energía libre de Gibbs

ΔH: Variación de entalpía

ΔS: Variación de entropía

ΔΔG: Diferencia entre la variación en la energía libre de Gibbs de la forma mutada y la variación en la energía libre de Gibbs de la forma sin mutar

μg: Microgramos

μg/ml: Microgramos/mililitro

μl: Microlitros

μM: Micromolar

Lista de abreviaturas

A: Adenina
ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AP50: *Alternative Pathway 50%*
AP – CFTD: *Alternative pathway – complement fixation test diluent*
Arg: Arginina
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
C: Citosina
C4BP: *C4 binding protein*
CFP: *Complement Factor Properdin*
CH50: *Total Haemolytic Complement 50%*
Cys: Cisteína
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*
EGTA: *Egtazic acid*
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FB: Factor B
Fc: *Crystallizable fragment*
FD: Factor D
FH: Factor H
G: Guanina
GVB: *Gelatin Veronal Buffer*
IgA: Inmunoglobulina A
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
Igs: Inmunoglobulinas
LPS: Lipopolisacáridos
MAC: *Membrane Attack Complex*
MAF: *Minor Allele Frequency*
MASPs: *MBLs – associated serine proteases*
MBLs: *Mannose – binding lectins*
NBT/BCIP: *Nitro Blue Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*
P: Properdina
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PBS-BSA: *Phosphate Buffered Saline with Bovine Serum Albumin*
PBS-T: *Phosphate Buffered Saline with Tween 20 0,1%*
PCR: *Polymerase chain reaction*
RT – PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*
SDP: Suero deplecionado en P
SDS: *Sodium dodecyl sulfate*
SHN: Suero humano normal
T: Timina
TEMED: Tetrametiletilendiamina
Tris: Trisaminometano
TSR: *Thrombospondin type I repeat*
UTR: *Untranslated region*
VBS: *Veronal Buffer Saline*

Abstract

Properdin (P) is a positive regulator of the alternative pathway of the complement system (immune system). It is codified by the complement factor properdin (*CFP*) recessive gene, located at the X chromosome. The deficiency of this protein leads to an increased susceptibility to bacterial infections caused by *Neisseria*, among other genera.

In this study, a clinical case of a Spanish 17 – years old boy who suffered from meningitis and meningococcal sepsis at the age of 16 is reported. A deficiency in the immune system of this patient was suspected after the meningococcal episodes already mentioned. Therefore, the aim of this study was the determination of the immune component altered in the patient. Moreover, the underlying molecular cause of this alteration was also analysed.

For the first purpose, two immunochemical methods were applied: nephelometry and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Plasmatic proteins C3 and C4 (complement system proteins), and immunoglobulins G (IgG), A (IgA) and M (IgM), were determined by nephelometry. P and factor B (FB), both complement system proteins as well, were quantified by ELISA. Further characterization of the molecular defect included western blot and colorimetric functional assays such as the so-called Total Haemolytic Complement 50% (CH50) assay and Alternative Pathway 50% (AP50) assay. For the second purpose, a genetic screening by PCR and Sanger sequencing was performed.

Biochemical studies revealed normal levels of immunoglobulins (Igs) and complement proteins C3 and C4. The functional assays showed normal CH50 levels but reduced AP50 levels. The ELISA assay showed normal levels of FB but undetectable P. The western blot assay confirmed the absence of P in the patient's serum. Based on the results obtained in these different molecular diagnostic approaches and on the information found in literature, it was concluded that the protein affected was P.

Sequencing and genetic analyses allowed the detection of a *novel CFP* missense mutation in exon 8. This mutation (position p.337; change p.C337R) leads to the replacement of a cysteine (Cys) residue by arginine (Arg). After a bioinformatic analysis, the Cys replaced was found to interact with a Cys located in p.376 through a disulfide bond. The loss of this bond is proposed to involve severe structural and, thus, functional consequences in the final protein.

Since the number of P deficiency cases described so far is very low, this new case and the mutation discovered represent an important contribution both to P deficiency's clinical and genetic background. Besides, the mutation described will help building up a family study with the identification of affected family members that will receive Genetic Counselling and who may be protected by vaccination.

CAPÍTULO 1: Introducción y objetivos

1.1 Funcionamiento del sistema del complemento

El sistema del complemento es un conjunto de más de 30 proteínas solubles y de membrana sintetizadas, mayoritariamente, en el hígado (Abbas *et al.*, 2015). No obstante, también existe síntesis de estas proteínas a nivel local. Esto ocurre en ciertos tipos celulares como las células tubulares del riñón o algunas células del sistema inmune (células presentadoras de antígeno o las células T) (Mathern *et al.*, 2015). La mayor parte de las proteínas del complemento se sintetizan en forma de precursor inactivo o zimógeno. Por tanto, para adquirir su forma activa, requieren de la escisión de parte de su estructura por acción de diversas enzimas.

Estas proteínas conforman una ruta de defensa de la inmunidad innata, la cual engloba una serie de mecanismos inespecíficos para el patógeno (o amenaza) y rápidos (horas), que constituyen la primera barrera de defensa del organismo. Como su nombre indica, está presente desde el nacimiento. Cuando estos mecanismos no logran combatir la amenaza, se activan procesos propios de la respuesta adaptativa. Al contrario que la respuesta innata, esta es específica. Se trata de una respuesta mucho más eficaz pero cuya activación es más lenta (días).

Cabe matizar que, en realidad, el sistema del complemento constituye un eslabón entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Su activación favorece reacciones propias de ambos tipos de respuesta (Abbas *et al.*, 2015). Algunas de estas reacciones como la lisis, la fagocitosis o las reacciones inflamatorias son características de la inmunidad innata (Pelka y de Nardo, 2018). El complemento también favorece la presentación de antígenos a las células T y la producción de anticuerpos por parte de las células B, procesos propios de la inmunidad adaptativa (Kelly *et al.*, 2017). Además, a este sistema también se le han asociado otras funciones como la eliminación de células apoptóticas y complejos inmunes, la angiogénesis, la organogénesis y la regeneración tisular (Ricklin *et al.*, 2010).

El complemento consta de tres vías diferentes de activación proteolítica: vía clásica, vía de las lectinas y vía alternativa. Estas difieren en los primeros pasos del proceso de activación, pero todas ellas convergen en la formación de un complejo macromolecular denominado convertasa de C3, y la consiguiente activación del componente central C3.

La vía clásica se activa cuando la proteína C1q se une a la región constante (Fc) de anticuerpos IgG o IgM. Los anticuerpos se encuentran formando parte de inmunocomplejos al interactuar con el antígeno por su región variable. Esta unión induce un cambio conformacional que desencadena la activación de las serina proteasas C1r y C1s, asociadas a C1q. C1s actúa sobre la proteína C2, dando lugar a C2a y C2b, y sobre C4, formándose los fragmentos proteolíticos C4a y C4b. C2a y C4b se unen para formar la convertasa de C3 (C4bC2a).

En la vía de las lectinas, las moléculas clave para la activación son las lectinas de unión a manosa (“*mannose – binding lectins*”, MBLs). Estas proteínas interactúan con los carbohidratos presentes en la superficie microbiana. La interacción provoca la activación de las serina proteasas asociadas a MBLs (MASPs), las cuales actúan sobre C2 y C4 de forma homóloga a C1s, resultando en la formación de la misma C3 convertasa explicada para la vía clásica.

En lo referente a la vía alternativa, su activación es espontánea y constitutiva a una tasa baja. Esta ruta está mediada por la proteína C3, la cual reconoce estructuras de la superficie microbiana. C3 puede ser inhibida por la acción de proteínas reguladoras presentes en células de mamíferos, pero ausentes en los microbios. Esto permite que, sobre estos últimos, la activación tenga lugar y se amplifique (Abbas *et al.*, 2015).

Según el modelo más aceptado actualmente (“*tick-over theory*”) para explicar la vía alternativa, C3 sufre la hidrólisis espontánea de un enlace tioéster interno, generando así, de forma constante y en pequeñas proporciones, la forma C3(H₂O) (Michels *et al.*, 2018). C3(H₂O) se asocia con FB para formar la convertasa inicial de C3. C3b, resultante del procesamiento de C3 por parte de la convertasa, recluta al FB y al factor D (FD) sobre las superficies celulares. El FD actúa enzimáticamente sobre el FB, escindiéndolo en las proteínas Ba y Bb. Las proteínas C3b y Bb pasan a formar el complejo enzimático activo C3bBb, denominado convertasa de C3 de la vía alternativa. Esta convertasa procesa más moléculas de C3 dando paso a una retroalimentación y amplificación positiva (Abbas *et al.*, 2015).

La P es el único regulador positivo conocido en el sistema del complemento. Como tal, favorece la activación de la vía alternativa pero no es imprescindible. Es decir, esta vía puede funcionar también en ausencia de esta proteína, aunque lo hará con una menor efectividad. La P favorece la formación y prolonga la vida media de la C3 convertasa de la vía alternativa. Por el momento se desconoce si P se une a la superficie celular y favorece el ensamblaje de los componentes necesarios para la formación de la C3 convertasa o bien, sucede el proceso inverso, en el que C3b y Bb se asocian primero y la P interviene posteriormente (Corvillo *et al.*, 2016).

La C3 convertasa formada en las tres vías hidroliza moléculas de C3 generando los fragmentos C3a (anafilatoxina, agente proinflamatorio) y C3b. Las proteínas C3b actúan como opsoninas, uniéndose a la superficie diana y promoviendo la fagocitosis. Los fragmentos generados por las C3 convertasas también interactúan con otros para dar paso a las denominadas C5 convertasas (C4bC2aC3b y C3bBbC3b, convertasas de C5 de las vías clásica y alternativa, respectivamente). Estas convertasas también son estabilizadas por la P y actúan sobre moléculas de C5, dando paso a los fragmentos C5a (anafilatoxina) y C5b. C5b interactúa con proteínas C6, hecho que facilita la posterior unión de los componentes C7, C8 y C9 a la superficie de la

célula diana. Todos estos componentes constituyen el complejo de ataque de membrana (“*Membrane attack complex*”, MAC), el cual supone la formación de un poro que termina por provocar la lisis celular (Abbas *et al.*, 2015). La figura 1 representa un esquema general del funcionamiento del complemento, desde su activación hasta la formación del MAC, y las proteínas que intervienen en cada una de las vías de activación. También se representan los puntos de acción de la P.

