

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA  
Instituto de Biotecnología y Biomedicina  
Departamento de Biología Celular, Fisiología e  
Inmunología  
Unidad de Inmunología

**Análisis de la expresión de btk,  
Ick, SAP, ICOS y células B de  
memoria en pacientes con  
Inmunodeficiencia Variable  
Común**

**Ma. Del Carmen Zárate Hernández**

**TESIS DOCTORAL**

**2007**

**Dr. Manuel Hernández González**, doctor en biologia i facultatiu especialista en immunologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, director de la tesi i la **Dra. Teresa Español Boren**, Professor Associat del Departament de Biologia cel·lular, Fisiologia i Immunologia, de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, tutora de la tesi,

FAN CONSTAR,

que la tesi titulada “**Análisis de la expresión de la btk, Ick, SAP, ICOS y células B de memoria en pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común**”, ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat Dña. **Carmen Zárate Hernández**, trobant-se en condicions de poder ser presentada per al tràmit de lectura i defensa pública

Barcelona, dotze de desembre de dos mil sis.

**Dr. Manuel Hernández**

Director de la tesi

**Dra. Teresa Español**

Tutora de la tesi

## AGRADECIMIENTOS

Al iniciar mi viaje hacia España hace algunos años, no sabía lo que iba a encontrar, tenía miedo e incertidumbre por las cosas que habría de pasar. La nostalgia de dejar mi país y el llegar a un lugar nuevo me provocaba sentimientos encontrados, pero solo Dios sabe los caminos trazados para cada persona, y las experiencias que se han de vivir en cada etapa de la vida. Hoy doy gracias a la gente que me apoyo incondicionalmente y que aun lo sigue haciendo y que no necesita que se reconozca para brindar su ayuda ante cualquier situación.

Agradezco a Dios, por esta experiencia y por la oportunidad de conocer gente excelente, que me ayudo en la realización de este trabajo. También, mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que hicieron posible que este trabajo se lograra.

Al Hospital Universitario y al Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica, así como a la Dra. Sandra González y Dr. Carlos Canseco, por su apoyo en mi beca y estancia en este país.

Al la Dra. Teresa Español, por recibirme en su departamento (Unidad de Inmunología del Hospital Vall d' Hebron), su amistad, confianza, su ayuda y apoyo en conseguir realizar esta tesis (por fin), mil gracias por esto. Además gracias por enseñarme el manejo de estos pacientes.

Al Dr. Manuel Hernández, (Manolo), muchísimas gracias primero por aceptar ser mi director de la tesis, después por impulsarme a terminarla y ayudarme en toda la asesoría del escrito, la verdad te hice trabajar mucho, no tengo como agradecerle.

A toda la Unidad de Inmunología del Hospital Vall d' Hebron, Drahomira Detkova gracias por todos tus datos y apoyo, Susana Urban, Isabel Caracol, Neus, Encarna y Sandra gracias por enseñarme a realizar las técnicas de laboratorio y su ayuda en este camino (que no conocía). Ramiro, Laura, Joan gracias por su enseñanza en el manejo del western blot.

Y que sería también sin el apoyo y amistad de mis grandes amigas (Selma Lessa y Jazmín ElHaken), que me ayudaron dentro y fuera del hospital, brindándome su amistad y apoyo aun estando a muchos kilómetros de distancia, gracias y que sepan que no las olvido.

Hay muchísimas personas que me ayudaron y que quisiera agradecerles en este escrito, perdón si acaso se me puede pasar un nombre, Francisco R. González, José E. González, Rafael Nájera, Justo Delgado, Fernanda Almaguer, Claudia

González, Alfredo Arias, Martha Martínez, Alicia Martínez y Joaquín, Sergio Sánchez, Inken Wolthaus (gracias por brindarme tu casa), JM Torrens, Vivian, Oriol, Dani, Marc, Ricardo Vallejo, Martha Valero, Ana Muñoz, Claudia Bringas, entre otros.

A mis padres, hermanos y demás familia, que me apoyaron sobre todas las adversidades para realizar este proyecto. Luisa eres un gran apoyo en todo esto. Muchísimas gracias.

Gracias a todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de esta tesis. A los pacientes del Hospital Vall d' Hebron y Hospital Bellvitge, personal médico y de enfermería de las mismas instituciones.

*DEDICATORIA*  
**A MIS PADRES**

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Defectos en el sistema inmunitario: las inmunodeficiencias.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Clasificación de las Inmunodeficiencias primarias.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2 Prevalencia.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Inmunodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Inmunodeficiencia variable común.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1 Definición.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Incidencia.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.3 Heterogeneidad clínica e inmunológica.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.4 Manifestaciones clínicas.....</b>	<b>9</b>
A) Manifestaciones Respiratorias.....	9
B) Manifestaciones Gastrointestinales.....	10
C) Otras infecciones.....	11
D) Manifestaciones Autoinmunes.....	12
E) Manifestaciones Linfáticas.....	13
F) Granulomas.....	14
G) Cáncer.....	14
H) Malnutrición.....	15
<b>1.3.5 Etiología.....</b>	<b>16</b>
a) Defectos en células B.....	17
b) Defectos en células T.....	20
c) Células presentadoras de antígeno.....	21
d) Citocinas.....	21
e) Apoptosis.....	23
f) Estrés oxidativo.....	23
g) Otras moléculas involucradas.....	24
1) ICOS	
2) TACI	
3) BAAF y BAFFR	
4) CD19	
<b>1.3.6 Clasificación de los pacientes en base a linfocitos B.....</b>	<b>30</b>

1.3.7	Genética.....	32
1.3.8	Diagnóstico diferencial.....	34
1.3.9	Tratamiento.....	35
1.3.10	Pronostico.....	38
1.4	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.....	39
1.5	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X.....	41
1.6	Déficit de lck.....	43
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>45</b>
2.1	Antecedentes.....	46
2.2	Hipótesis de trabajo.....	46
2.3	Objetivos.....	47
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1	Estudio de la expresión de proteínas btk, lck y SAP en pacientes con IDVC.....	49
3.1.1	Población de estudio .....	49
3.1.2	Recopilación de datos clínicos e inmunológicos de los pacientes con IDVC.....	56
3.1.3	Estudio de la expresión de proteínas en células mononucleadas.....	56
3.2	Estudio de la expresión de proteínas de lisados de células mononucleadas.....	59
3.2.1	Concentración de proteínas de los lisados celulares.....	59
3.2.2	Determinación de la concentración de proteínas en lisados celulares.....	59
3.2.3	Electroforesis.....	61
3.2.4	Elección de un sistema de geles comerciales.....	62
3.2.5	Evaluación de electroforesis.....	63
3.2.6	Transferencia: sistema semi-seco.....	64
3.2.7	Inmunodetección.....	65
3.2.8	Evaluación de anticuerpos primarios.....	67
3.2.9	Controles.....	68
3.2.10	Stripping.....	69
3.2.11	Soluciones y tampones.....	70

