

Adenosin deaminasa en el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa.

Mary Carmen Pérez-Aguilar^{1}, Loredana Goncalves¹ y Rafael Bonfante-Cabarcas².*

¹Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

²Unidad de Bioquímica, Decanato de Ciencias de la Salud “Dr. Pablo Acosta Ortiz”. Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela.

Palabras clave: adenosina, adenosin deaminasa, sistema inmune, inmunodeficiencia combinada severa.

Resumen. La Adenosin deaminasa es una enzima del metabolismo de las purinas cuya función es transformar la adenosina en inosina y la desoxiadenosina en desoxiinosina. La unión de ecto-ADA1 a la superficie celular a través de CD26 contribuye a la regulación de citocinas y estimula la proliferación de células T mediante la activación de CD45. La deficiencia de esta enzima genera el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa, caracterizado por la acumulación de metabolitos de adenina y desoxiadenosina, los cuales tienen efectos tóxicos sobre los linfocitos, afectando así la síntesis de ADN y en consecuencia la expansión clonal. Un diagnóstico temprano de esta inmunodeficiencia es esencial ya que reduce notablemente la morbilidad y mortalidad asociada con infecciones recurrentes. Los avances recientes en biología molecular y genética han conducido a la identificación de los defectos genéticos de muchas de las inmunodeficiencias primarias y al desarrollo de herramientas de diagnóstico y tratamiento prometedoras.

Adenosine deaminase in severe combined immunodeficiency syndrome.

Invest Clin 2012; 53(3): 315 - 324

Key words: adenosine, adenosine deaminase, immune system, severe combined immunodeficiency.

Abstract. Adenosine deaminase is an enzyme of the purine metabolism whose function is to convert adenosine to inosine and deoxyadenosine to deoxyinosine. The ecto-ADA1 binding to the cell surface through CD26 contributes to the regulation of cytokines and stimulates the proliferation of T cells by activating CD45. The deficiency of this enzyme generates the severe combined immunodeficiency syndrome, characterized by the accumulation of deoxyadenosine and adenine metabolites, which have toxic effects on lymphocytes, affecting DNA synthesis and consequently, clonal expansion. Early diagnosis of this immunodeficiency is essential, as it significantly reduces morbidity and mortality associated with recurrent infections. Recent advances in molecular biology and genetics have led to the identification of genetic defects of many primary immunodeficiencies and the development of promising diagnostic tools and treatment.

Recibido: 27-02-2012. Aceptado: 19-07-2012

INTRODUCCIÓN

La adenosina (Ado) es un precursor metabólico de los ácidos nucleicos que ejerce diversos efectos fisiológicos mediante su unión a receptores de adenosina (purinoreceptores), de los cuales hay cuatro subtipos identificados: A1, A2A, A2B y A3 (1-3). En condiciones de daño tisular, las concentraciones endógenas de dicho nucleósido se elevan rápidamente y la estimulación de la proteína G acoplada a purinoreceptores induce diversos efectos cardiovasculares tales como vasodilatación, inhibición de la inflamación, modulación de la actividad del sistema nervioso simpático y protección contra las consecuencias deletéreas de la isquemia-reperfusión (4-6).

Los niveles de adenosina están regulados por la actividad de la adenosin deaminasa (ADA), la cual es una enzima del catabolismo de la purinas que cataliza la desami-

nación de Ado y deoxiadenosina (dAdo) para producir inosina y deoxiinosina respectivamente, liberándose amonio en el proceso (3). La enzima está ampliamente distribuida en el organismo, encontrándose actividad ADA en prácticamente todos los tejidos; sin embargo, su mayor actividad se encuentra en células linfoides, siendo más elevada en las células T que en las células B (7).