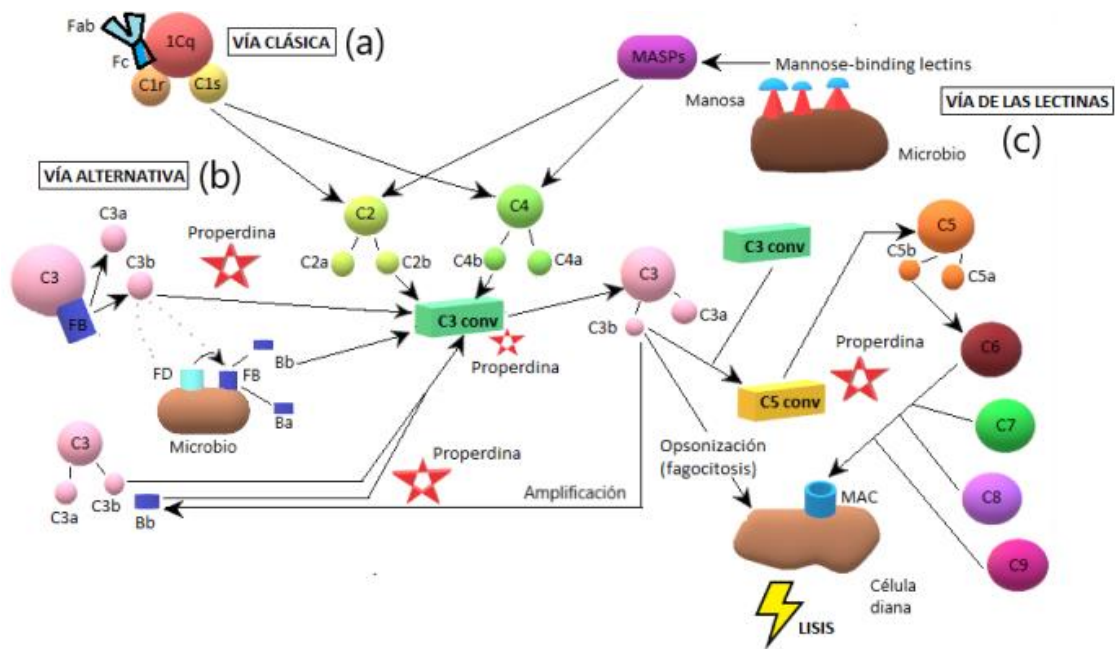


Figura 1. Formación del MAC a través de las tres vías (clásica, alternativa y vía de las lectinas) de activación del sistema del complemento y puntos clave de acción de la P. La vía clásica (a) se activa tras el reconocimiento de la región Fc de anticuerpos IgG o IgM. La vía alternativa (b) se activa de manera espontánea y la vía de las lectinas (c) se activa por reconocimiento de residuos de manosa presentes en la superficie de los patógenos por parte de las MBLs. La vía clásica y la vía de las lectinas se caracterizan por el procesamiento de las proteínas C2 y C4 por parte de C1s y las proteínas MASPs, respectivamente. El ensamblaje de C2a y C4b (productos del procesamiento) da paso al primer componente en común a las tres vías: la convertasa de C3. Las moléculas Bb (obtenida por acción de FD sobre FB) y C3b (obtenida por acción de la convertasa inicial (C3 + FB) sobre C3) también dan paso a la convertasa de C3 (de la vía alternativa) cuando interactúan entre sí. Seguidamente, se forma la convertasa de C5. C5b, producto de la actividad de la convertasa sobre C5, se ensambla con las proteínas C6, C7, C8 y C9 para la formación del MAC. La P favorece la formación de la convertasa C3 de la vía alternativa y la estabilización de ambas convertasas (C3 y C5 convertasas). C3b también puede unirse directamente a la superficie diana, opsonizarla e inducir la fagocitosis de la célula.

Defectos cuantitativos o cualitativos en proteínas integrales del complemento se asocian con predisposición a infecciones (sobre todo debidas a bacterias encapsuladas) y a procesos de autoinmunidad (Skattum *et al.*, 2011).

Bajo condiciones no patológicas, las células huésped no se ven afectadas por el ataque autólogo del complemento ni la formación del MAC. Esto es gracias a la presencia de reguladores

negativos solubles y de membrana. Algunos ejemplos de reguladores solubles son el inhibidor de C1, el factor H (FH), el factor I, la proteína de unión a C4 (“*C4 binding protein*”, C4BP), la vitronectina o la clusterina. Algunos ejemplos de reguladores de membrana son CD35, CD46, CD55 o CD59 (Mizuno *et al.*, 2018). Por ello, defectos en la regulación del complemento pueden suponer diversas patologías de naturaleza autoinmune debido a un exceso de actividad sobre células huésped. Algunos ejemplos son el angioedema hereditario, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome hemolítico urémico atípico, las glomerulopatías C3 o la hemoglobinuria paroxística nocturna (Noris y Remuzzi, 2013). Esto pone de relieve la importancia de una adecuada regulación de esta cascada.

Determinadas bacterias como *Neisseria meningitidis*, cuentan con numerosos mecanismos para favorecer su permanencia en el huésped. Algunos de estos consisten en el reclutamiento de los reguladores negativos FH y C4BP. Otros se basan en la presencia de la cápsula y de ciertas isoformas de la membrana de lipopolisacáridos (LPS), lo que dificulta el reconocimiento de los carbohidratos de superficie, la opsonización, la fagocitosis o la unión de anticuerpos. Estas bacterias, además, cuentan con mecanismos muy efectivos para la adquisición de fuentes de carbono (como el lactato), lo que incrementa su supervivencia en el organismo. Cabe destacar también la liberación en sangre de vesículas que contienen los componentes del LPS. Con esto se desvía la acción del complemento hacia esas vesículas, permitiendo que las bacterias pasen desapercibidas (Schneider *et al.*, 2007).

1.2 Meningitis y sepsis meningocócicas

La etiología de la meningitis engloba algunos tipos de medicación, agentes bacterianos como *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*, y agentes víricos, como el *Herpes simplex* o el citomegalovirus, entre otros. La enfermedad se caracteriza por una inflamación de las meninges, que son capas de tejido conjuntivo que cubren el tejido nervioso. Como consecuencia de esta inflamación, se produce una extrema rigidez del cuello, fiebre, dolor de cabeza, y síntomas más graves, como fotofobia, problemas de visión, parálisis facial, convulsiones, etc. La meningitis bacteriana suele implicar un cuadro clínico mucho más grave que el de la meningitis vírica (Putz *et al.*, 2013).

En lo referente a la sepsis, esta se define como una disfunción multiorgánica que amenaza la vida y está causada por una respuesta desregulada a una infección. Durante un episodio de sepsis se produce la activación temprana de mediadores pro y antiinflamatorios. Esto provoca daños en órganos y tejidos y da paso a alteraciones no inmunológicas, ya sean cardiovasculares, neuronales, hormonales, metabólicas o de coagulación (Postelnicu y Evans, 2017).

1.3 Properdina

La P está codificada por el gen *CFP*, el cual consta de 10 exones. Se trata de una glicoproteína de 442 aminoácidos y 53 kDa (Michels *et al.*, 2018) de peso molecular. Cada monómero consta de (figura 2): un péptido líder de 27 aminoácidos (Chen *et al.*, 2018), codificado por el exón 2; una región N – terminal truncada, denominada *thrombospondin type 1 repeat 0* (TSR0) y codificada por el exón 3; la repetición en tándem de 6 dominios TSR, donde los cinco primeros (TSR1 al TSR5) son codificados por los exones del 4 al 8 (un TSR por exón) mientras que el TSR6 es codificado por el exón 9 y parte del 10; y una región C – terminal codificada por el exón 10 (Fijen *et al.*, 1999; Barnum y Schein, 2017).

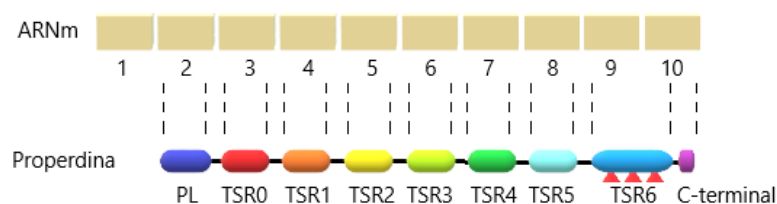


Figura 2. Correlación entre la información contenida en el ARN mensajero (ARNm) y los diferentes dominios de la properdina. El ARNm consta de 10 exones. El exón 1 se transcribe pero no se traduce. Cada monómero (442 aminoácidos) de P consta de un péptido líder (PL, 27 aminoácidos) codificado por el exón 2, una región N – terminal truncada (TSR0) codificada por el exón 3, cinco dominios TSR (TSR1 al TSR5) codificados por los exones 4 al 8 (un dominio TSR por exón), un dominio TSR6 codificado por el exón 9 y parte del 10, y una región C–terminal codificada por el exón 10. El TSR6 contiene un sitio de glicosilación de 25 aminoácidos (representado con triángulos rojos).

El TSR6 contiene un sitio de glicosilación de 25 aminoácidos, aunque dicha modificación post – traduccional no es esencial para la actividad de la proteína (Hartmann y Hofsteenge, 2000). Por su parte, el exón 1 se transcribe pero no se traduce (Fijen *et al.*, 1999; Barnum y Schein, 2017).

En cuanto a su síntesis, la P la producen los leucocitos, los monocitos y los mastocitos, mayoritariamente (Michels *et al.*, 2018). Esto supone una diferencia respecto a la mayoría de las proteínas del complemento, que son sintetizadas en el hígado.

En lo referente a su función, tal y como ya se ha mencionado, la P favorece la formación y estabilidad de la C3 convertasa y la estabilidad de la C5 convertasa. Es decir, desempeña un papel de regulador positivo de la vía alternativa (Corvillo *et al.*, 2016). Otra función para la P fue descrita por Michels *et al.* (2018), que destacan la importancia de esta proteína en el cambio de C3 a C5 convertasa en la superficie celular. De hecho, las C5 convertasas requieren de una superficie (y no de un medio fluido) para su formación debido a la elevada cantidad de C3b demandada. Sin embargo, se desconoce si la P es importante para la formación de la C5 convertasa o solo para su estabilización.

Por otro lado, la P purificada se ha descrito como iniciadora de la vía alternativa en numerosas superficies, además de la de un patógeno. Los eritrocitos, las células necróticas o apoptóticas, las plaquetas y las células epiteliales del túbulo proximal de las nefronas, también pueden actuar como dianas para la iniciación de la vía alternativa. No obstante, la P circulante solo demostró poder unirse a la superficie de células necróticas. Finalmente, la P puede formar oligómeros, ya sean dímeros, trímeros y tetrameros (figura 3), en una proporción 1:2:1, respectivamente. No obstante, la estructura exacta de los mismos se desconoce (Michels *et al.*, 2018).



Figura 3. Modelos de la estructura de un monómero, un dímero, un trímero y un tetramero (de izquierda a derecha) de P. Los monómeros de P constan de 7 dominios TSR (TSR0 al TSR6). Para la formación de oligómeros debe tener lugar la interacción TSR0-1/TSR5-6, que define los vértices de los mismos.