<b>3.3 Grupos de pacientes para el estudio de linfocitos B de memoria.....</b>	<b>72</b>
<b>3.3.1 Grupo de estudio.....</b>	<b>72</b>
<b>3.3.2 Recopilación de datos clínicos e inmunológicos de pacientes con IDVC.....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.3 Subpoblaciones linfocitarias.....</b>	<b>76</b>
<b>3.3.4 Función linfocitaria.....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.5 Inmunoglobulinas séricas.....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.6 Subclases de inmunoglobulinas.....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.7 Producción de anticuerpos específicos.....</b>	<b>78</b>
<b>3.3.8 Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B.....</b>	<b>79</b>
<b>3.4 Estudio de la expresión de ICOS.....</b>	<b>83</b>
<b>3.4.1 Obtención de datos.....</b>	<b>83</b>
<b>3.4.2 Preparación celular y estimulación.....</b>	<b>85</b>
<b>3.4.3 Análisis por citometría de flujo.....</b>	<b>86</b>
<b>3.5 Análisis de la expresión intracelular de btk por citometría de flujo en monocitos....</b>	<b>88</b>
<b>3.5.1 Preparación de muestra.....</b>	<b>88</b>
<b>3.5.2 Análisis por citometría de flujo.....</b>	<b>89</b>
<b>3.6 Análisis de datos experimentales.....</b>	<b>90</b>
<b>3.6.1 Estudio de la expresión btk, Ick, SAP</b>	
<b>3.6.2 Estudio de linfocitos B de memoria en pacientes con IDVC</b>	
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1 Estudio de la expresión de proteínas btk, Ick y SAP en pacientes con IDVC.....</b>	<b>92</b>
<b>4.1.1 Datos demográficos.....</b>	<b>92</b>
<b>4.1.2 Manifestaciones clínicas.....</b>	<b>93</b>
<b>4.1.3 Datos inmunológicos.....</b>	<b>94</b>
<b>4.1.4 Edad, primeros síntomas-diagnostico-tratamiento.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1.5 Estandarización de la concentración de anticuerpos.....</b>	<b>97</b>
<b>4.1.6 Expresión e imágenes de la proteína btk.....</b>	<b>99</b>



4.1.7	Expresión e imágenes de la proteína Ick.....	102
4.1.8	Expresión e imágenes de la proteína SAP.....	105
4.2	Estudio de los linfocitos B de memoria en pacientes con IDVC.....	108
4.2.1	Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B en controles y pacientes con IDVC .....	108
4.2.2	Clasificación de los pacientes con IDVC en grupos según la cuantificación de los linfocitos B de memoria.....	109
4.2.3	Caracterización clínica e inmunológica de los pacientes con IDVC clasificados en grupos BM.....	114
4.2.3.1	Datos generales y antecedentes familiares.....	114
4.2.3.2	Caracterización clínica de los pacientes con IDVC clasificados en grupos BM.....	116
4.2.3.3	Datos inmunológicos de pacientes con IDVC.....	123
4.2.3.4	Características clínico inmunológicas de los pacientes con IDVC clasificación en grupos BM, Resumen.....	126
4.3	Resultados del estudio de la expresión de ICOS.....	127
5.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	133
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	149
7.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	151
8.	<b>ANEXOS</b> .....	163

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 DEFECTOS EN EL SISTEMA INMUNITARIO: LAS INMUNODEFICIENCIAS.**

La integridad del sistema inmunitario es básica para la defensa contra las sustancias extrañas. Los individuos que padecen una deficiencia en algún componente del sistema inmunitario suelen presentar una mayor susceptibilidad a las infecciones, que suelen ser persistentes y recurrentes.

Las inmunodeficiencias (ID) más frecuentes son las adquiridas o secundarias, ocasionadas por la pérdida o la falta de proteínas séricas. Su etiología es debida principalmente a malnutrición, a la infección por microorganismos: bacterias, hongos, protozoarios y virus (virus de la inmunodeficiencia humana, virus del sarampión, virus de Epstein Barr, citomegalovirus, etc.) o al uso de fármacos inmunosupresores (citostáticos, corticoides, etc.)<sup>1</sup>.

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son enfermedades genéticas que suelen presentarse durante la primera o segunda década de la vida, aunque pueden también manifestarse en la edad adulta. Su frecuencia es uno de cada 10,000 nacimientos<sup>2</sup>. Se caracterizan por una susceptibilidad a infecciones crónicas y recurrentes, enfermedades autoinmunes, cáncer (principalmente linfomas) y en algunos casos inflamación no controlada debida a una infiltración anormal de linfocitos en tejidos y órganos<sup>3</sup>.

Durante los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas de estos defectos del sistema inmunitario, que han servido para mejorar el diagnóstico, el consejo genético y la terapéutica, mediante la formulación de nuevas estrategias. Estos logros se deben, en gran parte, a que las IDP sirven de modelos naturales para

profundizar en el conocimiento de la función de los distintos componentes del sistema inmunitario humano.

### **1.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS IDP**

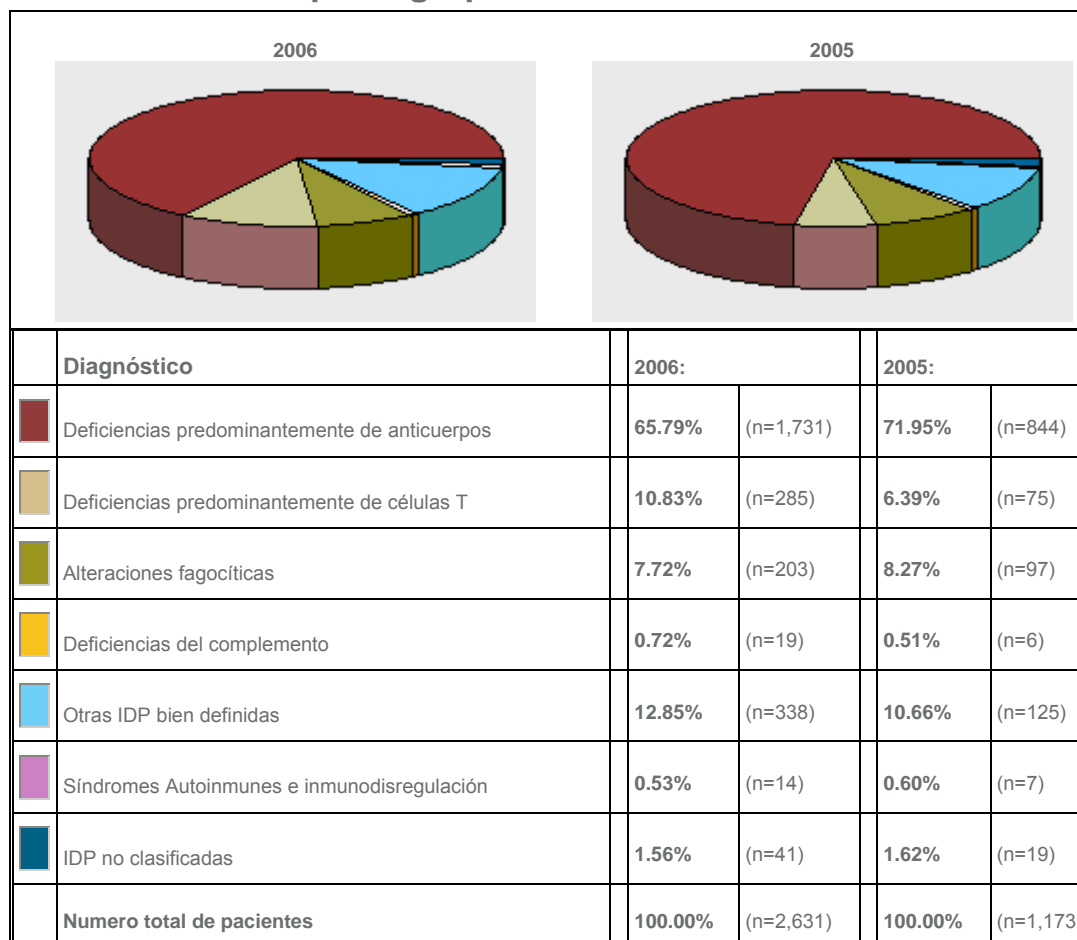
La clasificación, modificada, de las IDP propuesta por el Grupo Científico de la International Union of Immunology Societies (IUIS)<sup>4</sup> las agrupa en:

- 1) - Inmunodeficiencias severas combinadas de células T y B.
- 2) - Deficiencias predominantemente de anticuerpos.
- 3) - Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos.
- 4) - Enfermedades de disregulación inmunitaria.
- 5) - Defectos congénitos de número, función o ambos, de los fagocitos.
- 6) - Defectos en la inmunidad innata.
- 7) - Alteraciones autoinflamatorias.
- 8) - Deficiencias del complemento.