La ADA es un barril α/β de ocho hebras, con el sitio activo en un bolsillo en el extremo C-terminal del barril, como en todas las enzimas con estructura de barril α/β conocidas. Un ión zinc esencial desde el punto de vista de la catálisis está unido en la parte más profunda del bolsillo del sitio activo (2). La enzima se localiza tanto en citoplasma donde mantiene su actividad hidrolasa, como en la superficie de diversas células; por lo que es considerada una ecto-enzima (8) y mantiene su función in-

cluso después de unirse a la glicoproteína CD26, catalizando la desaminación de la adenosina extracelular cuando se encuentra en elevados niveles que son tóxicos para los linfocitos (9, 10). Por lo tanto, el control de las concentraciones extracelulares de adenosina, ejercida por la interacción ADA-CD26 puede ser cuantitativamente importante en caso de descenso de la regulación, inactivación de los transportadores de nucleósidos o bajo estrés metabólico, además de proveer un importante mecanismo de balance en condiciones de un elevado recambio en el metabolismo del nucleótido adenina.

La ADA es un marcador de inmunidad celular; puesto que su actividad plasmática y sérica se eleva en enfermedades que alteran la respuesta inmune mediada por células (11, 12). El aumento de la actividad sérica de ADA ha sido observado en los trastornos hipertensivos del embarazo (13), el infarto agudo al miocardio (14) y en diversas enfermedades infecciosas causadas principalmente por microorganismos con tropismo por los macrófagos (15, 16). Adicionalmente, diversos estudios señalan que la actividad ADA en plasma de pacientes con hipoxia crónica es superior en comparación con los pacientes sanos (10), lo que indica que la inducción de la actividad ADA es una adaptación metabólica natural a los elevados niveles de adenosina durante la hipoxia.

La actividad ADA puede cuantificarse mediante el método descrito por Galanti y Giusti (17), el cual se basa en una modificación de la reacción de Berthelot, en la que el amoníaco liberado reacciona con hipoclorito de sodio y fenol en medio alcalino para formar el indofenol, un compuesto de color azul cuya densidad óptica se lee a 628 nm. Como catalizador de la reacción se utiliza el nitroprusiato de sodio y la reacción que cataliza la ADA se detiene tras un período de incubación por la adición de fenol-nitroprusiato. Otro método ampliamente utiliza-

do es el propuesto por Blake y Berman (18), basado en la reacción del amoníaco con el α -cetoglutarato y NADPH para generar glutamato y NADP. Esta reacción es catalizada por la glutamato deshidrogenasa, midiéndose la variación de absorción a 340 nm debida a la desaparición de NADPH.

ISOFORMAS DE ADA

Existen dos isoformas de ADA: ADA1 y ADA2. ADA1, es una proteína monomérica de 40 kDa que está presente en citoplasma y en la superficie celular (ecto-enzima). Su actividad es totalmente inhibida a 100 mM de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA), la K_m (Constante de Michaelis-Menten) de ADA1 es de $5,2 \times 10^{-5}$ M, posee una actividad óptima a pH entre 7-7,5 y una afinidad similar por la adenosina y la desoxiadenosina (19). Su función principal es eliminar los derivados intracelulares tóxicos de la adenosina y la desoxiadenosina así como proteger las células de la apoptosis.

La ecto-ADA1 anclada a la superficie de células dendríticas mediante su unión a receptores de adenosina interactúa con la dipeptidil peptidasa IV/CD26 expresada en las células T, potenciando su activación y proliferación mediante la activación de la tirosin-fosfatasa CD45 e incrementando la producción de los niveles de IFN- γ , IL-6 y TNF- α , sin causar efecto alguno en la producción de citocinas del tipo Th2 (11). Estas evidencias muestran que el complejo ADA-CD26 forma parte de la sinapsis inmunológica y tiene una función coestimuladora en la activación de células T. Dado que la ecto-ADA1 protege a las células activadas de los efectos citotóxicos de la adenosina extracelular, es posible que este control constituya parte del mecanismo inmunoregulador de la adenosina, mediado a través de receptores purinérgicos en leucocitos.

Los niveles tisulares de ADA1 varían, con una alta actividad en el tejido linfóide,

células epiteliales del duodeno, cerebro y placenta en comparación con la baja actividad presente en los eritrocitos y el timo. La expresión de ADA en los timocitos de la corteza tímica es más alta que en los timocitos de la región medular y que en las células T maduras (20). En la placenta ADA modula la implantación y la duración del embarazo y bajos niveles de esta enzima al comienzo de la gestación, pueden provocar la acumulación de productos tóxicos que generen la pérdida gestacional (21).