La importancia de la oligomerización para el correcto funcionamiento de la P no está del todo clara. Tras diversos experimentos, Pedersen *et al.* (2017) demostraron que la oligomerización no es esencial para la interacción de la P con C3b o con las proconvertasas C3Bb o C3bBb. Es decir, el monómero de P también es capaz de llevar a cabo estas interacciones. Sin embargo, observaron que la oligomerización suponía una reducción de la constante de disociación, favoreciendo la formación y estabilidad de estos complejos. Otro de los experimentos demostró que, para el mismo grado de lisis de eritrocitos, se requiere de una mayor concentración de P monomérica en comparación con la P oligomérica. Esto sucede por dos motivos: el primero es que los oligómeros de P son mucho más efectivos en la estabilización de las convertasas C3 y C5 sobre la superficie de los eritrocitos en comparación con los monómeros. El segundo motivo es que la deposición de C3b también se ve incrementada cuando se trata de oligómeros y no monómeros de P. En resumen, la oligomerización, al igual que la P en sí, juega un rol de regulador positivo, en este caso, de cara a la función de la proteína.

1.4 Deficiencias en la vía alternativa: P, FB y FD

La deficiencia de P es un carácter recesivo asociado al cromosoma X (Michels *et al.*, 2018). Los pacientes con esta deficiencia presentan especial susceptibilidad a sepsis causada por infecciones de bacterias del género *Neisseria*. Existen tres tipos de deficiencia: tipo I, II y III. La deficiencia de tipo I, en la que hay una ausencia absoluta de P circulante, se asocia generalmente

a un producto génico truncado o a alteraciones conformacionales que impiden la secreción de la proteína. La deficiencia de tipo II se caracteriza por niveles muy bajos de la proteína (<10% de los niveles normales), normalmente, debido a un mayor catabolismo de las formas mutantes. Por último, en la deficiencia de tipo III, los niveles de P son normales pero la proteína es disfuncional y no es capaz de interactuar con C3b (Chen *et al.*, 2018).

El diagnóstico genético de diversos casos de meningitis (Braconier *et al.*, 1983; Schlesinger *et al.*, 1993; Sjöholm *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 1990) y de sepsis meningocócica mostró alteraciones en el gen de la P, lo que permitió establecer una asociación directa entre ambos fenómenos. Chen *et al.* (2018) determinaron, tras diversos ensayos *in vitro*, otras patologías asociadas con la deficiencia de P, como la infección por parte de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Citrobacter rodentium* o *Listeria monocytogenes*. También se determinaron patologías no infecciosas asociadas a esta deficiencia, como la artritis reumatoide, el asma, o la colitis.

Por su parte, la deficiencia de FB se ha asociado a diversas patologías, como meningitis o neumonía, entre otras (Dehoorne *et al.*, 2008; Slade *et al.*, 2013).

En lo referente a la deficiencia de FD, esta también se ha asociado a infecciones de *Neisseria meningitidis*, tanto en forma de meningitis como en forma de sepsis (Skattum *et al.*, 2011). Al igual que para la deficiencia en FB, también se han descrito casos de infección por *Streptococcus pneumoniae* (Ram *et al.*, 2010).

El presente trabajo se centra en el diagnóstico molecular de un varón de 16 años que estuvo ingresado por una meningitis meningocócica con hemocultivo positivo a *Neisseria meningitidis* serotipo Y. El objetivo ha sido la identificación y clasificación de la deficiencia. Para ello, se ha caracterizado bioquímica y molecularmente el sistema del complemento del paciente. Estos estudios han llevado a la localización e identificación de una mutación en el gen *CFP* (gen de la P). Esta mutación se propone como responsable de la deficiente activación, por la vía alternativa, del sistema del complemento en el paciente.

CAPÍTULO 2: Material y métodos

2.1 Muestras biológicas

Para la obtención del suero y plasma, las muestras de sangre se centrifugaron a 2500 rpm, 10 min, a 4°C. Posteriormente, tanto el suero como el plasma-EDTA se separaron y se alicuotaron, guardándose a – 80°C hasta su uso.

Para la obtención del ADN, a partir de un tubo de sangre EDTA se aislaron los leucocitos y se extrajo el ADN con el kit PUREGENE® Quick Tips (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la cuantificación, se guardó a – 80°C hasta su uso.

Todos los procedimientos que involucraron muestras humanas fueron llevados a cabo de acuerdo con los estándares del Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz y de acuerdo con la declaración de Helsinki de 2013. Todos los participantes aportaron informes consentidos para su participación en el estudio y para la publicación de su información clínica y bioquímica.

2.2 Determinación de niveles plasmáticos de C3, C4 e Igs

La cuantificación de C3, C4, IgG, IgA e IgM se llevó a cabo por nefelometría, haciendo uso del analizador BN II System (Siemens Healthineers España).

2.3 Cuantificación de FB

Las placas de ELISA (Nunc, Thermo Fisher Scientific) se sembraron con 1 µg/pocillo de una solución del anticuerpo policlonal de captura desarrollado en cabra (Calbiochem, #341272), dirigido contra la P y diluido en tampón carbonato/bicarbonato (1,59 g/L Na₂CO₃; 2,93 g/L NaHCO₃; pH = 9,6). Posteriormente, cada placa se incubó durante toda la noche a 4°C. Tras lavar la placa con PBS-Tween 20 0,1% (PBS-T), ésta se saturó con 200 µl/pocillo de PBS – BSA 1% y se incubó durante 1 h a 37°C. Para calcular los niveles de FB se diseñó una curva con proteína purificada (Complement Technology, Inc.). Las muestras se diluyeron en PBS – BSA 0,1% desde una dilución 1:1000 hasta una dilución 1:128.0000. A continuación, se incubó la placa a 37°C durante 1 h. Posteriormente, se empleó como anticuerpo de detección un monoclonal generado en ratón y dirigido contra el fragmento Bb (A227, Quidel) a una dilución 1:1000. Finalmente, se agregaron 100 µl/pocillo del correspondiente anticuerpo secundario (Jackson Immunoresearch), generado en cabra y dirigido contra el anticuerpo monoclonal de detección, a una dilución 1:5000. Para el revelado se agregaron 100 µl/pocillo de ABTS (Sigma) y se llevó a cabo la lectura a 405 nm. Todos los detalles relativos a los anticuerpos utilizados en esta técnica de ELISA se encuentran en la tabla A1 del anexo A.

2.4 Cuantificación de P

La determinación de los niveles circulantes de P se llevó a cabo por medio de un ensayo previamente publicado por el grupo Corvillo *et al.* (2016). Las placas de ELISA (Nunc, Thermo Fisher Scientific) se sembraron con 100 ng/pocillo de una solución del anticuerpo monoclonal anti-FP#2 (A235, Quidel), generado en ratón, dirigido contra la P y diluido en tampón carbonato/bicarbonato pH = 9,6. Tras esto, cada placa se incubó durante toda la noche a 4°C. Tras lavar la placa con PBS-T, se bloqueó con PBS – BSA 1% y se incubó durante 1 h a 37°C. Con el fin de calcular los niveles de P se diseñó una curva con un conjunto de sueros de donantes, previamente cuantificado. Los sueros se diluyeron 1:400, 1:800 y 1:1600 en PBS–BSA 0,1% y se incubaron durante 1 h a 37°C.

Para detectar la P se utilizó un antisuero de cabra frente a P (GAHu/PDD, Nordic Immunology) diluido 1:1000, seguido del correspondiente anticuerpo secundario de conejo frente a cabra, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (P0449, Dako) y diluido 1:5000. La reacción se reveló con ABTS y se midió la absorbancia de cada uno de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm. Todos los detalles relativos a los anticuerpos utilizados en esta técnica de ELISA se encuentran en la tabla A1 del anexo A.

2.5 Western blot

Se fraccionaron 10 µl por pocillo de una dilución 1/25 del suero del paciente y de los controles en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% (12,5 ml acril-bis 40% 29:1; 12,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH = 8,8; 0,5 ml SDS 10% (p/v); 24,2 ml agua miliQ; 0,25 ml (NH₄)₂ S₂ O₈ 10% (p/v); 25 µl TEMED). Como control positivo se cargaron 100 ng de P purificada (Complement Technology, Inc.). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa haciendo uso del dispositivo IBlot™ (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor. La membrana se bloqueó con PBS-5% de leche desnatada durante 1 h a temperatura ambiente. Tras quitar el exceso de tampón de bloqueo con PBS – T, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y con dos anticuerpos primarios diferentes (ambos dirigidos a la P): un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón (1/500) y un policlonal aislado de cabra (1/500).

Tras eliminar el exceso de anticuerpo con varios lavados, las membranas se incubaron con su anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina (dilución 1/5000 para el anti-ratón y 1/10000 para el anti-cabra). Finalmente, se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (*Streptomyces avidinii*, S2890, SIGMA) diluida 1:1000. Tras cada una de estas incubaciones, se lavó 3 veces con PBS – T. Todos los detalles de los anticuerpos utilizados se encuentran en la tabla A1 del anexo A. La membrana se reveló con NBT/BCIP (Amresco, Inc.).

2.6 Ensayo hemolítico para medir la actividad de la vía clásica (CH50)

Los hematíes se ajustaron a 10^9 células/ml en VBS⁺⁺ 1/5 (5 mM veronal; 145 mM NaCl; 0,025 % NaN₃; 0,15 mM CaCl₂; 0,5 mM MgCl₂; pH = 7,3). Sobre esta disolución se preparó una disolución de trabajo 1/160 con VBS⁺⁺. A todos los sueros, tanto al suero humano normal (SHN), usado como control, como al del paciente, se les agregaron 2,2 ml de esta solución 1/160 de hematíes lavados. El blanco del ensayo se elaboró incubando las células con tampón (0% lisis) mientras que el 100% se obtuvo incubando los eritrocitos en agua destilada. Todos los tubos se incubaron en un baño a 37°C, 30 min y se centrifugaron a 2500 rpm, 10 min y a 4°C. La absorbancia de los sobrenadantes se leyó a 412 nm. Los criterios de aceptación fueron 200 – 400 U/ml para el SHN y 0 U/ml para el suero descomplementado.