### **1.1.2 PREVALENCIA**

Las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos son las más frecuentes, ya que representan alrededor de un 70% del total de las IDP, según los datos obtenidos del registro de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias Primarias (ESID) (figura 1) y del Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias (REDIP) (tabla1 y figura 2)<sup>5, 6</sup>.

## Principales grupos de inmunodeficiencias

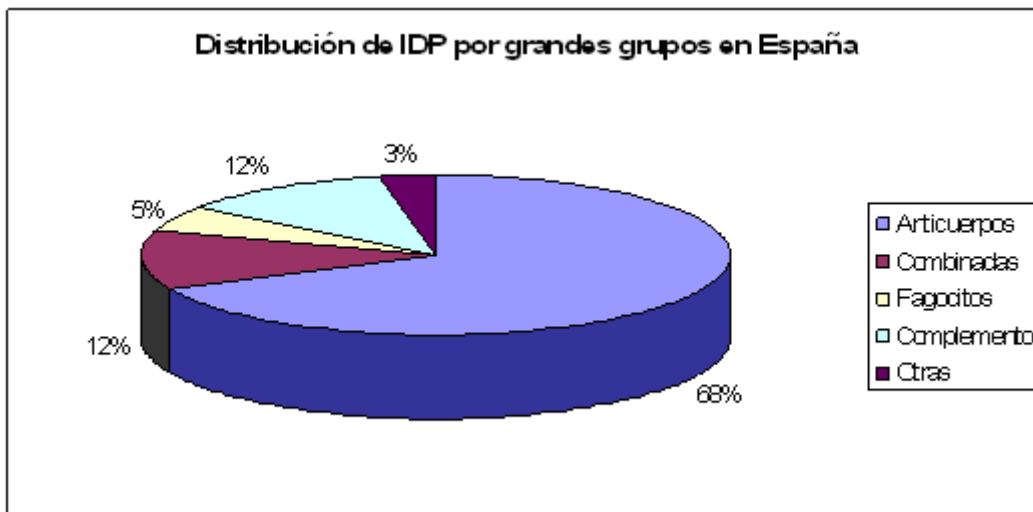


**Figura 1.-** Principales grupos de inmunodeficiencias, según el registro de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias. Datos obtenidos de la página de Internet [www.esid.org](http://www.esid.org)

## Diagnósticos de IDP más registrados

• Déficit de IgA	929
• Inmunodeficiencia común variable	462
• Déficit de C1-inhibidor	250
• Inmunodeficiencias combinadas	152
• Deficiencia de subclases de IgG	98
• Agammaglobulinemia	96
• Enfermedad Granulomatosa crónica	72
• Anomalia de DiGeorge	63
• Ataxia-Telangiectasia	53
• Síndrome de Hiper IgE	40
• Síndrome de Wiskott- Aldrich	33
• Candidiasis mucocutánea crónica	28

**Tabla 1.-** Datos del Registro Español De Inmunodeficiencias Primarias (REDIP) del 1993 al 2004, en el cual 12 síndromes representan el 90% de los casos. <http://web.hsd.es/redip/>



**Figura 2.-** Distribución de los principales grupos de inmunodeficiencias en el Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias. <http://web.hsd.es/redip/>

El déficit de IgA (DIgA) es la IDP más común (1/700 en personas caucásicas), aunque sólo alrededor de un tercio de los pacientes presentan clínica, básicamente infecciones bacterianas respiratorias recurrentes y procesos autoinmunes. Por lo tanto, la inmunodeficiencia variable común (IDVC) pasa a ser la IDP más frecuente (1/10.000 a 1/25.000 según estimaciones en países Europeos) con manifestaciones clínicas<sup>2, 7</sup>.

## 1.2 IDP CON DEFECTOS PREDOMINANTEMENTE DE ANTICUERPOS

En este grupo de IDP el defecto se limita a la formación de anticuerpos, ya sea por una alteración en el desarrollo intrínseco de los linfocitos B o por un fallo en la respuesta efectiva de estas células a las señales de los linfocitos T. Los síndromes que presentan un déficit de inmunoglobulinas son un grupo heterogéneo de defectos inmunológicos, clínicamente definidos por una mayor susceptibilidad a las infecciones recurrentes.

Las manifestaciones clínicas suelen ser similares entre sí, aunque algunos de ellos presentan peculiaridades propias. Los defectos moleculares y celulares en estos síndromes son muy heterogéneos, pudiendo afectar a distintos elementos (células,

mediadores, receptores, etc...) que participan en la respuesta inmunológica humoral.

La clasificación actual incluye las mutaciones que se han descrito recientemente en pacientes con hipogammaglobulinemia (tabla 2)<sup>4</sup>.

Generalmente los pacientes con IDP se caracterizan por iniciar las manifestaciones clínicas en una etapa temprana de la vida. Sin embargo, algunas inmunodeficiencias pueden producir manifestaciones clínicas de inicio, en la edad adulta, como son: la IDVC, el DIgA, la deficiencia de subclases de IgG y la deficiencia de C2 del complemento. Lo mismo ocurre en otras IDP, como la ALX (Agammaglobulinemia ligada a X), el déficit de ADA (adenosin desaminasa), que produce una IDSC (Inmunodeficiencia severa combinada), el WAS (Síndrome de Wiskott Aldrich) y la EGC (enfermedad granulomatosa crónica), cuando existe un defecto parcial de la proteína afectada con un fenotipo mas leve. En estos casos los defectos están presentes desde el nacimiento, pero los síntomas se inician en etapas mas tardías<sup>8,9</sup>. Otros pacientes pueden estar diagnosticados de un tipo de inmunodeficiencia y posteriormente evolucionar a otra. Esto se ha descrito en algunos casos con déficit de IgA, que posteriormente han evolucionado a una IDCV<sup>8,10</sup>.