En contraste con ADA1, ADA2 es un monómero de 100 kDa y es resistente a la inhibición por EHNA. Es la isoforma predominante en suero, posee un Km de 200×10^{-5} M, una actividad óptima a pH 6,5 y una débil afinidad por la desoxiadenosina (19). Estas características hacen que ADA2 sea ineficiente en desaminar a la desoxiadenosina cuando el pH es mayor al óptimo y la concentración de sustrato es demasiado baja.

ADA2 es secretada por células presentadoras de antígeno, induce la diferenciación de monocitos a macrófagos y estimula la proliferación de macrófagos y células T CD4+ (22). Esta isoforma se une a diferentes tipos celulares a través de proteoglicanos y a las células T a través de un receptor desconocido (23). Dado que ADA2 puede modular la afinidad de los receptores de adenosina es posible que su unión a las células T sea mediada por receptores de adenosina o por un complejo proteoglicano-receptor de adenosina (24).

SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA POR DÉFICIT DE ADA (SCID-ADA)

Las purinas cumplen funciones esenciales en la replicación del material genético, transcripción génica, síntesis de proteínas y metabolismo celular. En condiciones normales la concentración total de nucleó-

tidos se encuentra fijada en límites muy estrechos en función de una fina regulación de las rutas biosintéticas de nucleótidos y del balance entre las rutas “de novo” y “de recuperación” con una adecuada compensación con las vías de degradación de nucleótidos, seguido de mecanismos de desintoxicación de los metabolitos formados como pueden ser: la adenina y en especial la adenosina. Los trastornos que implican anomalías en el metabolismo de los nucleótidos comprenden desde enfermedades relativamente frecuentes, hasta deficiencias enzimáticas poco comunes; como el caso de la Inmunodeficiencia Combinada Severa.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID), también conocido como síndrome del “niño burbuja” se debe a un trastorno autosómico recesivo que origina una disfunción intensa en las células T y B (25). Los procesos afectados incluyen alteraciones en la señalización de los receptores de citocinas o moléculas adaptadoras y de señalización intracelular, la señalización por el receptor de células T, la recombinación de genes del receptor de células T y las inmunoglobulinas, así como las vías del metabolismo de los nucleótidos.

Los niños que padecen la enfermedad tienen un sistema inmunológico deficiente, por lo que contraen enfermedades recurrentes desde el momento de su nacimiento, suelen desarrollar diarreas prolongadas provocadas por rotavirus o por infecciones bacterianas del tracto intestinal y neumonía (25). Poseen muy pocos linfocitos sanguíneos, el timo presenta aspecto fetal y carece de diferenciación córtico-medular y de corpúsculos de Hassall (26).

La mortalidad por este síndrome, es del 100% durante los primeros 2 años de vida de no intervenir al paciente, por lo que esta condición se considera una emergencia pediátrica. El patrón de herencia de este trastorno puede ser ligado al cromoso-

ma X o autosómico recesivo, dependiendo del gen involucrado (27).

Los defectos genéticos en el SCID relacionados con las vías de señalización intracelular esenciales para la activación de las células T, incluyen aquellos que afectan a la cadena γ del CD3 (CD3 γ), la CD3 ϵ , las moléculas del MHC clase I o clase II, la cadena ζ asociada a la cinasa de 70kDa (ZAP70), la cinasa específica de linfocitos (Lck) y el CD8 α (25).