2.7 Ensayo hemolítico para medir la actividad de la vía alternativa (AP50)

Se partió de hematíes en disolución con GVB⁻-EDTA 0.04 M (GVB: 0,1% gelatina; 5 mM veronal; 145 mM NaCl; 0,025 % NaN₃; pH = 7,3). Estos se lavaron 2 veces con AP – CFTD (2,5 mM barbital; 1,5 mM barbital de sodio; 144 mM NaCl; 7 mM MgCl₂; 10 mM EGTA; pH 7,2-7,4) y 100 µl de hematíes lavados se mezclaron con 9,9 ml de AP – CFTD. A todos los sueros, tanto a los sueros control como al suero del paciente, se les añadieron 200 µl de hematíes. Todos los tubos se trataron y leyeron de la misma forma que la descrita en el ensayo CH50. Los criterios de aceptación fueron 15 – 25 U/ml para el control positivo y 0 U/ml para el control negativo.

2.8 Análisis genético

El primer paso del análisis genético fue una PCR de amplificación. Se llevó a cabo con las parejas de cebadores y los reactivos indicados en las tablas 1 y 2, respectivamente:

Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) y fueron sintetizados por la empresa IDT (Integrated DNA Technology). La temperatura de anillamiento fue de 65°C. El producto de PCR se separó en un gel de electroforesis al 1,2% de agarosa y se purificó siguiendo las instrucciones del kit QIAquick® Gel extraction (QIAGEN). Sobre el producto purificado se llevó a cabo una PCR de secuenciación basada en el método Sanger por utilización de Bright – Dye 3.1 (Brilliant Dye terminator, version 3.1 Ready reaction Premix, BRD3 – 100, Nimagen). El ADN se precipitó con etanol y se mandó al servicio de Secuenciación.

Tabla 1. Parejas de cebadores utilizadas para la amplificación de los exones (1 al 10) de la P y tamaños (pb) de los amplicones para cada pareja.

Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño amplicón
1	5'ACTCGATGCTCCCTCCAC 3'	3'TGTTTGTACTATATCCCCAGCAC 5'	300 pb
2	5'AGTTCCTCCTGCCTCTAGGTT 3'	3'CTCGGTCAGGGATGTGGT 5'	246 pb
3	5'CCCACCACATCCCTGACC 3'	3'AAGAAAGTGCCCAAGTTTTGG 5'	283 pb
4	5'CTTACTGCGGACCTGGTGTT 3'	3'AAGCAGACTGTCCCCAAATG 5'	1526 pb
5	5'GAAGCAAAGAGCCCTGAATG 3'	3'CTGGCAGTTCCTGCTGTAA 5'	309 pb
6	5'CTTACTGCGGACCTGGTGTT 3'	3'AAGCAGACTGTCCCCAAATG 5'	1526 pb
7	5'AAGGGTCTAGGGGCTGAGAG 3'	3'ACTCGGCAAGGCAGATACC 5'	1075 pb
8	5'CCCTCATTCCTTCCTCTGAA 3'	3'GGTCTTGGTGGGAAAGTGAG 5'	386 pb
9	5'AAGGGTCTAGGGGCTGAGAG 3'	3'ACTCGGCAAGGCAGATACC 5'	1075 pb
10	5'GTAGCCCTCGGCATATAGCA 3'	3'GAGATGCTATCACCTACTTTTGG 5'	398 pb

Tabla 2. Volúmenes (µl) de cada reactivo de PCR agregados a un tubo de reacción.

	Reactivo	Cantidad (µl) / tubo
Mix 1	H ₂ O	12
	dNTPs 5 µM	1
	Cebador sentido 10 µM	5
	Cebador antisentido 10 µM	5
	ADN	2
Volumen Mix 1		25
Mix 2	H ₂ O	19,95
	Buffer 10X + Mg para reacción de PCR (Roche)	5
	ADN polimerasa Taq (Roche)	0,25
Volumen Mix 2		25
Volumen final		50

2.9 Análisis computacional

Los resultados de la secuenciación se alinearon respecto a las secuencias de referencia contenidas en el servidor BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las mutaciones localizadas en dicho alineamiento se analizaron con herramientas contenidas en bases de datos como ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) o UniProt (<https://www.uniprot.org/>), entre otras. La predicción de la estructura terciaria de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos, tanto mutada como sin mutar, se llevó cabo con el servidor PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

El posterior análisis de los modelos obtenidos en PHYRE2 se llevó a cabo con el programa DeepView version 4.0.1 y el programa CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/>). La predicción de los efectos de estas mutaciones se realizó con diferentes programas: PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer; provean.jcvi.org), PolyPhen – 2, (Polymorphism Phenotyping v2; genetics.bwh.harvard.edu/pph2), Mutation Taster (www.mutationtaster.org) y SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant; sift.bii.a-star.edu.sg/sift4g).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

3.1 Estudio inmunológico del sistema del complemento

En este trabajo se ha realizado el diagnóstico molecular de un paciente que sufrió un episodio de meningitis y un episodio de sepsis meningocócica a los 16 años. Puesto que se sospechaba de una alteración en una proteína del sistema inmune, y con el objetivo de descartar candidatos hasta localizar dicha proteína, se tomaron muestras de suero del paciente. En ellas se determinaron los niveles de diferentes proteínas mediante diversas técnicas. Los niveles plasmáticos de C3, C4 (proteínas del complemento) e Igs fueron determinados por nefelometría. Esta técnica se basa en medir la difracción de un haz de luz que se produce cuando este atraviesa una muestra con una turbidez distinta de 0. El grado de difracción es proporcional a la concentración del producto a analizar (Saliterman, S. S, 2006). Los resultados obtenidos figuran en la tabla 3.

Tabla 3. Niveles plasmáticos en el paciente y de referencia de C3, C4, IgG, IgA, IgM, FB (mg/dl) y P (µg/ml), y actividad (U/ml) en el paciente y de referencia para los ensayos CH50 y AP50. Los niveles plasmáticos de estas proteínas se determinaron por nefelometría. Todos los valores, tanto de niveles de proteínas como de actividad, son normales en el paciente, a excepción de los niveles de P (no detectable) y la actividad en el ensayo AP50 (7,5 U/ml < 15 U/ml), ambos por debajo del nivel normal.

	C3 (mg/dl)	C4 (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	FB (mg/dl)	P (µg/ml)	CH50 (U/ml)	AP50 (U/ml)
Paciente	219	47,6	1280	248	253	25,8	No detectable	217,78	7,5
Rango de referencia	75 - 135	14 - 60	725 - 1900	50 - 340	45 - 280	12,9 - 27,9	7,5 - 45,5	200 - 400	≥15

Los niveles plasmáticos de C3, C4 e Igs fueron normales en la muestra de suero del paciente. Sin embargo, aunque desde el punto de vista cuantitativo los niveles de una determinada proteína sean adecuados, es necesario analizar si éstas funcionan correctamente. Para ello, se llevó a cabo la medida de la actividad de la vía clásica (CH50) y de la vía alternativa (AP50) del complemento.

El ensayo CH50 es un ensayo hemolítico en el que se estudia la capacidad de las proteínas plasmáticas para lisar glóbulos rojos a través de la vía clásica. En este ensayo se utilizan glóbulos rojos aislados de oveja que se encuentran sensibilizados con hemolisina (anticuerpos de conejo dirigidos a los glóbulos rojos de oveja). La sensibilización los hace susceptibles de ser lisados por el complemento a través de la vía clásica. Cuando se añade el suero cuya actividad se quiere estudiar, si no existe ninguna deficiencia, ni cuantitativa ni cualitativa, los eritrocitos se acabarán lisando. Sin embargo, para un suero con niveles o actividad indetectables o muy bajos de cualquiera de las proteínas de esta vía, el CH50 dará un valor muy bajo o cero. En el

caso que se está estudiando se obtuvo una actividad CH50 dentro de los rangos de normalidad (tabla 3). Esto permitió concluir que no existe una deficiencia ni funcional ni cuantitativa de alguno de los componentes partícipes de la ruta.

En lo referente al ensayo hemolítico AP50, el fundamento es muy similar al explicado para el CH50. En este caso, los tampones utilizados favorecen la actuación de las proteínas de la vía alternativa y no la de las proteínas de las otras dos vías del complemento. Para este ensayo se obtuvo una actividad por debajo del mínimo del rango de normalidad (tabla 3).

En este procedimiento diagnóstico no se estudió la vía de las lectinas. Cuando se quiere analizar esta ruta, se llevan a cabo ensayos ELISA dirigidos a diferentes componentes de esta ruta (MBLs, por ejemplo) (Garred *et al.*, 2016; Osthoff *et al.*, 2017). Los ensayos hemolíticos CH50 y AP50 son procedimientos más baratos y sus resultados fueron concluyentes para este estudio, lo que hizo innecesario centrar la sospecha de la deficiencia en la vía de las lectinas.

Para averiguar qué podía estar ocasionando esa baja actividad hemolítica de la vía alternativa, se procedió a la cuantificación de FB y P en plasma mediante un ELISA. FB y P son componentes exclusivos de la vía alternativa (figura 1). Además, la deficiencia de FB se ha asociado a episodios de meningitis (Slade *et al.*, 2013), entre otras patologías. Dicho candidato se descartó al detectar niveles normales (tabla 3).

Por su parte, la P en el suero del paciente fue indetectable (tabla 3). Con este resultado se pudo concluir que el paciente presentaba una deficiencia de P, compatible con una deficiencia de tipo I (ausencia total de la proteína en el suero). El suero del paciente, debido a la ausencia de P, no es capaz de lisar los glóbulos rojos de manera tan efectiva. Esto se debe a que la formación y estabilización de las convertasas de la vía alternativa se encuentra parcialmente disminuida. Puesto que no se formarán tantas convertasas, no se producirán tantos componentes de la vía terminal. En esta situación, el MAC no podrá ensamblarse con la frecuencia y eficacia esperadas en condiciones de salud, explicando así la actividad disminuida en el ensayo AP50.

Si tanto el ensayo CH50 como el AP50 hubieran mostrado una disminución o ausencia de la actividad del complemento, esto habría sido un indicativo de que la deficiencia o ausencia estaría afectando a uno (o más) de los componentes comunes a las tres vías. El diagnóstico se habría centrado, por tanto, en C3 y en las proteínas terminales (C5, C6, C7, C8 y C9).

CH50 y AP50 son medidas indirectas. Por ello, de manera adicional, se procedió a confirmar la ausencia de P en el suero del paciente por medio de *western blot*. Como control negativo se incluyó un suero en el cual se eliminó la P previamente (suero deplecionado en properdina; SDP) y, como control positivo, se incluyó un SHN.

Los resultados se reflejan en la figura 4. La P fue detectada en la solución de properdina purificada y de SHN (carriles 1 y 2, respectivamente), mientras que no se pudo detectar en el SDP ni en el suero del paciente (carriles 3 y 4, respectivamente). La presencia de la P tanto en el carril 1 como en el carril 2 concuerda con lo esperado. El carril 2 muestra una banda más difusa para la P, pues la proteína se encuentra más diluida que en la solución purificada cargada en el carril 1. La no detección de P en cualquiera de estos carriles habría sugerido un mal reconocimiento por parte de los anticuerpos, ya fuera por alteraciones en la estructura de estos, fallos en el procedimiento del experimento en sí o alteraciones en la P y/o el epítipo a reconocer. La ausencia de P en el SDP también concuerda con lo esperado. La detección de P en el SDP habría indicado defectos en el proceso de eliminación de la P en esta muestra.