**Tabla 2.** Deficiencias predominantemente de anticuerpos. Clasificación según IUIS

<b>Enfermedad</b>	<b>Herencia</b>	<b>Defecto genético</b>
<b>1. Reducción importante en todos los isotipos de Igs séricas con ausencia de células B.</b>		
a) Deficiencia Btk	XL	Mutaciones en Btk
b) Deficiencia en cadena pesada $\mu$	AR	Mutaciones en cadena pesada $\mu$
c) Deficiencia $\lambda$ 5	AR	Mutaciones en $\lambda$ 5
d) Deficiencia $Ig\alpha$	AR	Mutaciones en $Ig\alpha$
e) Deficiencia BLNK	AR	Mutaciones en BLNK
f) Timoma con inmunodeficiencia	Ninguna	Desconocido
<b>2. Severa reducción en al menos 2 isotipos de inmunoglobulinas séricas con número de células B normal o bajo</b>		
a) Alteraciones en IDVC	Variable	Desconocido
b) Deficiencia de ICOS	AR	Mutaciones en ICOS
c) Deficiencia de CD19	AR	Mutaciones en CD19
d) Deficiencia de TACI	AD o AR	Mutaciones en TACI
e) Deficiencia de receptor de BAFF	AR	Mutaciones en BAFFR
<b>3. Reducción severa en IgG e IgA sérica con incremento de IgM y numero normal de células B</b>		
a) Deficiencia de AID	AR	Mutación en AICDA
b) Deficiencia de UNG	AR	Mutación en UNG
<b>4. Deficiencias en isotipo o cadena ligera con numero normal de células B</b>		
a) Deleciones en cadena pesada Ig	AR	Delección en cromosoma 14q32
b) Deficiencia en cadena $\kappa$	AR	Mutación en gen constante $\kappa$
c) Deficiencia en subclases de IgG aislada	Variable	Desconocido
d) Deficiencia en IgA con subclases de IgG	Variable	Desconocido
e) Deficiencia selectiva de IgA	Variable	Mutación desconocida y en pocos casos TACI
<b>5. Deficiencia de anticuerpos específicos con concentraciones de Igs y número de células B normales</b>	Variable	Desconocido
<b>6. Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia</b>	Variable	Desconocido



## **1.3 INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN**

### **1.3.1 DEFINICIÓN**

La IDVC es un síndrome heterogéneo de etiología desconocida, caracterizado básicamente por hipogammaglobulinemia de 2 o más isotipos de inmunoglobulinas, infecciones respiratorias de repetición y otras anormalidades inmunológicas. Fue descrito en 1953<sup>3</sup> por Janeway. A diferencia de otras IDP, no es una enfermedad ligada al sexo, afectando tanto a varones como a mujeres, con cierto predominio en varones. Sólo en algunos casos con un defecto monogénico se ha podido demostrar una transmisión genética de la enfermedad (autosómica recesiva y autosómica dominante). Los primeros síntomas pueden aparecer en la infancia, adolescencia o en la edad adulta. El diagnóstico se realiza preferentemente en dos picos de edad: uno en la infancia y otro entre los 20 y 30 años,<sup>3, 11</sup> siendo la IDP mas frecuente de inicio en adultos<sup>8</sup>. Asimismo, la IDVC es también la ID de anticuerpos primaria sintomática mas común.

### **1.3.2 INCIDENCIA**

Históricamente la prevalencia de esta enfermedad se cifraba en 2.5/100.000 adultos<sup>12</sup>, pero parece ser una subestimación debido a que muchas IDVC no son diagnosticadas, pudiendo variar ampliamente y va desde 1/10,000 a 1/100,000<sup>3</sup>.

### **1.3.3 HETEROGENEIDAD CLÍNICA E INMUNOLÓGICA.**

La característica principal de la IDVC es la heterogeneidad, probablemente debida a diversas causas entre las que caben destacar dos: a) Que aunque la mayoría de los pacientes presentan infecciones recurrentes respiratorias y gastrointestinales, también pueden presentar una gran variedad de alteraciones no infecciosas (autoinmunes, inmunoproliferativas, inflamatorias, etc.). b) La demostración de distintas alteraciones inmunológicas en los pacientes, cuando en

un principio se pensaba que la IDVC estaba causada por un defecto intrínseco de los linfocitos B (células responsables en último lugar de la producción de anticuerpos).

Actualmente ya se han descrito diversos defectos moleculares, entre los distintos pacientes, que pueden afectar a muchos de los elementos que participan en la respuesta humoral: linfocitos B, linfocitos T, células presentadoras de antígeno (CPA) y mediadores leucocitarios (citocinas).<sup>11,13</sup>.

#### **1.3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Las infecciones sinopulmonares piógenas recurrentes están presentes prácticamente en todos los pacientes en el momento de su diagnóstico y son el principal motivo de la consulta médica. Pero además de las infecciones recurrentes del tracto respiratorio podemos enumerar un gran número de enfermedades asociadas a la IDVC<sup>14</sup>. La variedad de infecciones, y no los niveles séricos de inmunoglobulinas, refleja el grado de disfunción inmunitaria<sup>15</sup>.

##### **A) Manifestaciones respiratorias:**

Las manifestaciones clínicas de origen respiratorio son las más frecuentes, teniendo un alto porcentaje de causalidad en la manifestación de los primeros síntomas<sup>14, 16</sup>. Estas manifestaciones respiratorias pueden ser: neumonías (66%), sinusitis (60%), bronquitis (45%), otitis (29%), sobreinfecciones respiratorias de repetición, bronquiectasias, neumopatía crónica, etc,<sup>17</sup>.

Las bacterias encapsuladas (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, etc) son los gérmenes responsables de la mayoría de las infecciones respiratorias, ya que se precisa de la colaboración de anticuerpos opsonizantes (IgG) para su fagocitación. Asimismo, existe una gran susceptibilidad a padecer infecciones pulmonares por *Mycoplasma pneumoniae*. Generalmente las infecciones virales son mejor toleradas, excepto en el caso de: enterovirus, *Herpes simplex*,

varicela zoster y citomegalovirus<sup>18,19,20</sup>. En un estudio realizado en Finlandia a pacientes con hipogammaglobulinemia, se les realizó cultivo de lavado bronquioalveolar y se encontró adenovirus en un 36% y además rinovirus y citomegalovirus (CMV) (cada uno en un paciente). El adenovirus es un virus que se ha encontrado frecuentemente en pacientes inmunocomprometidos y ha sido relacionado con una predisposición al desarrollo de bronquiectasias en niños. En el mismo estudio el *Haemophilus influenzae* fue la bacteria encontrada con mayor frecuencia<sup>17,21</sup>.

Los procesos pulmonares infecciosos, padecidos de forma reiterativa, son responsables del deterioro progresivo de la función pulmonar. Dado que la IDVC es una enfermedad tributaria de tratamiento sustitutivo con gammaglobulinas, el diagnóstico temprano será de capital importancia, no sólo para prevenir y controlar los procesos infecciosos, sino también para evitar el desarrollo de una neumopatía crónica, ya que según estudios, alrededor del 17% de pacientes presentan bronquiectasias al momento del diagnóstico<sup>18</sup>.

Las complicaciones pulmonares como: bronquiectasias, enfisema, neumonía linfoide intersticial, fibrosis pulmonar o enfermedad pleural, se desarrollan en cerca de 20 a 30% de los pacientes<sup>22</sup>, siendo las más frecuentes la neumonía bacteriana recurrente y la supuración bronquial<sup>23</sup>. Estas complicaciones, bajo un tratamiento inadecuado, conducen a una insuficiencia respiratoria grave, requiriendo en algunas ocasiones del trasplante pulmonar, siendo junto con el linfoma, una de las principales causas de muerte en estos pacientes. Los hallazgos más frecuentes a nivel de radiografías y tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), de acuerdo a una revisión de casos<sup>17,24</sup>, son las bronquiectasias (con un rango de 24 – 58%), engrosamiento de la pared bronquial (18 - 42%) y otros menos frecuentes como: nódulos parenquimatosos o mediastínicos, colapso lobar, lesiones intersticiales, etc.