Otra causa importante del SCID es la deficiencia de ADA (SCID-ADA), provocada por mutaciones en el gen del cromosoma 20 que codifica la enzima y al que se le atribuye el 10% de los casos de la enfermedad (26). En ausencia de ADA la transformación

de dAdo es más limitada, razón por la cual se observa una acumulación de dAdo en orina y plasma. Dicha elevación afecta la respuesta inmune de los pacientes debido al incremento anormal de desoxiadenosín trifosfato (dATP) y la inactivación irreversible de S-adenosil homocisteína hidrolasa (SAHH). El exceso en la concentración de dATP inhibe la ribonucleótido reductasa (RR), produce un desequilibrio en los niveles de dNTPs y propicia rupturas en el ADN de las células B (28, Fig. 1). La RR cataliza la reducción de los ribonucleótidos ADP, GDP, CDP y UDP a su correspondiente dNTP, con la finalidad de mantener las reservas necesarias para soportar la replicación del ADN. Por lo tanto, el desequilibrio

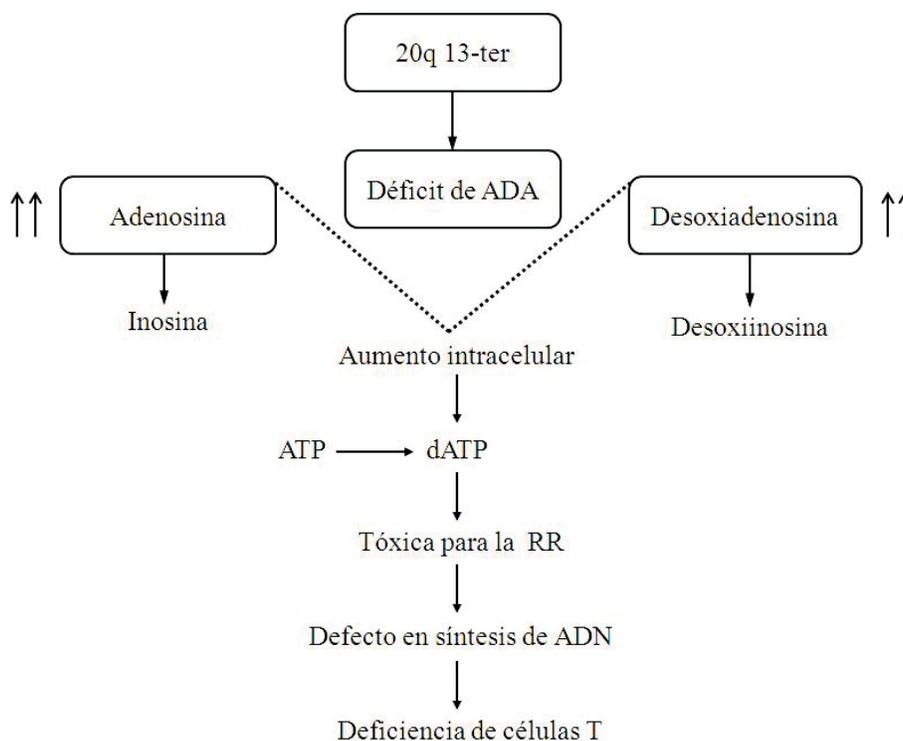


Fig 1. Patogénesis de la deficiencia de ADA. La inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosin deaminasa (SCID-ADA) es provocada por mutaciones en el gen del cromosoma 20 (20q 13-ter) que codifica la ADA. Al no producirse esta enzima se interrumpe la cadena metabólica de la degradación de adenosina a inosina y desoxiadenosina a desoxiinosina, produciéndose un aumento intracelular de adenosina y desoxiadenosina, las cuales son convertidas en adenosin trifosfato (ATP) y desoxiadenosin trifosfato (dATP). Esta última es tóxica para la ribonucleótido reductasa (RR), enzima imprescindible para la síntesis de ADN, lo que es nocivo para los linfocitos.

en los niveles de dNTPs inhibe la síntesis y reparación del ADN en las células T (29).

Las células B presentes en los órganos linfoides periféricos experimentan maduración dependiente de antígeno, el dATP acumulado en esta estirpe celular produce rupturas en el ADN, provocando la expresión de la poli-ADP ribosa polimerasa (P-ADP RP) y disminución del NAD, lo que da lugar a la apoptosis (30, 31). Esto sugiere que ADA cumple una función importante en la supervivencia de las células B durante el proceso de maduración.