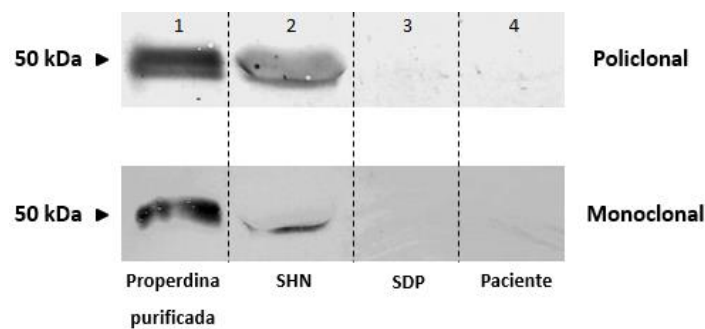


Figura 4. Western blot para la detección de P en el suero del paciente. Las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal y con un anticuerpo monoclonal, ambos dirigidos contra P. En la línea 1 se observa la presencia de P purificada (50 kDa); en la línea 2 se cargó el suero SHN, donde la P también se puede observar, pero de forma más difusa; en la línea 3 se cargó el SDP, donde la P no puede detectarse y, en la línea 4, se cargó la muestra de suero del paciente con sospecha de deficiencia de P. El resultado demuestra que el paciente no tiene P en suero.

Dado que los controles arrojaron los resultados esperados y no fue posible detectar P en el suero del paciente, este ensayo constituye una prueba más de que el paciente presenta una deficiencia de tipo I. Si se tratara de una deficiencia de tipo II, se podría observar una banda a la altura de 53 kDa para el suero del paciente, aunque más leve respecto a la banda del SHN. En este tipo de deficiencia, la proteína se sintetiza y secreta en cantidades menores a lo normal. En el caso de una deficiencia de tipo III, cabría esperar una banda para la P en el suero del paciente con una intensidad similar a la del SHN. En las deficiencias de tipo III, la cantidad de P es normal y el problema radica en la incapacidad de la proteína para interactuar con C3b (Chen *et al.*, 2018). Otra opción posible habría sido la aparición de varias bandas de diferente peso molecular en el carril del paciente, lo que habría sugerido un proceso de splicing alternativo.

Los episodios recurrentes de meningitis y de sepsis meningocócica no son exclusivos de la deficiencia de P. De hecho, están asociados a numerosas deficiencias en diferentes proteínas del sistema del complemento (Abbas *et al.*, 2015). Por ello, durante el presente estudio se han

determinado también los niveles de algunas de las proteínas del complemento más comunes (C3, C4), así como los niveles de Igs.

Respecto al componente C3, la asociación entre la deficiencia de esta proteína e infecciones severas, entre ellas, la meningitis, fue descrita por Okura *et al.* (2016). En este estudio se mostraba a 15 pacientes deficientes en C3 y enfermos de meningitis. La deficiencia de C3 también se ha relacionado con infecciones de neumonía o bronquitis (Kida *et al.*, 2008). Por su parte, la deficiencia de C4 y, en concreto, la del haplotipo C4B en homocigosis, también se ha asociado a meningitis (Rowe *et al.*, 1989; Jaatinen *et al.*, 2003).

Esta enfermedad también se ha descrito como una consecuencia de las denominadas hipogammaglobulinemias, un conjunto de enfermedades provocadas por una deficiencia en los niveles de Igs. Palacios *et al.* (2015) describieron un caso en el que la hipogammaglobulinemia fue el principal motivo de susceptibilidad al desarrollo de una meningoencefalitis. Las hipogammaglobulinemias pueden producirse por numerosas causas: mutaciones en determinados genes como *BTK* (“*Bruton tyrosine kinase*”) (Conley, 2009), CD19 o BAFF (“*B cell activation factor*”) (Bogaert *et al.*, 2016), infecciones por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) (Vaillant y Qurie, 2019) o tratamientos farmacológicos con medicamentos como rituximab (Christou *et al.*, 2017). También pueden ser de naturaleza iatrogénica (Hoffman *et al.*, 2015).

Los resultados de niveles plasmáticos de proteínas del complemento del paciente presentado en este caso coinciden con los del paciente estudiado por Genel *et al.* (2006). Este paciente había sufrido episodios de meningitis y de sepsis meningocócica, así como infecciones respiratorias. Su hermano mayor presentó también antecedentes de meningitis, por lo que este grupo se centró, no solo en el paciente *propositus*, sino que incluyó a sus dos hermanos. Los tres varones presentaron niveles normales de Igs, C3, C4, FB y actividad normal en el ensayo CH50. En el ensayo AP50, la actividad hemolítica no fue detectable en ninguno de los tres. Lo mismo ocurrió con los niveles de P, lo que los llevó a diagnosticar una deficiencia de P tipo I.

En este estudio, el hecho de que el ensayo AP50 diera una actividad indetectable, no concuerda con la función canónica de P en la activación de la vía alternativa. Esta actúa como un regulador positivo de la ruta, lo que significa que no es un componente imprescindible, como podrían ser FB o FD. Esto implica que la vía alternativa puede seguir activándose y formando el MAC pese a la ausencia de P. Por ello, cabría esperar que el ensayo AP50 mostrara un mínimo de actividad, seguramente por debajo de la correspondiente a un SHN, pero no indetectable. Para deficiencias de FB y/o FD, sí sería totalmente esperable un AP50 igual a cero.

Otro caso muy similar al descrito previamente es el estudiado por Bathum *et al.* (2006), donde los pacientes, también tras sufrir varios episodios de meningitis, presentaron el mismo perfil del sistema del complemento que el paciente del presente caso. La deficiencia de estos pacientes fue también de tipo I.

En conclusión, la combinación de diversas técnicas bioquímicas cuantitativas y cualitativas para analizar el estado del sistema del complemento, ha ayudado a orientar el diagnóstico hacia una deficiencia de P. Además, los hallazgos de laboratorio han sido reforzados mediante la comparativa del cuadro clínico con otros casos descritos en la bibliografía (Braconier *et al.*, 1983; Schlesinger *et al.*, 1993; Sjöholm *et al.*, 1988, Nielsen *et al.*, 1990), y la existencia de un patrón de herencia ligado al cromosoma X.

3.2 Secuenciación y análisis computacional

Con el objetivo de localizar la alteración genética responsable de la deficiencia de P, se secuenciaron, mediante el método Sanger, los exones del gen de interés (*CFP*).

En el exón 8 se observó una transición de timina (T) a citosina (C) (figura 5), concretamente, en la posición 1251 del ADN complementario (ADNc; referencia de la secuencia de ADNc: CCDS14282.1). Se trata de una mutación no descrita que afecta al codón TGT. Este pasa a ser un codón CGT y provoca un cambio en la Cys de la posición 337 de la proteína por Arg, afectando al dominio TSR5. En UniProt se localizó esa Cys337 como partícipe de la formación de un puente disulfuro con la Cys376.

En el exón 10 se observó una transición de C a T (figura 6), concretamente, en la posición 1285 del ADNc. Se trata de un polimorfismo ya descrito. Es un cambio sinónimo, pues tanto el triplete AAC como el AAT codifican para la Asn (asparagina).

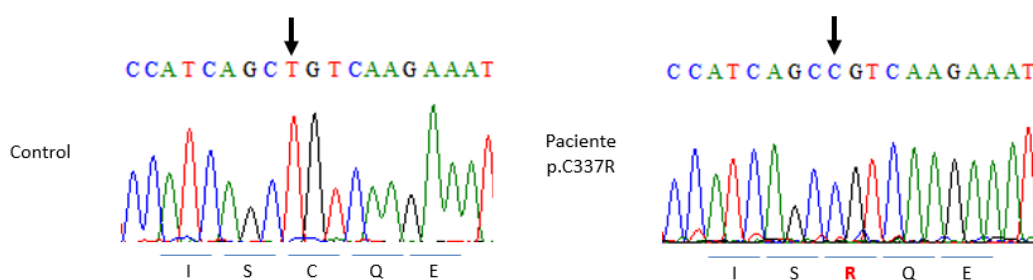


Figura 5. Cromatograma de la región de interés obtenido para el exón 8 en un control (izquierda) y en el paciente de estudio (derecha). La secuenciación se llevó a cabo aplicando el método Sanger. Cada pico de color representa un nucleótido secuenciado (C: azul; Adenina (A): verde; T: rojo; Guanina (G): negro). Debajo de cada pico se representan las abreviaturas de una sola letra oficiales para los aminoácidos codificados por cada triplete. La transición T > C conlleva un cambio de aminoácido de Cys por Arg.

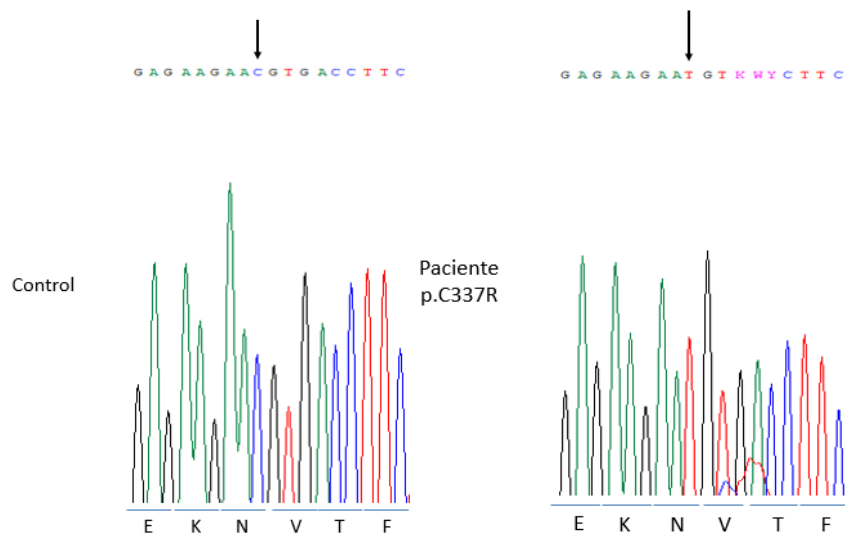


Figura 6. Cromatograma de la región de interés obtenido para el exón 10 en un control (izquierda) y en el paciente de estudio (derecha). La secuenciación se llevó a cabo aplicando el método Sanger. Cada pico de color representa un nucleótido secuenciado (C: azul; A: verde; T: rojo; G: negro). Debajo de cada pico se representan las abreviaturas de una sola letra oficiales para los aminoácidos codificados por cada triplete. La transición C > T no conlleva un cambio de aminoácido (mutación silenciosa).