## **B) Manifestaciones gastrointestinales:**

Son la segunda manifestación clínica más frecuente, siendo responsables de una gran parte de la patología que presentan los pacientes con IDVC. Algunos estudios reportan la incidencia de alteraciones gastrointestinales (GI) en un

32% de los pacientes, siendo las enteritis por *Salmonella* y *Giardia lamblia* las más frecuentes<sup>18,25</sup>. Los anticuerpos secretados a nivel GI juegan un rol importante en el control de la flora microbiana intestinal y su ausencia puede favorecer la proliferación de los comensales o patógenos intestinales, los cuales inician y perpetúan una reacción inflamatoria crónica<sup>3</sup>. Las infecciones recurrentes del tracto gastrointestinal son producidas comúnmente por: *Giardia lamblia*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, rotavirus y otros. Las infecciones por *Giardia* en pacientes con IDVC (a diferencia de pacientes sin IDVC) ocurren aunque los niveles de exposición no sean altos y son más difíciles de erradicar con la terapia convencional. La reducción de los niveles de IgG e IgA en pacientes inmunocomprometidos se correlaciona con la incapacidad para eliminar el parásito desde el intestino. Las manifestaciones GI no infecciosas ocurren en el 20% de los pacientes y pueden ser: diarrea crónica no infecciosa, malabsorción (marcada por el incremento de la excreción de grasa y D-Xilosa anormal), intolerancia a la lactosa, hallazgos que semejan un síndrome celiaco y enteropatía perdedora de proteínas<sup>15,20</sup>. Estas manifestaciones pueden producir pérdida de peso importante, pérdida de nutrientes con hipocalcemia (debido a la malabsorción de vitamina D), anemia (debido a la malabsorción de ácido fólico) e hipoalbuminemia, produciendo edema generalizado (debido a la pérdida de proteínas). Histopatológicamente, existe atrofia de vellosidades de leve a moderada y un aumento de linfocitos intraepiteliales y en la lámina propia (cuadro similar a enteropatía sensible al gluten). Las lesiones gástricas consisten en gastritis que en muchos casos evolucionan a gastritis atrófica y aclorhidria. La gastritis en la IDVC está asociada al desarrollo de anemia perniciosa<sup>20</sup>.

La enfermedad inflamatoria intestinal es común; cerca del 30% de los pacientes tiene algún grado de diarrea crónica y aproximadamente un 10% tiene una gastroenteropatía del intestino delgado y grueso grave, con malabsorción y ocasionalmente estructuras ileales fibróticas<sup>26</sup>.

### C) **Otras infecciones:**

En estos pacientes hay otros sistemas del organismo afectados por infecciones:

**Articulaciones:** hay una predisposición a infecciones por micoplasma no patogénico y ureaplasma, dando lugar a una artritis séptica<sup>15</sup>. La artritis en la IDVC no es destructiva y generalmente incluye las grandes articulaciones de forma asimétrica<sup>20</sup>.

**Neurológicas:** Las alteraciones mas comunes son: la meningitis bacteriana (causada por *Pneumococo*, *Haemophilus influenzae*), abscesos cerebrales, y enfermedad granulomatosa<sup>15</sup>. La predisposición a infecciones virales del sistema nervioso central (SNC) en pacientes con hipogammaglobulinemia es poco común. Sin embargo, Rudge et al. reportaron esta afección en 7 de 13 pacientes con hipogammaglobulinemia (incluyendo ALX e IDVC) y los virus mas comunes fueron enterovirus y ECHO virus. Otras afecciones reportadas aquí fueron: perdida progresiva del sentido del oído y lesiones en la retina como retinitis pigmentosa y coroidoretinitis<sup>27</sup>. También se ha reportado polineuropatía sensoriomotora axional de causa autoinmune<sup>28</sup>.

**Ojos:** Muchos pacientes con o sin síntomas oculares tienen evidencia de reducción en la secreción de lágrimas, con anomalías corneales asociadas. La uveítis puede ocurrir en asociación con la enfermedad granulomatosa en la IDVC<sup>15</sup>.

#### D) **Manifestaciones autoinmunes:**

La asociación entre inmunodeficiencia y autoinmunidad no es una excepción en el caso de la IDVC. Alrededor de un 20-30%<sup>14,16,29,30</sup> de los pacientes presentan trastornos autoinmunes como: anemia hemolítica autoinmune (AHA), púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), artritis reumatoide (AR), neutropenia, anemia perniciosa y lupus eritematoso sistémico, siendo más frecuente en las mujeres que en los varones. En una revisión de 248 pacientes Cunningham y cols. encontraron una prevalencia de 23% de enfermedades autoinmunes, siendo la PTI la mas frecuente, en 7.6% de los pacientes<sup>19,31</sup>.

También pueden coexistir la enfermedad de Graves, hipoparatiroidismo, cirrosis biliar primaria, síndrome de SICCA, glomerulonefritis y vasculitis<sup>20</sup>.

Según algunas publicaciones, las bases genéticas para las enfermedades autoinmunes pueden estar relacionadas a las bases genéticas de las ID. Se ha sugerido que pacientes con esta ID tienen pérdida de la respuesta de IgA normal en las mucosas, fallando el mecanismo de exclusión de proteínas del medio ambiente en las superficies mucosas. Esto puede permitir la inmunización con antígenos del medio ambiente, que reaccionan cruzadamente con antígenos propios, induciendo el proceso de autoinmunidad. La IDVC tiene anomalías de las células T, por lo tanto los pacientes pueden tener menos capacidad para detener y/o regular la respuesta autoinmune.

#### **E) Manifestaciones linfáticas:**

Un tercio de los pacientes tienen esplenomegalia y linfadenopatías. Los nódulos linfáticos muestran una importante hiperplasia folicular reactiva<sup>11</sup>. La hiperplasia nodular linfoide (HNL) consiste en colecciones macroscópicas de linfocitos dispersados, a través de la pared del intestino delgado, colon o recto y su patogenia parece estar relacionada con la estimulación antigénica persistente de los linfocitos B residuales en la pared intestinal y su escasa capacidad para sintetizar anticuerpos. En un número limitado de pacientes la mayoría de las células son linfocitos B IgM positivos rodeados por células T, la mayoría de las cuales son CD8+. Estos hallazgos pueden sugerir que esto representa intentos abortivos de formar folículos de células B productivas las cuales no son adecuadamente reguladas por las células T. La HNL es virtualmente patognomónica de la IDVC y aunque por si sola no produce síntomas, aumenta el riesgo de linfoma intestinal. La hiperplasia se distingue del linfoma en que consiste de ambas células T y B y no es monoclonal<sup>20</sup>. El estudio histológico del intestino muestra con cierta frecuencia, además de las lesiones de HNL, atrofia de vellosidades y/ o ausencia de células plasmáticas.

La neumonitis linfoide intersticial (NLI) se caracteriza por un infiltrado linfoide reactivo difuso o multifocal, que involucra el intersticio alveolar (es también conocido como hiperplasia difusa del tejido linfoide asociado a bronquios [BALT]). Este infiltrado suele ser de linfocitos T, células plasmáticas, fibroblastos y macrófagos diseminados; en los casos asociados a la IDVC las

células son principalmente linfocitos T CD4+<sup>32</sup>. La NLI también ha sido asociada a algunas infecciones como: VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) y VEB (Virus de Epstein Barr). Cuando la enfermedad es aislada, cerca del 10% de pacientes con NLI pueden tener hipogammaglobulinemia.