Adicionalmente, la dAdo acumulada interfiere con la actividad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), limitando así la diversidad de los receptores antígeno-específico de células T y se une de forma irreversible a la enzima SAHH inhibiendo su actividad catalítica (32). La SAHH es una enzima que cataliza la reacción reversible: adenosil homocisteína (AdoHcy) \rightarrow adenosina + L-homocisteína, con lo que la inhibición de SAHH resulta en la acumulación de AdoHcy, un potente inhibidor de la Metil transferasa (MT), enzima que realiza las transmetilaciones de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (33). La inhibición de MT disminuye la transcripción de los genes que codifican las cadenas α y β del receptor de células T (TCR), la cual ocurre de manera normal en la diferenciación de los timocitos (30).

La Ado puede iniciar la señalización celular mediante su unión a receptores de adenosina acoplados a proteína G presentes en la superficie de las células blanco (33). Estudios llevados a cabo en el modelo murino indican que en las células T CD4+ y CD8+ maduras, disminuye la activación del TCR, producto del incremento de la Ado exógena (34). Otras investigaciones en las que se utilizaron inhibidores de ADA o agonistas y antagonistas selectivos de receptores de adenosina A2A, mostraron que el incremento en los niveles intracelulares de

cAMP interfiere con los eventos de señalización proximal luego de la activación del TCR conduciendo a la inhibición de las funciones efectoras (35).

Cassani y col. (36), observaron que en las células T CD4+ de pacientes con SCID-ADA, hay muy baja proliferación y producción de citocinas mediadas por TCR/CD28, lo cual es asociado con la reducida fosforilación de ZAP-70, disminución del flujo de calcio, de la señalización de ERK1/2 y eventos transcripcionales defectuosos de CREB y NFK- β . La exposición a dAdo produjo una fuerte inhibición de células T mediada por la aberrante señalización del receptor de adenosina A2A y una mayor activación de PKA o un efecto apoptótico elevado. Sin embargo, en las células T aisladas de pacientes con SCID-ADA sometidos a terapia génica con células madre hematopoyéticas, se observaron adecuados eventos bioquímicos desencadenados luego de la activación del TCR, dando así lugar a una restauración de las funciones efectoras y una normal sensibilidad a la apoptosis.

TRATAMIENTO DEL SCID-ADA

Durante mucho tiempo, la terapéutica para el SCID-ADA consistió en extraer linfocitos del paciente, insertarles el gen ADA vía retrovirus y devolverlos al torrente circulatorio (37). Con esta estrategia se apreció inicialmente una restitución de la respuesta inmunitaria en varios niños, aunque también se produjeron importantes efectos adversos por mutagénesis insercional (mutación causada por la inserción de ADN exógeno dentro del genoma). Este riesgo se ve actualmente disminuido debido al uso de lentivirus con capacidad de autoinactivación, como vectores del gen terapéutico (38). Básicamente, se hace la transferencia *ex-vivo* del gen terapéutico a células madre hematopoyéticas autólogas, mediante vectores virales que no se replican. Si bien el

tratamiento de elección actual para el SCID-ADA es el trasplante de células madre hematopoyéticas de un donante HLA idéntico, los trasplantes alogénicos de donantes no relacionados continúan asociándose con alta morbimortalidad (39).

Recientemente, la terapia de reemplazo enzimático (TRE) utiliza PEG-ADA, compuesto al que se unen de manera covalente numerosas cadenas de mono-metoxipolietilenglicol (PEG) a ADA bovina, mediante residuos de lisina (40, 41). Las moléculas de PEG-ADA están protegidas del ataque proteolítico, aclaramiento renal, unión de anticuerpos, presentación de antígenos y reducción en la inmunogenicidad de la proteína; lo que permite aumentar el tiempo de vida en el torrente sanguíneo y con ello disminuye la frecuencia de la administración (42).