Para analizar los cambios localizados y sus efectos con un mayor grado de detalle, se estudió la información aportada por las bases de datos ENSEMBL (CFP: [ENSG00000126759](#)) y UniProt (CFP: [P27918](#)), además de utilizar programas de predicción del efecto de mutaciones como PROVEAN, PolyPhen, Mutation taster y SIFT. Los resultados se han reflejado en la tabla 4.

Tabla 4. Cambios localizados en el ADN del paciente respecto a la secuencia de referencia e información relativa a ellos. Se indica la localización (exón), el nombre de estas variantes, el valor MAF (indicativo de la frecuencia con la que se encuentran estas variantes en la población), las consecuencias a nivel proteico y la predicción de los efectos de estos cambios realizada por los softwares PROVEAN, PolyPhen, Mutation taster y SIFT.

Exón	Nombre de la variante	Cambio	Minor Allele Frequency (MAF)	Consecuencias
8	No descrita	T > C	No determinado	Cambio de aminoácido
10	rs1048118	C > T	0,21	Sinónima
Programas de predicción				
Exón	PROVEAN	PolyPhen	Mutation taster	SIFT
8	“Deleterious”	“Benign”	“Disease causing”	“Deleterious”
10	-	-	“Polymorphism”	-

Tres de los cuatro programas de predicción del efecto de mutaciones establecieron este cambio como deletéreo. PolyPhen, por su parte, predijo este cambio como benigno.

Tal y como se esperaba, el cambio localizado en el exón 10 es un polimorfismo y no tiene ningún efecto patogénico asociado. El valor MAF, un indicador de la frecuencia con la que se

puede encontrar un determinado cambio en la población, también refleja este hecho. Para mutaciones deletéreas, el MAF es mucho más bajo debido al reducido número de personas que portan esa mutación.

La predicción de un efecto deletéreo concuerda con el fenotipo del paciente, altamente susceptible a infecciones muy severas que, sin tratamiento médico, pueden poner en peligro la vida y suponer la muerte. Por el contrario, la predicción de este cambio como benigno no apoya el fenotipo de este paciente. La predicción realizada por estos programas se basa en la literatura disponible acerca de las características físico-químicas que definen la estructura de proteínas, la relación estructura-función proteica, estudios evolutivos, etc. Dependiendo de los parámetros o información que se tengan en cuenta en cada software, la predicción será más o menos fiel a la realidad, lo que explica la variedad de resultados posibles.

En lo que respecta a las consecuencias moleculares de los cambios observados, el cambio observado en el exón 10 es una mutación silenciosa, lo que significa que la estructura y, por tanto, la función proteica, permanece intacta.

Por su parte, la transición T > C del exón 8 supone un cambio de triplete de TGT a CGT, lo que implica un cambio de aminoácido de Cys a Arg en el dominio TSR5 (el dominio codificado por el exón 8). Dicho cambio podría conllevar la pérdida del puente disulfuro que se establece en la proteína sin mutar entre la Cys337 y la Cys376, llevando a la alteración de la conformación nativa propia de esta proteína.

Dado que el TSR afectado es el TSR5 y este aparece formando parte de los vértices de los oligómeros (Michels *et al.*, 2018), se podría barajar la posibilidad de que la susceptibilidad de este paciente se deba a la incapacidad de la P para oligomerizar. No obstante, si el problema radicara solo en el proceso de oligomerización, los niveles de P en el suero no serían indetectables. En este supuesto, la P podría detectarse, aunque solo en forma monomérica.

Continuando con la hipótesis centrada en la pérdida de una interacción tan estabilizante como puede ser un puente disulfuro, se plantea la posibilidad de que la proteína mutada no pueda llegar al torrente sanguíneo. Esto puede suceder porque, antes de ser secretada, sea reconocida como una proteína con una estructura defectuosa. En ese supuesto, la proteína sería ubiquitinizada y degradada por el proteasoma (Grice y Nathan, 2016).

Al no haberse amplificado el gen completo sino solo los exones, no se puede asegurar que este cambio sea el único responsable de la deficiencia. Sin embargo, si este cambio realmente afecta a un puente disulfuro y es tan aberrante como se propone en tres de las cuatro predicciones, es bastante improbable que la deficiencia se deba a otras mutaciones.

De hecho, existen numerosos estudios que apoyan la idea de que la pérdida de un puente disulfuro es un cambio conformacional severo desde el punto de vista estructural y, por tanto, funcional. Se suele tratar de un cambio incompatible con el correcto funcionamiento de la proteína.

Schneppenheim *et al.* (1996), estudiando el factor de von Willebrand, descubrieron una mutación que provocaba la misma sustitución que la descrita para el exón 8 de P: un cambio de Cys a Arg. Este cambio implicaba la pérdida de un puente disulfuro clave, en este caso, en la dimerización y consiguiente funcionamiento de este factor. La ausencia de esta Cys suponía la aparición de la enfermedad de von Willebrand. En ella, los pacientes presentan problemas de coagulación, pues el factor de von Willebrand es esencial en la formación de coágulos por parte de las plaquetas (Federici, 2016).

Otro caso en el que la desaparición de un puente disulfuro supuso la pérdida de función de la proteína fue el descrito por Omori *et al.* (1996). Se determinó que una sustitución de la Cys60 por Phe (fenilalanina) en la proteína Cx32, impedía que esta pudiera restaurar uniones de tipo gap. La Cys60 forma un puente disulfuro clave en la unión de los loops extracelulares de las proteínas partícipes en estas uniones. La consecuencia directa era un fallo en la homeostasis de la población celular y en el funcionamiento de los tejidos, provocando la enfermedad de Charcot-Marie Tooth.

Como ya se ha mencionado, esta deficiencia de P también podría deberse a otras mutaciones. Por ejemplo, mutaciones que impidan la unión de la maquinaria molecular de transcripción y la obtención del ARNm. Para comprobar esto, podrían llevarse a cabo experimentos de RT-PCR.

Otra posibilidad a barajar es que la mutación afecte a la secreción de la proteína y no a su estructura, quedando la P acumulada en el medio intracelular, ya que no sería degradada por el proteasoma. Para confirmar esta propuesta, se podrían llevar a cabo ensayos de detección de P en lisados de células del paciente.

Modelización

El siguiente paso fue intentar visualizar las alteraciones estructurales que se producían en el plegamiento de la P tras la mutación descrita. Para ello, se utilizó PHYRE2 como predictor de la estructura a partir de la secuencia de aminoácidos, pues no fue posible trabajar con el modelo experimental almacenado en el Protein Data Bank (PDB, modelo 1W0R).

El modelo propuesto por PHYRE2 para la P sin mutar se ejecutó en DeepView v.4.0.1. El resultado se muestra en la figura 7.

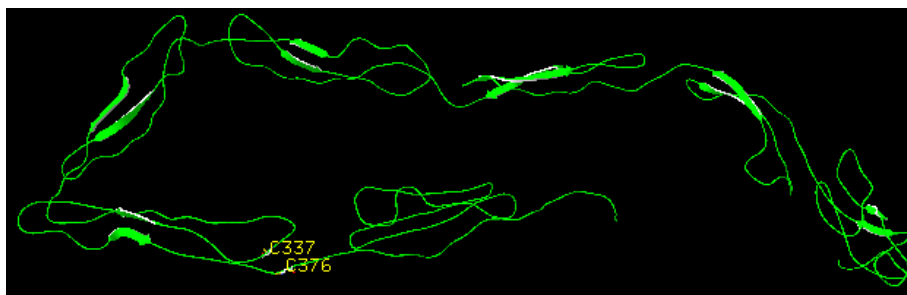


Figura 7. Representación gráfica del modelo estructural de la P sin mutar. La representación se llevó a cabo en el programa DeepView ejecutando el modelo propuesto por PHYRE2. Se han resaltado las posiciones de las Cys337 y Cys376.

El modelo de PHYRE2 representa un monómero de P y coincide en un 100%, tanto en secuencia como en estructura, con la almacenada en el Protein Data Bank (1W0R), aunque esta segunda represente un dímero de P. El modelo 1W0R fue establecido por Sun *et al.* (2004). Con la modelización en DeepView se pudo observar la localización espacial de las Cys que participan en la formación del puente disulfuro establecido por UniProt. La distancia entre los grupos tiol de estas dos Cys, para la estructura optimizada desde el punto de vista energético (la estructura energéticamente más estable), fue de 6,35 angstroms (Å). Por su parte, la distancia entre los carbonos α de los dos residuos de Cys fue de 5,4 Å.

Los átomos de azufre partícipes en un puente disulfuro suelen encontrarse a una distancia de entre 2 y 3 Å (Bhattacharyya *et al.*, 2004; Hainaut *et al.*, 2007). Para los carbonos α , la distancia habitual media es de 5,6 Å (Schmidt y Hogg, 2007).

El modelo de PHYRE2, por tanto, no es totalmente compatible con la formación de un puente disulfuro entre estos dos residuos de Cys. La distancia entre los carbonos α sí apoya esta interacción mientras que la distancia entre los grupos tiol no la apoya. Ante esto, se plantean diferentes explicaciones. Por un lado, puede ocurrir que UniProt esté realizando una predicción errónea al establecer este puente disulfuro y que este, en realidad, no tenga lugar. No obstante, UniProt basa sus predicciones en las posiciones de Cys conservadas en familias de secuencias. Esto hace que resulte más probable otra explicación basada en la falta de precisión en el modelo predicho por PHYRE2. Tanto la localización espacial como la conformación de estos residuos de Cys pueden ser no fidedignos a la realidad.

Ante esto, se propone la utilización de programas de optimización de estructuras proteicas más precisos que DeepView y capaces de probar diferentes rotámeros (conformaciones) de los residuos. Con ellos, se podría comprobar si cabe la posibilidad de que las dos Cys interaccionen mediante un puente disulfuro.

Con PHYRE2 también se predijo la estructura de la proteína mutada, la cual presentó la misma estructura que la proteína normal. Continuando con la hipótesis de la pérdida de un puente disulfuro, cabía esperar una estructura distinta respecto a la no mutada. Esta ausencia de modificaciones en la estructura de la P mutada puede ser debida a la incapacidad del programa para considerar y predecir los efectos estructurales de este cambio de aminoácido.

Ante este problema, se computaron las energías tanto en el modelo sin mutar como en el modelo con la mutación. La energía, tras un proceso de optimización, fue de -14.594,86 kJ/mol para la estructura sin mutar, y de -15.150,131 kJ/mol para la estructura mutada. Por su parte, el programa CUPSAT predijo el cambio de C337R en la P como un cambio desestabilizante con un valor $\Delta\Delta G$ de -2,86 kcal/mol, equivalente a -11,955 kJ/mol.