## F) Granulomas

Las lesiones granulomatosas han sido descritas en tejidos linfoides, órganos sólidos o piel. Aunque su incidencia es desconocida, hay series en que se reporta de 5.4 a 10%, y algunas reportan hasta el 20% de los pacientes con IDVC. Estas lesiones se han asociado con los pacientes que presentan mas alteraciones inmunológicas como son: deficiencia de células T, defecto en el procesamiento de antígeno o producción inadecuada de citocinas; se sugiere que puede haber un secuestro anormal de antígeno y/ o subsiguiente formación de granulomas. Cunningham encontró que un 28% de los pacientes con IDVC estudiados tenían algún tipo de enfermedad AI asociada, pero 9/17 pacientes con granulomas tenían una franca enfermedad AI; esto puede sugerir una conexión entre una función de células T anormal o deficiente y la producción de citocinas <sup>15,33</sup>.

## G) Cáncer:

La incidencia de aparición de neoplasias sólidas y hematológicas, está incrementada de 8-13 veces, sobre todo en mujeres (438 veces) <sup>34</sup>, si la comparamos con individuos no inmunodeficientes de la misma edad y sexo. Las neoplasias más frecuentes son<sup>34</sup> las epiteliales de origen gastrointestinal (cáncer gástrico) <sup>35</sup> y los linfomas<sup>3</sup>. En dos estudios, británico y americano, se encontró un riesgo superior de desarrollar linfoma maligno de 30 y 259 veces, respectivamente <sup>34</sup>.

La incidencia de linfomas malignos es significativamente mas alta en pacientes con IDP y estos se caracterizan por: ser principalmente de tipo no-Hodgkin, una tendencia a presentarse en sitios extranodales, principalmente en el SNC

(Sistema Nervioso Central) y GI (Gastrointestinal), una rápida progresión clínica cuando no son tratados y una histología de células grandes de forma difusa, con frecuencia de origen extranodal, de tipo B, bien diferenciadas y que secretan inmunoglobulinas <sup>36</sup>. La causa de esta alta incidencia de neoplasias es desconocida, aunque es posible que la estimulación antigénica permanente y las alteraciones en la inmunidad celular intervengan como factores de riesgo. En la etiología de malignidad linfoproliferativa en las IDP puede estar involucrada la infección por el VEB, defectos en inmunoregulación y/ o inestabilidad genética y un probable efecto inhibitorio en la formación tumoral <sup>3</sup>. Las inmunodeficiencias primarias más comúnmente asociadas a desórdenes linfoproliferativos son: la Ataxia-telangiectasia (10%), la IDSC (7.6%) el SWA (7.6%) y la IDVC (1.4 – 7%). Aunque sin porcentaje de asociación conocido, el síndrome de hiper IgM y el XLP (síndrome linfoproliferativo ligado a X) también se asocian a linfomas<sup>37,38</sup>.

La incidencia de cáncer gástrico en esta enfermedad es 50 veces más alta que en la población general. Se ha demostrado que el *Helicobacter pylori* causa gastritis crónica activa, y existe una correlación importante entre la infección por esta bacteria y la atrofia con metaplasia intestinal en el estómago (riesgo incrementado de 4.5 – 9 veces), sin embargo se desconoce la causa de dicha incidencia mayor en los pacientes con IDVC; se sugiere que la IgA secretora juega un rol protector importante en el jugo gástrico, inhibiendo la motilidad y capacidad de adhesión del H. Pylori, neutralizando asimismo las toxinas que produce. Su deficiencia favorecería la proliferación de esta bacteria <sup>15,39</sup>.

#### H) **Malnutrición:**

Es una causa importante de morbilidad en estos pacientes, ocasionando una alteración del crecimiento, posiblemente secundario a infecciones recurrentes, diarrea y malabsorción. La diarrea crónica persistente y la malabsorción idiopática pueden inducir una malabsorción proteico – calórica (MPC) en los pacientes con IDVC. En este tipo de alteración, la MPC puede afectar negativamente los mecanismos de defensa del huésped. Las infecciones



recurrentes están asociadas a una serie de eventos metabólicos, que llevan a un estado de balance de nitrógeno negativo y pérdida significativa de masa corporal, con depleción nutricional, anorexia marcada y trastorno de la proteína corporal completa y del anabolismo hepático<sup>40</sup>. Los pacientes con disminución de células T CD4+ circulantes (<300) e IgA sérica no detectable, mostraron mayor prevalencia de depleción nutricional y morbilidad (infecciones recurrentes), con respecto a aquellos pacientes con niveles de células T CD4+ ligeramente por debajo de límite normal e IgA sérica detectable<sup>40</sup>.

### 1.3.5 ETIOLOGÍA

La etiología de la IDVC es actualmente desconocida en más del 90% de los casos. Se considera que podría ser multifactorial; entre estos factores están la predisposición genética y factores ambientales que podrían conducir al síndrome<sup>13</sup>. La colaboración entre las células T y B es fundamental para una respuesta inmunitaria óptima y ésta puede ser el elemento clave para entender el fallo inmunológico en la IDVC.

La producción de anticuerpos contra antígenos extraños, por parte de las células B, ha de ser específica y efectiva. Dicha producción se lleva a cabo en una etapa posterior a la maduración de los linfocitos B en los órganos linfoides, siendo la participación de las células T inmunocompetentes fundamentales en el proceso. Por lo tanto, la producción efectiva de anticuerpos requiere una colaboración entre células B, T y accesorias. En base a estos conocimientos las hipótesis que se barajan sobre el origen de la hipogammaglobulinemia, cuya causa directa sería un bloqueo en el paso de linfocito B maduro a célula plasmática secretora de anticuerpos son: a) un defecto intrínseco de las células B<sup>41,42,43</sup>, b) una excesiva actividad supresora de las células T<sup>44,45,46</sup>, c) una colaboración defectuosa T-B<sup>47,48,49,50,51,52,53,54,55,56</sup> y d) un fallo en las células presentadoras de antígeno<sup>57,58,59,60</sup>.

El amplio rango de alteraciones inmunológicas, identificadas en los distintos trabajos de investigación, ha dificultado la obtención de datos esclarecedores

sobre la etiología de la enfermedad, habiéndose buscado incluso un origen vírico<sup>61</sup>, que nunca se pudo demostrar. Conforme se han ido describiendo las bases moleculares de algunas IDP, pacientes que estaban diagnosticados de IDVC han sido re-diagnosticados de otras enfermedades (ALX, HIM, XLP, etc.), poniendo de manifiesto la heterogeneidad de la IDVC.

Las alteraciones inmunológicas descritas en la literatura están presentes: a) En la función de células B (producción de inmunoglobulinas *in vitro*, etc), b) En el fenotipo B (marcadores de maduración, coestímulo, etc), c) En la función de células T (activación, proliferación, producción de citocinas, etc.), d) En el fenotipo de células T (expresión de moléculas de adhesión, marcadores de activación, de memoria inmunológica, de coestímulo, etc.), e) En la función de monocitos (producción de citocinas, etc.) y f) En la apoptosis.

La hipogammaglobulinemia en los pacientes con IDVC es únicamente el fenotipo de esta enfermedad ya que la etiología de los defectos celulares, que podría ser muy variada, es desconocida. No se sabe cuanto podría haber de primario o secundario y esto complica su resolución.

#### **a) Defectos en células B**

Como la primera manifestación de la IDVC es la hipogammaglobulinemia, los primeros trabajos se enfocaron en la función de las células B; la evidencia actual indica que en muchos pacientes con IDVC las células B son capaces (con estímulos) de hacer anticuerpos y se sugiere que en la mayoría de los casos el defecto no está a nivel de las células B sino en la interacción de las células T y B<sup>62</sup>.

Los defectos descritos en las células B incluyen: defectos intrínsecos que conducen a una diferenciación terminal a células plasmáticas inadecuada, hipermutaciones somáticas reducidas, inadecuado desarrollo de las células B de memoria *in vivo*<sup>63</sup>, alteraciones de la apoptosis e incluso se han sugerido defectos anatómicos a nivel del bazo.