La PEG-ADA es suministrada por inyección intramuscular una o dos veces por semana, su farmacocinética es variable en el mismo paciente y el monitoreo de la actividad plasmática de ADA permite determinar la dosis adecuada y frecuencia de administración. Serana y col. (43), llevaron a cabo un estudio longitudinal retrospectivo en el cual compararon la recuperación inmunológica en pacientes con SCID-ADA que habían sido sometidos a trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas (HSCT) con aquellos sometidos a TRE. Los investigadores observaron que para el caso de linfocitos totales los coeficientes que representan la variación media por paciente durante el transcurso de un mes fueron de 6,042 (95% IC: 0,348-11,735; $p < 0.038$) en los niños tratados con HSCT y de -7,197 (-10,227 a -4,167; $p < 0,001$) en los tratados con PEG-ADA. Es decir, la reconstitución de linfocitos periféricos fue solo parcial en los niños sometidos a ambos tratamientos. Sin embargo, la recuperación en el número de células CD19+ fue diferente en ambos grupos con un incremento signifi-

cativo de dicha población linfocitaria en pacientes sometidos al trasplante (1,716 (0,432-3,000; $p < 0,009$)) y una disminución en los pacientes tratados con PEG-ADA (-2,81 (-2,944 a -1,617; $p < 0,001$)). En el caso de los linfocitos T CD3+, los coeficientes para los niños sometidos a trasplante fueron de 4, 823 (0,546-9,101; $p = 0,027$) y -0,818 (-2,923-1,288; $p = \text{NS}$) en los niños tratados con PEG-ADA, sugiriendo que los linfocitos T CD3+ tienen una tendencia a incrementar en el tiempo en el primer grupo de pacientes mientras que permanecen sin cambios a lo largo del período de observación en los pacientes que recibieron TRE.

Diversos estudios confirman que la TRE con PEG-ADA, es eficaz en la mayoría de los pacientes con deficiencia de ADA (44,45), puesto que provoca la reducción de los niveles extracelulares de Ado y dAdo y lleva a la subsecuente normalización de los niveles intracelulares a través del mantenimiento del equilibrio entre los compartimientos intra y extracelular (45). Sin embargo, falla en mantener el recuento de linfocitos y la función de las células T (46, 47). Actualmente, la TRE es considerada una alternativa viable a corto plazo para el tratamiento de las enfermedades de origen genético y existe un número considerable de enfermedades para las cuales se está intentando desarrollar este tipo de terapia. La TRE ha dado un gran impulso al desarrollo de las técnicas de expresión de proteínas recombinantes y su caracterización bioquímica para su potencial uso en este tipo de terapia, con lo cual se ha abierto una ventana de esperanza para el tratamiento de enfermedades genéticas (41).

Dado que la deficiencia de ADA es poco común, tomará mucho más tiempo el establecer los beneficios a largo plazo del PEG-ADA. Sin embargo; en los diez años que se ha utilizado, la PEG-ADA ha probado ser efectiva para revocar el panorama clínico lamentable asociado con el SCID-ADA.

CONCLUSIONES

El desarrollo y la utilización de PEG-ADA han proporcionado una importante opción alternativa para el tratamiento de pacientes con deficiencia de ADA, puesto que la desintoxicación metabólica rápida que ofrece por el reemplazo de alto nivel de la enzima, permite la estabilización clínica de los pacientes. No obstante, la TRE debe superar una serie de inconvenientes, como la obtención de la molécula en cantidades suficientes, que sea estable químicamente, activa, no antigénica y con las propiedades químicas que le permitan ser dirigida a los tejidos en los cuales no existe en forma funcional. En este orden de ideas, la obtención de la proteína en cantidades clínicamente útiles, constituye uno de los principales factores limitantes en la implementación de la TRE y en definitiva es lo que aumenta desproporcionadamente los costos de este tratamiento.