Aunque lo esperado era obtener una energía mayor para el mutante, indicativo de que esta tendría una mayor inestabilidad tras la pérdida del puente disulfuro, estos datos indican que el modelo con la mutación cuenta con una energía menor que la del modelo sin mutar. No obstante, este parámetro no es del todo fiable en términos de estabilidad. Un cambio como el que se describe en este estudio supone un incremento muy severo de la entropía (ΔS), la cual, no es tenida en cuenta por DeepView a la hora de calcular las energías (las trata únicamente como entalpías (ΔH)). Por ello, se hubiera podido observar dicho cambio energético si tuviéramos la posibilidad de calcular la energía libre de Gibbs (ΔG) total ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). El cálculo de la ΔS es un proceso de elevada complejidad, de ahí que todavía se esté trabajando para incluirlo en los programas de modelización de proteínas.

El programa CUPSAT sí considera el cambio de entropía en los cálculos. Este programa predijo el cambio de Cys a Arg como un cambio desestabilizante con un valor $\Delta\Delta G$ de -2,86 kcal/mol (-11,955 kJ/mol). Este hecho sí concuerda con la inestabilidad esperada en la forma mutante debida a un incremento de la entropía consecuencia de la pérdida del posible puente disulfuro.

Debido a que los diversos modelos y aproximaciones, tanto estructurales como de energía, no apoyan totalmente el posible efecto de la mutación C337R sobre la formación de puentes disulfuro en la P, se realizó un estudio enfocado en el potencial eléctrico de la proteína. Para ello, se trabajó tanto sobre el modelo de la proteína sin mutar como sobre la proteína mutada.

Se obtuvieron los resultados reflejados en la figura 8.

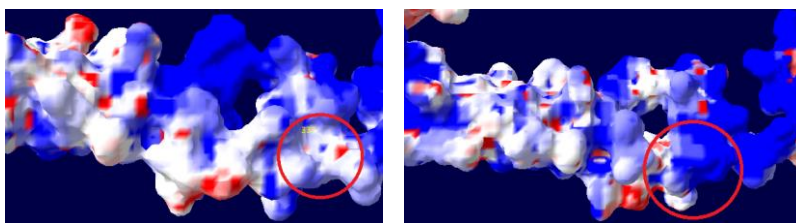


Figura 8. Representación gráfica de los valores de potencial electrostático en la región de interés (circunferencia roja), en la proteína sin mutar (izquierda) y en la proteína mutada (derecha). El potencial se calculó en DeepView mediante la fórmula de Poisson – Boltzmann y teniendo en cuenta todas las cargas atómicas. La constante dieléctrica considerada fue de 80 para el solvente y de 4 para la proteína. El color blanco representa regiones con un potencial electrostático muy cercano a la neutralidad. Los colores rojo y azul representan un potencial estadístico de -3 y +3 kT/e, respectivamente. El cambio de aminoácido supone un cambio en el potencial de esta región, desde la neutralidad hasta un valor próximo a +3 kT/e.

La proteína sin la mutación mostró, en la región ocupada por la Cys337, un potencial electrostático a la neutralidad. La proteína mutada, por su parte, mostró un potencial cercano a +3 kT/e.

Tras el cambio de potencial electrostático observado en la modelización, se baraja una nueva explicación para los bajos niveles de actividad de la vía alternativa causados por esta mutación. La P mutada podría pasar a interactuar con proteínas del plasma cargadas negativamente. Una de esas proteínas puede ser la albúmina (Levitt y Levitt, 2016), una de las más abundantes en sangre. Esta interacción daría lugar a los mismos resultados obtenidos en el estudio bioquímico de este paciente. La formación de un complejo con la albúmina o con otra proteína supondría la inactivación de la P, explicando así la actividad disminuida en el ensayo hemolítico AP50. Además, el epítipo reconocido por los anticuerpos se podría encontrar oculto en la interacción, explicando así la no detección de la P tanto en el ELISA como en el *western*. La confirmación de esta hipótesis implicaría la realización de un *western blot* en condiciones reductoras (presencia de β – mercaptoetanol) que ayudaran a desensamblar el complejo.

Junto a esta posibilidad explicada previamente, también puede ocurrir que este cambio en el potencial de la proteína disminuya su estabilidad. En este supuesto, la P sería degradada por el proteasoma antes de ser secretada. Finalmente, este cambio de potencial también podría afectar al proceso de secreción de la proteína sin necesidad de haber afectado en gran medida a su estructura. En esta situación, la P quedaría acumulada en el medio intracelular.

Conclusiones

1. El cuadro clínico del paciente apunta a una deficiencia del complemento. Esto, junto con el patrón de herencia observado, que sugiere una deficiencia ligada al X, apoya la hipótesis de que el gen afectado sea *CFP*.
2. Los niveles de C3, C4, IgG, IgA e IgM, y FB, entran dentro de los rangos esperados, lo que permite descartar una deficiencia en cualquiera de estos componentes.
3. En el ensayo ELISA la P fue indetectable, lo que también apoya que el diagnóstico se enfoque hacia esta proteína.
4. La actividad de la vía clásica (CH50) se conserva a niveles normales, por lo que se concluye que la deficiencia no afecta a ninguno de los componentes de esta ruta.
5. El valor ligeramente disminuido, pero no nulo, del ensayo AP50 es compatible con una deficiencia de P, dado que la ausencia de esta proteína supone una menor activación de esta vía, pero no su inactivación total al tratarse de un regulador positivo.
6. La P fue también indetectable en el *western blot*. Este resultado, junto con la no detección de la P en el ELISA, es indicativo de que la deficiencia es de tipo I.
7. El paciente presenta una transición T > C en el exón 8 que supone un cambio de Cys a Arg en la posición p.337. Este hecho sugiere que la Cys en p.337 juega un papel importante en la estructura activa de la proteína.
8. Los análisis estructurales de la proteína sugieren que el cambio Cys > Arg afectaría a la estructura y funcionalidad de la P al verse alterado un puente disulfuro o bien, el potencial electrostático de la proteína.

Existen varias posibilidades de continuación y complementación de este estudio: se propone la caracterización genotípica del resto de miembros de la familia para poder identificar la presencia del alelo defectuoso en ellos y llevar a cabo tanto el Consejo Genético como el control de infección por vacunación.

Para determinar si existen otras alteraciones genéticas responsables de la deficiencia, sería recomendable secuenciar el gen entero, incluyendo el promotor, secuencias “*untranslated region*” (UTR) 3’ y 5’ y los intrones.

Respecto a posibles alteraciones en el proceso de transcripción, se podría llevar a cabo una cuantificación de ARN por RT – PCR.

Puesto que cabe la posibilidad de que la P sí esté en sangre, pero, debido a la mutación, se encuentre unida a otra proteína (formando un complejo en el que es inactiva), sería

recomendable llevar a cabo un *western blot* sobre el suero del paciente y en condiciones reductoras (en presencia de β – mercaptoetanol).

Se proponen ensayos de detección de la P en lisados del paciente para comprobar si esta proteína está siendo correctamente sintetizada pero no secretada.

Para el análisis computacional, sería recomendable el uso de programas de predicción de estructura a partir de secuencia más precisos a la hora de mostrar un plegamiento anterior y posterior a la incorporación de una o más mutaciones.

Además, se propone el uso de programas diferentes a DeepView que permitan analizar con mayor detalle la posible formación del puente disulfuro entre la Cys337 y la Cys376, tal y como establece UniProt.

Para terminar, el uso de un programa capaz de tener en cuenta la ΔS tras un cambio conformacional para el cálculo de la energía permitiría tener una idea más precisa y realista del efecto de la mutación.

La relevancia de este caso clínico es muy elevada, pues amplía la escasa información existente acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares de este tipo de deficiencias. La localización del defecto genético permitirá llevar a cabo un estudio familiar para un posterior Consejo Genético adecuado a los miembros de la familia que puedan estar afectados. Sobre estos, además, se pueden llevar a cabo medidas preventivas como la protección por vacunación.

CAPÍTULO 4: Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2015).** *Inmunología Celular y Molecular*. Octava edición. Elsevier España, S.L.U. (Barcelona, 2015). Págs. 70, 71, 272 - 279, 285 y 286.
- Barnum, S. R. and Schein, T. N. (2017).** *The complement factsbook*, 2nd edition. Academic Press (Londres, 2017). Chapter 27 (“Properdin”).
- Bathum, L., Hansen, H., Teisner, B. et al. (2006).** Association between combined properdin and mannose-binding lectin deficiency and infection with *Neisseria meningitidis*. *Molecular Immunology*. 43(5):473-9. DOI: [10.1016/j.molimm.2005.02.017](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.02.017)
- Bhattacharyya, R., Pal, D. and Chakrabarti, P. (2004).** Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(11), 795-808. DOI: [10.1093/protein/gzh093](https://doi.org/10.1093/protein/gzh093)
- Bogaert, D. J., Dullaers, M., Lambrecht, B. N. et al. (2016).** Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all?. *Journal of medical genetics*, 53(9), 575-590. DOI: [10.1136/jmedgenet-2015-103690](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103690)
- Braconier, J. H., Sjöholm, A. G. and Söderström, C. (1983).** Fulminant meningococcal infections in a family with inherited deficiency of properdin. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 15(4), 339-345. PMID: [6658381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6658381/)
- Chen, J. Y., Cortes, C. and Ferreira, V. P. (2018).** Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Molecular Immunology*. 102:58-72. DOI: [10.1016/j.molimm.2018.05.018](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.018)
- Christou E., Giardino, G., Worth, A. et al. (2017).** Risk factors predisposing to the development of hypogammaglobulinemia and infections post-Rituximab. *International Reviews of Immunology*. 36(6):352-359. DOI: [10.1080/08830185.2017.1346092](https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1346092)
- Conley, M. E. (2009).** Genetics of hypogammaglobulinemia: what do we really know? *Current opinion in immunology*, 21(5), 466-471. DOI: [10.1016/j.coi.2009.07.003](https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.07.003)
- Corvillo, F., Bravo, M., Nozal, P. et al. (2016).** Serum properdin consumption as a biomarker of C5 convertase dysregulation in C3 glomerulopathy. *Clinical and Experimental Immunology*. 184(1):118-25. DOI: [10.1111/cei.12754](https://doi.org/10.1111/cei.12754)
- Dehoorne, J., Haerynck, F., Raes, A. et al. (2008).** Complement factor B deficiency associated with recurrent aseptic meningitis. *Pediatric Rheumatology*. 6(Suppl 1). DOI: [10.1186/1546-0096-6-S1-P266](https://doi.org/10.1186/1546-0096-6-S1-P266)
- Federici, A. B. (2016).** Current and emerging approaches for assessing von Willebrand disease in 2016. *International journal of laboratory hematology*, 38, 41-49. DOI: [10.1111/ijlh.12540](https://doi.org/10.1111/ijlh.12540)
- Fijen, C. A., van den Bogaard, R., Schipper, M. et al. (1999).** Properdin deficiency: molecular basis and disease association. *Molecular Immunology*. 36(13-14):863-7. PMID: [10698340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10698340/)