En base a las alteraciones de las células B, los pacientes se pueden agrupar en dos tipos; por un lado están los pacientes que presentan anormalidades profundas de las células B con un número reducido de las mismas (un pequeño porcentaje de pacientes no tienen células B circulantes),<sup>13</sup> o con un número de células B normal pero con capacidad proliferativa disminuida. Por otro lado, están los pacientes con número de células B y capacidad proliferativa normales pero incapaces de producir cantidades normales de Ig *in vitro*. Este grupo comprende la mayoría de los pacientes, que pueden a su vez subdividirse en aquellos con un defecto en la producción de cualquier Ig *in vitro* y aquellos que producen cantidades normales de IgM, pero cantidades reducidas de IgG e IgA. El fallo de las células B, de pacientes con IDVC, para producir Igs se debe en realidad a un doble defecto: por un lado en la diferenciación terminal, y por otro en el cambio de diferenciación de isotipo.

Otra posible causa de interés que explique los defectos en la función de las células B en la IDVC, sería la existencia de un defecto de los mecanismos anti-apoptóticos que normalmente están en juego, por tratarse de la estimulación de células que son defectuosas. Aunque las células B de pacientes con IDVC exhiben niveles normales de proliferación, no sobreviven 48-72 horas, tiempo necesario para la diferenciación terminal o de cambio. Una evidencia de esta probabilidad viene de los estudios de Saxon et.al, quien mostró que los linfocitos B de un grupo de pacientes con IDVC, además de estar disminuidos en sangre circulante, expresaban gran cantidad de antígeno Fas y una disminución de CD38, molécula altamente expresada en células B de centros germinales, que actúa como un inhibidor de la apoptosis<sup>20</sup>.

Las células B de memoria son el subtipo de células indispensables para la protección contra bacterias encapsuladas y éstas necesitan el microambiente esplénico para su generación y supervivencia. En este estudio, se encontró que en ausencia del bazo, las llamadas células B de memoria son indetectables en la sangre, y esto ocurre en niños y en pacientes con IDVC<sup>13,64</sup>.

Las señales liberadas tras el entrecruzamiento del CD40 en células B son fundamentales para la producción efectiva de anticuerpos, por lo que la expresión de su ligando natural, el CD40L, ha sido estudiada en LT activados

de pacientes con IDVC, observándose que en un porcentaje de ellos hay una disminución o ausencia del CD40L en la membrana<sup>65</sup>.

En otro grupo de pacientes (10 con IDVC y 10 controles sanos) se observó una alteración de la regulación de CD70 y CD86 en el grupo con menor número de células B de memoria con cambio de isotipo (IDVC tipo I)<sup>63</sup>.

Otros defectos que han sido descritos en las células B de los pacientes con IDVC son:

- Una disminución en la expresión de CD21 (molécula CR2, conocida como receptor del VEB) en células B, y ausencia de marcadores de activación.
- Defectos en la activación por la vía de la proteína kinasa C (Pkc) con ausencia de cambios en la membrana plasmática tras la estimulación por esta vía.
- Defectos en monocitos; al deplecionar las células mononucleadas de 2 pacientes con IDVC antes del cultivo se consiguió aumentar la respuesta proliferativa de células T a mitógenos como PHA (Phytohemaglutinina) y Con-A (Concavalina A). Otros estudios han demostrado una mala producción de Igs *in vitro* por las células B de IDVC, la cual se corrige al sacar los monocitos del cultivo. Los monocitos de pacientes con IDVC generaron significativamente mayor cantidad de especies de oxígeno reactivo, seguidos de estimulación. Asimismo, en estos pacientes, una mayor proporción de monocitos activados expresaron IL-12 al compararlos con controles normales. También es probable que los monocitos de pacientes con IDVC produzcan otras citocinas inflamatorias, además de la IL-12, en exceso<sup>66</sup>.
- El factor de crecimiento de las células B (BCGF: B cell growth factor) de peso molecular alto falló para provocar la proliferación de las células B de 15/16 pacientes con IDVC, a pesar de una expresión normal de su receptor. La respuesta al de bajo peso molecular fue normal<sup>13</sup>.

La expansión y diferenciación terminal de células B no se produce en ausencia de la señal apropiada de células T estimuladas por antígeno, y la consecuencia puede ser un defecto en la producción de anticuerpos, característica de la IDVC<sup>67</sup>.

## **b) Defectos en células T**

Muchos de los trabajos recientes han enfocado su atención en las células T, suponiendo un defecto en la interacción de estas células con los LB. Los defectos que se han descrito en las células T incluyen: activación y proliferación disminuida, inadecuada producción de citocinas, expresión defectuosa de varias moléculas de superficie, sugiriendo algunas anomalías en la señal del receptor de células T (TCR), disminución en la generación de células T de memoria antígeno específicas y aumento de la función supresora de las células T<sup>63</sup>.

La respuesta alterada de células T a la estimulación con antígenos de memoria (aproximadamente entre 50 y 60%)<sup>68</sup> puede deberse a un defecto de las células T CD4+, subpoblación linfocitaria principalmente responsable de la respuesta a antígenos de memoria. Asimismo puede haber un defecto de transducción de la señal, asociada a la activación de células T mediada por el TCR, que podría explicarse por un defecto a nivel de las células presentadoras de antígeno (CPA), así como una inadecuada toma y/ o procesamiento de antígeno exógeno por las CPA o anomalías funcionales de las moléculas del MHC clase II, produciendo una unión débil o inestable de antígeno peptídico a MHC clase II, llevando a una activación dañada de la célula T antígeno específica con fenotipo CD4+<sup>62</sup>.

La activación defectuosa de las células T tras la estimulación con anti-CD2, superantígenos o anticuerpos anti-TCR, sugiere un defecto en la señalización a través del TCR, ya que se ha observado una expresión intracelular de tirosin kinasa alterada tras su estimulación<sup>66</sup>.

Las células T producen una cantidad reducida de IL-2, a nivel del mRNA y de la proteína, en respuesta a una variedad de estimulantes como la PHA, superantígenos (enterotoxina streptococo B, [SEB]) o anti-CD2. Este defecto puede ser atribuido a anomalías en las células T, ya que generalmente tanto el índice CD4/CD8 como el número de células T circulantes son normales. Las anomalías de las células T son: anergia cutánea,

disminución de la proliferación linfocitaria y reducida producción y/ o expresión de IL-2, 4, 5 y 10, en respuesta a antígenos o mitógenos, sugiriendo un defecto de señalización temprana tras la estimulación celular vía el receptor de la célula T o TCR<sup>69</sup>.

Se ha descrito un grupo de pacientes con disminución de células T CD4+ que también manifiestan un número disminuido de células B, esplenomegalia, aumento de INF- $\gamma$ , neopterinina y  $\beta$ 2 microglobulina<sup>20</sup>, igual que en los pacientes con granulomas.

Las células T de los pacientes con IDVC (principalmente las formas mas graves) expresan marcadores de activación, con elevada proporción de células HLA-DR (antígeno leucocitario humano de clase II) positivas y expresión normal de CD25 (a pesar de niveles séricos de CD25 soluble aumentados)<sup>66</sup> y disminución de las poblaciones CD45RA+ y CD8+CD28+.