Las enfermedades genéticas son muy difíciles de tratar y curar mediante una sola aproximación terapéutica y quizás en un futuro cercano tendrá que utilizarse una combinación de TRE, inhibición de síntesis de sustratos, terapia génica y trasplante de células madre hematopoyéticas para lograr resultados eficientes y estables a largo plazo. El desarrollo de la tecnología de la Ingeniería Genética junto con los avances conceptuales realizados en Genética Molecular, Biología Celular y Genética Humana, están revolucionando el campo de la terapéutica de las inmunodeficiencias primarias. La causa común de todas ellas es una alteración en el material hereditario y por tanto, la sustitución del gen defectuoso por su equivalente funcional se presenta como la vía idónea para eliminar globalmente los efectos metabólicos y alteraciones clínicas que acompañan a la mayor parte de dichas enfermedades. Continuamente se aíslan y caracterizan nuevos genes, se identifican nuevos loci, se incrementa exponencialmen-

te el número de marcadores cromosómicos, puntos de referencia básicos para el cartografiado físico y genético del genoma humano. Sin embargo, aún queda mucho camino por recorrer.

REFERENCIAS

1. **Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J.** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53:527-552.
2. **Jackobson KA, Gao ZG.** Adenosine receptors a therapeutics target. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:247-264.
3. **Eltzschig HK.** Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 2009; 111:904-915.
4. **Lane JR, Jaakola VP, Ijzerman AP.** The structure of the adenosine receptors: implications for drug discovery. *Adv Pharmacol* 2011; 61:1-40.
5. **Ohta A, Sitkovsky M.** Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down-regulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414:916-920.
6. **Linden J.** New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 2006; 116:1835-1837.
7. **Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R.** Adenosine Deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 2001; 21:105-128.
8. **Ginés S, Mariño M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut Christian, Hovanessian A, Casadó V, Lluís C, Franco R.** Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J* 2002; 361:203-209.
9. **Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW.** CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001; 54:249-264.
10. **Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P,**

- Odegard KC, Peter L, Thompson LF, Colgan SP. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* 2006; 108:1602-1610.
11. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:9583-9588.
 12. Pérez-Aguilar MC, Goncalves L, Ibarra A, Bonfante-Cabarcas R. Adenosin deaminasa como molécula coestimuladora y marcador de inmunidad celular. *Invest Clin* 2010; 51:561-571.
 13. Vilchez D, Pérez-Aguilar MC, Saba S, Bonfante-Cabarcas R. Los niveles séricos de adenosin deaminasa y ácido úrico se correlacionan en pacientes gestantes con trastornos hipertensivos. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2009; 74:217-224.
 14. Torrellas Y, Pérez-Aguilar MC, Ramos B, Franco-Useche A, Ibarra A, Rodríguez-Bonfante C, Bonfante-Cabarcas R. Increased adenosine deaminase serum activity in patients with acute myocardial infarction. *Rev Latinoam Hipertens* 2010; 5:38-42.
 15. Khambu B, Mehta KD, Rijal S, Lamsal M, Majhi S, Baral N. Serum nitrite level and adenosine deaminase activity is altered in visceral leishmaniasis. *Nepal Med Coll J* 2007; 9:40-43.
 16. Jadhav AA, Jain A. Sputum adenosine deaminase and alkaline phosphatase activity in pulmonary tuberculosis. *Arch Physiol Biochem* 2012; 118:6-9.
 17. Galanti B, Giusti G. Direct colorimetric method for the determination of adenosine deaminase and 5-AMP deaminase in the blood. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1966; 15:1316-1320.
 18. Blake J, Berman P. The use of adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculosis. *S Afr Med J* 1982; 3:19-21.
 19. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* 1996; 9:632-633.
 20. Franco R, Pacheco R, Gatell JM, Gallart T, Lluís C. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit Rev Immunol* 2007; 27:495-509.
 21. Kutlar I, Aksoy F, Koyluoglu O, Uğur MG, Balat O, Tarakcioglu M. Adenosine deaminase activity in serum and placenta of patients with anembryonic pregnancies and missed abortions. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 272:124-126.
 22. Zavialov AV, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov AV, Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2010; 88:279-290.
 23. Hershfield MS. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol* 2005; 35:25-30.
 24. Zavialov AV, Yu X, Spillmann D, Lauvau G, Zavialov AV. Structural basis for the growth factor activity of human adenosine deaminase ADA2. *J Biol Chem* 2010; 285:12367-12377.
 25. Cunningham-Rundles C, Ponda PP. Molecular defects in T and B cell primary immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:880-892.
 26. Arrieta-Bolaños E. Avances recientes en la etiología molecular y tratamiento de la inmunodeficiencia severa combinada (SCID). *Rev Biomed* 2010; 21:35-47
 27. Pike-Overzet K, van der Burg M, Wagemaker G, van Dongen JJ, Staal FJ. New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. *Mol Ther* 2007; 15:1910-1916.
 28. Benveniste P, Zhu W, Cohen A. Interference with thymocyte differentiation by an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *J Immunol* 1995; 155:536-544.
 29. Scriver B, Valle S. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 8th Ed. Mc Graw Hill 2001; p 2513- 2530.