- Garred, P., Genster, N., Pilely, K. et al. (2016).** A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunological reviews*, 274(1), 74-97. DOI: [10.1111/imr.12468](https://doi.org/10.1111/imr.12468)
- Genel, F., Atlihan, F., Gulez, N. et al. (2006).** Properdin deficiency in a boy with fulminant meningococcal septic shock. *Acta Paediatrica*. 95(11):1498-1500. DOI: [10.1080/08035250600603008](https://doi.org/10.1080/08035250600603008)
- Grice, G. and Nathan, J. (2016).** The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 73(18):3497-506. DOI: [10.1007/s00018-016-2255-5](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2255-5)
- Hainaut, J. L., Rundensteiner, E. A., Kirchberg, M. et al. (2007).** *Advances in Conceptual Modeling - Foundations and Applications*. Springer (Berlín, 2007). Pág. 18.
- Hartmann, S. and Hofsteenge, J. (2000).** Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated. *Journal of Biological Chemistry*. 275(37):28569-74. DOI: [10.1074/jbc.M001732200](https://doi.org/10.1074/jbc.M001732200)
- Hoffman, T., van Kessel, D., van Velzen-Blad, H. et al. (2015).** Antibody replacement therapy in primary antibody deficiencies and iatrogenic hypogammaglobulinemia. *Expert Review of Clinical Immunology*. 11(8):921-33. DOI: [10.1586/1744666X.2015.1049599](https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1049599)
- Jaatinen, T., Lahti, M., Ruuskanen, O. et al. (2003).** Total C4B Deficiency Due to Gene Deletion and Gene Conversion in a Patient with Severe Infections. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10(2): 195–201. DOI: [10.1128/CDLI.10.2.195-201.2003](https://doi.org/10.1128/CDLI.10.2.195-201.2003)
- Kelly, A., Houston, S. A., Sherwood, E. et al. (2017).** Regulation of innate and adaptive immunity by TGF β . In *Advances in immunology* (Vol. 134, pp. 137-233). Academic Press. DOI: [10.1016/bs.ai.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.01.001)
- Kida, M., Fujioka, H., Kosaka, Y. et al. (2008).** The first confirmed case with C3 deficiency caused by compound heterozygous mutations in the C3 gene; a new aspect of pathogenesis for C3 deficiency. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 40(3):410-413. DOI: [10.1007/978-1-4614-9209-2_2-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9209-2_2-1)
- Levitt, D. G. and Levitt, M. D. (2016).** Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *International Journal of General Medicine*. 9: 229–255. DOI: [10.2147/IJGM.S102819](https://doi.org/10.2147/IJGM.S102819)
- Mathern, D. R., & Heeger, P. S. (2015).** Molecules great and small: the complement system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(9), 1636-1650. DOI: [10.2215/CJN.06230614](https://doi.org/10.2215/CJN.06230614)
- Michels, M. A., Volokhina, E. B., van de Kar, N. C. et al. (2018).** The role of properdin in complement-mediated renal diseases: a new player in complement-inhibiting therapy?. *Pediatric Nephrology*, 1-19. DOI: [10.1007/s00467-018-4042-z](https://doi.org/10.1007/s00467-018-4042-z)

Mizuno, M., Suzuki, Y. and Ito, Y. (2018). Complement regulation and kidney diseases: recent knowledge of the double-edged roles of complement activation in nephrology. *Clinical and experimental nephrology*, 22(1), 3-14. DOI: [10.1007/s10157-017-1405-x](https://doi.org/10.1007/s10157-017-1405-x)

Nielsen, H. E., Koch, C., Mansa, B. et al. (1990). Complement and immunoglobulin studies in 15 cases of chronic meningococemia: properdin deficiency and hypoinmunoglobulinemia. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 22(1), 31-36. PMID: [2320962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2320962/)

Noris, M. and Remuzzi, G. (2013). Overview of Complement Activation and Regulation. *Seminars in Nephrology*. 33(6):479-92. DOI: [10.1016/j.semnephrol.2013.08.001](https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.08.001)

Okura, Y., Kobayashi, I., Yamada, M. et al. (2016). Clinical characteristics and genotype-phenotype correlations in C3 deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 137(2):640-644.e1. DOI: [10.1016/j.jaci.2015.08.017](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.017)

Omori, Y., Mesnil, M. and Yamasaki, H. (1996). Connexin 32 Mutations from X-linked Charcot-Marie Tooth Disease Patients: Functional Defects and Dominant Negative Effects. *Molecular Biology of the Cell*. 7(6):907-16. PMID: [8816997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8816997/)

Osthoff, M., Walder, B., Delhumeau, C. et al. (2017). Association of lectin pathway protein levels and genetic variants early after injury with outcomes after severe traumatic brain injury: a prospective cohort study. *Journal of neurotrauma*, 34(17), 2560-2566. DOI: [10.1089/neu.2016.4941](https://doi.org/10.1089/neu.2016.4941)

Palacios, T., Bartelt, L., Scheld, W. et al. (2015). Fatal Coxsackie meningoencephalitis in a patient with B-cell lymphopenia and hypogammaglobulinemia following rituximab therapy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 115(2):148-50. DOI: [10.1016/j.anai.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.anai.2015.05.007)

Pedersen, D. V., Roumenina, L., Jensen, R. K. et al. (2017). Functional and structural insight into properdin control of complement alternative pathway amplification. *The EMBO journal*, 36(8), 1084-1099. DOI: [10.15252/embj.201696173](https://doi.org/10.15252/embj.201696173)

Pelka, K. and De Nardo, D. (2018). Emerging Concepts in Innate Immunity. In *Innate Immune Activation* (pp. 1-18). Humana Press, New York, NY. DOI: [10.1007/978-1-4939-7519-8_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7519-8_1)

Postelnicu, R. and Evans, L. (2017). Monitoring of the physical exam in sepsis. *Current opinion in critical care*, 23(3), 232-236. DOI: [10.1097/MCC.0000000000000403](https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000403)

Putz, K., Hayani, K. and Zar, F. A. (2013). Meningitis. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 40(3), 707-726. DOI: [10.1016/j.pop.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.06.001)

Ram, S., Lewis, L. A. and Rice, P. A. (2010). Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(4):740-80. DOI: [10.1128/CMR.00048-09](https://doi.org/10.1128/CMR.00048-09)

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. et al. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*. 11(9):785-97. DOI: [10.1038/ni.1923](https://doi.org/10.1038/ni.1923)

Rowe, P., McLean, R., Wood, R. et al. (1989). Association of Homozygous C4B Deficiency with Bacteria. *Journal of infectious diseases*. 160(3):448-51. PMID: [2788199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2788199/)

- Saliterman, S. S. (2006).** Fundamentals of BioMEMS and medical microdevices. 1st edition. SPIE Press (Bellingham, Washington, 2006). Pág. 257.
- Schlesinger, M., Mashal, U., Levy, J. et al. (1993).** Hereditary properdin deficiency in three families of Tunisian Jews. *Acta Paediatrica*, 82(9), 744-747. PMID: [8241670](#)
- Schmidt, B. and Hogg, P. J. (2007).** Search for allosteric disulfide bonds in NMR structures. *BMC structural biology*, 7(1), 49. DOI: [10.1186/1472-6807-7-49](#)
- Schneider, M. C., Exley, R. M., Ram, S. et al. (2007).** Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends in Microbiology*. 15(5):233-40. DOI: [10.1016/j.tim.2007.03.005](#)
- Schneppenheim, R., Brassard, J., Krey, S. et al. (1996).** Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys → Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. 93(8):3581-6. PMID: [8622978](#)
- Sjöholm, A. G., Kuijper, E. J., Tijssen, C. C. et al. (1988).** Dysfunctional properdin in a Dutch family with meningococcal disease. *New England Journal of Medicine*, 319(1), 33-37. DOI: [10.1056/NEJM198807073190106](#)
- Skattum, L., van Deuren, M., van der Poll, T. et al. (2011).** Complement deficiency states and associated infections. *Molecular Immunology*. 48(14):1643-55. DOI: [10.1016/j.molimm.2011.05.001](#)
- Slade, C., Bosco, J., Unglik, G. et al. (2013).** Deficiency in complement factor B. *New England Journal of Medicine*. 369(17):1667-9. DOI: [10.1056/NEJMc1306326](#)
- Sun, Z., Reid, K. B. and Perkins, S. J. (2004).** The Dimeric and Trimeric Solution Structures of the Multidomain Complement Protein Properdin by X-Ray Scattering, Analytical Ultracentrifugation and Constrained Modelling. *Journal of Molecular Biology*. 343(5):1327-43. DOI: [10.1016/j.jmb.2004.09.001](#)
- Vaillant, A. A. J. and Qurie, A.** Actualizado el 3 de junio, 2019. Immunodeficiency. Disponible en Internet, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500027/>. Consultado el 6 de junio de 2019.

Anexo A

Tabla A1. Datos relativos a los anticuerpos utilizados en los ensayos ELISA para el FB y la P, y los anticuerpos empleados en el *western blot*.

ELISA factor B						
Anticuerpo	Origen	Dirigido contra	Conjugado con	Cantidad/Dilución	Proporcionado por	Código fabricante
Policlonal	Cabra	FB	-	1 µg/pocillo	Calbiochem	#341272
Monoclonal	Ratón	Bb	-	1:1000	Quidel	A227
Policlonal	Cabra	Ratón	HRP	1:1000	Jackson Immunoresearch	-
ELISA properdina						
Monoclonal	Ratón	Properdina	-	100 ng/pocillo	Quidel	A235
Policlonal	Cabra	Properdina	-	1:1000	Nordic Immunology	GAHu/PDD
Policlonal	Conejo	Cabra	HRP	1:5000	Dako	P0449
Western blot						
Policlonal	Cabra	Properdina	-	1:500	Nordic Immunology	GAHu/PDD
Monoclonal	Ratón	Properdina	-	1:500	Quidel	A235
Policlonal	Conejo	Cabra	Biotina	1:10000	Jackson Immunoresearch	305 – 065 – 045
Policlonal	Cabra	Ratón	Biotina	1:5000	Jackson Immunoresearch	115 – 065 – 068
Estreptavidina	-	Biotina	Fosfatasa alcalina	1:1000	Sigma	-