30. **Aldrich MB, Chen W, Blackburn MR, Martinez-Valdez H, Datta SK, Kellems RE.** Impaired germinal center maturation in adenosine deaminase deficiency. *J Immunol* 2003; 171:5562-5570.
31. **Young K, Tong Z, Lee KW.** Poly ADP-ribosylation by PARP-1: "PARP-laying" NAD⁺ into a nuclear signals. *Genes Dev* 2005; 19:1951-1967.
32. **Hershfield MS.** Apparent suicide inactivation of human lymphoblast S adenosylhomocysteine hydrolase by 2-deoxyadenosine and adenine arabinose. *J Biolog Chemistry* 1979; 254:22-25.
33. **Sitkovsky MV, Lukashov D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M.** Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:657-682.
34. **Apasov SG, Blackburn MR, Kellems RE, Smith PT, Sitkovsky MV.** Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *J Clin Invest* 2001; 108: 131-141.
35. **Lappas CM, Rieger JM, Linden J.** A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2005; 174:1073-1080.
36. **Cassani B, Miolo M, Cattaneo F, Benninghoff U, Hershfield M, Carlucci F, Tabucchi A, Bordignon C, Roncarolo MG, Aiuti A.** Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in ADA-SCID patients. *Blood*. 2008; 111:4209-4219.
37. **Anderson WF, Blaese RM, Culver K.** The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to consider response with clinical protocol, July 6, 1990. *Hum Gene Ther* 1990; 1:331-362.
38. **Cavagnaria BM.** Terapia génica: opción terapéutica para neoplasias, infecciones y enfermedades monogénicas. *Arch Argent Pediatr* 2011; 109:326-332.
39. **Gaspar HB, Aiuti A, Porta F, Candotti F, Hershfield MS, Notarangelo LD.** How I treat ADA deficiency. *Blood* 2009; 22:3524-3532.
40. **Veronese FM, Mero A.** The impact of PGEylation on biological therapies. *Bio-drugs* 2008; 22:315-329.
41. **Booth C, Gaspar HB.** Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biologies* 2009; 3:349-358.
42. **Aiuti A, Roncarolo MG.** Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:682-689.
43. **Serana F, Sottini A, Chiarini M, Zanotti C, Ghidini C, Lanfranchi A, Notarangelo LD, Caimi L, Imberti L.** The different extent of B and T cell immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation and enzyme replacement therapies in SCID patients with adenosine deaminase deficiency. *J Immunol* 2010; 185:7713-7722.
44. **Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, Casorati G, Ficara F, Andolfi G, Ferrari G, Tabucchi A, Carlucci F, Ochs HD, Notarangelo LD, Roncarolo MG, Bordignon C.** Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 2002; 8:423-425.
45. **Booth C, Gaspar HB.** Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biologies* 2009; 3:349-358.
46. **Malacarne F, Benicchi T, Notarangelo LD, Mori L, Parolini S, Caimi L, Hershfield M, Notarangelo LD, Imberti L.** Reduced thymic output, increased spontaneous apoptosis and oligoclonal B cells in polyethylene glycol-adenosine deaminase-treated patients. *Eur J Immunol* 2005; 35: 3376-3386.
47. **Chan B, Wara D, Bastian J, Hershfield MS, Bohnsack J, Azen CG, Parkman R, Weinberg K, Kohn DB.** Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin Immunol* 2005; 117:133-143.