### **c) Células Presentadoras de Antígeno:**

En 7 pacientes con IDVC se estudió la capacidad de presentación de antígeno, en conjunción con las moléculas MHC de clase II, a las células T CD4+, de monocitos de sangre periférica y células B transformadas, comprobándose que no estaba alterada. Por lo tanto, se podrían descartar anomalías en la toma, procesamiento y re-expresión del antígeno, en asociación con las moléculas MHC clase II, en la superficie de las CPA, así como en la estructura de las moléculas MHC clase II, al menos relevantes para su función en la unión y presentación antigénica.<sup>62</sup>

### **d) Citocinas:**

Dentro de las hipótesis que se manejan en el estudio de la IDVC están las alteraciones de las citocinas, tratándose de encontrar un defecto en estas moléculas que explique la fisiopatología de esta enfermedad. El defecto de las citocinas no es limitado a la IL-2, sino también al INF- $\gamma$ , IL-4 o IL-5, que se han

encontrado disminuidas en las células T estimuladas de pacientes con IDVC. En cuanto al  $\text{INF-}\gamma$ , el defecto puede ser secundario a un defecto en la producción de  $\text{IL-2}$ <sup>20</sup>.

La  $\text{IL-2}$  es un potente inductor de la proliferación y diferenciación de células B y su defecto podría contribuir a las anomalías halladas en las células B de los pacientes con IDVC. Esta hipótesis se apoya en el estudio de sobrenadantes de células de pacientes con IDVC, estimuladas con PHA (con bajos niveles de  $\text{IL-2}$ ), los cuales fallan en su capacidad para apoyar la secreción de Igs por células B, normalmente activadas con SAC (Staphylococcus aureus Cowan I)<sup>67</sup>. El receptor de  $\text{IL-2}$  ( $\text{CD25}$ ) es expresado normalmente en ambas células T y B y su expresión está aumentada en la infección crónica<sup>13</sup>.

Los niveles de  $\text{IL-3}$  en la IDVC son variables. La producción de  $\text{IL-4}$  está probablemente reducida y la  $\text{IL-5}$  se puede encontrar normal o reducida. El rol exacto de estas dos últimas interleucinas, a nivel de la diferenciación de las células B, es controvertido, pero su producción deficiente en pacientes con IDVC puede afectar la diferenciación de las células B<sup>67</sup>. La  $\text{IL-6}$  derivada de los monocitos es una co-señal necesaria para la mitogénesis de células T y se encuentra elevada en el suero de los pacientes con IDVC<sup>13</sup>, pero también está aumentada en la infección. La expresión de  $\text{IL-9}$  tras estimulación está reducida. La producción de  $\text{IL-10}$  es normal o disminuida<sup>70</sup>. La producción de  $\text{IL-12}$  por monocitos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) está aumentada en la IDVC, comparada con los controles. La alteración del  $\text{INF-}\gamma$  es confusa, pero hay un aumento significativo en la proporción de células productoras de  $\text{INF-}\gamma$  tras activación, en pacientes con IDVC, comparada con los controles<sup>66</sup>, un elevado número de células T  $\text{CD4}^+$  expresando DR con expresión de Fas aumentada y una elevada apoptosis<sup>26</sup>.

La atractina, glicoproteína de 175 kDa que puede estar unida a la membrana o soluble, es un coestimulador para la respuesta de las células T a antígenos de memoria. Se ha observado una alteración en la regulación de la atractina en las células T de pacientes con IDVC y deficiencia de células T, durante el proceso de activación celular. Esta hipótesis explica que el defecto en las células T, en pacientes con IDVC, pueda ser por la pérdida de la sobreregulación de la

glicoproteína, afectándose cualquier paso posterior de la respuesta inmunitaria productiva, por alteración del tráfico celular y de la coestimulación en la fase inicial<sup>71</sup>.

El FNT- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral) aumenta la proliferación de células T-B y la diferenciación de células B tras una corta exposición. En un estudio de 24 pacientes con IDVC, se analizaron los niveles séricos del FNT- $\alpha$  y sTNFRs (receptores solubles del FNT), y se encontraron elevados, comparados con controles sanos; además fueron particularmente más elevados en un subgrupo de pacientes con IDVC caracterizado por: activación inmune crónica *in vivo*, números bajos de linfocitos CD4+ y esplenomegalia<sup>72</sup>.

### **e) Apoptosis:**

Para clarificar el mecanismo patogénico de la apoptosis de células T en un grupo de pacientes con IDCV, primero se investigó la vía Fas/FasL ya que la señalización a través del Fas juega un rol central en la inducción de apoptosis, especialmente en las células T activadas crónicamente, ayudando a terminar la respuesta inmunitaria iniciada. Sin embargo, no se pudo demostrar ninguna diferencia entre la expresión de Fas en células T de pacientes con IDVC y sujetos sanos<sup>69</sup>.

### **f) Estrés oxidativo**

La producción excesiva de especies de oxígeno reactivas (ROS), que puede ocurrir en el caso de infecciones recurrentes, es comúnmente referida como estrés oxidativo. Los niveles de micronutrientes antioxidantes han sido estudiados en casos de inmunodeficiencia y cáncer. Revisando el estado oxidativo en la IDVC se encontró una disminución de la capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo con las siguientes alteraciones: a) disminución significativa de los niveles plasmáticos del ubiquinol, sin reducción significativa de retinol y  $\alpha$ -tocoferol. b) bajos niveles de antioxidantes, por ejemplo: ubiquinol



(Q10), que en forma parcial puede contribuir a la alta susceptibilidad a infecciones y alteraciones neoplásicas en los pacientes con IDVC<sup>73</sup>. En un subgrupo de pacientes con IDVC, caracterizado por una activación inmunitaria persistente *in vivo*, se encontraron niveles altos de homocisteína reducida en plasma, y estos correlacionaron significativamente con altas concentraciones de un producto de peroxidación lipídica (malonaldehído plasmático alto), y bajos niveles en plasma de vitamina E. De acuerdo a esto se concluyó que los niveles altos de homocisteína reducida en plasma son un marcador de aumento del estrés oxidativo<sup>74</sup>. Se ha delineado un subgrupo específico de pacientes con IDVC (CVI<sub>Hiper</sub>), caracterizado por una activación inmunitaria persistente *in vivo*: el número de linfocitos T CD4+ está reducido en sangre periférica y hay un aumento en la incidencia de esplenomegalia, comparado con otros pacientes con IGIV (CVI<sub>norm</sub>). En este estudio se encontró que los pacientes con IDVC se caracterizan por un aumento de la peroxidación lipídica en plasma, hallándose niveles marcadamente disminuidos de los antioxidantes liposolubles  $\beta$ -caroteno y vitamina E en un subgrupo de pacientes con IDVC

(CVI<sub>Hiper</sub>). Estos hallazgos apoyan la noción de que el estrés oxidativo aumentado es una característica importante en este subgrupo de pacientes con IDVC<sup>75</sup>. Hasta aquí se mantiene el interrogante sobre los cambios metabólicos: son simples manifestaciones del daño causado por la ID a largo plazo o son éstos los que comprometen la función inmunitaria.

#### **g) Otras moléculas involucradas:**

En los últimos 2 años se han identificado 4 defectos monogénicos asociados a la IDVC: 1) ICOS, 2) TACI, 3) BAFF-R y 4) CD19. Estas moléculas cobran importancia debido a que forman parte de una de las señales necesarias para la recombinación del cambio de clase en los linfocitos B. En dicho proceso la primera señal es dada por las citocinas y la segunda por algunos miembros de la familia del receptor del TNF expresados en células B, que incluyen CD40, TACI y BAFF-R, miembros de una superfamilia de genes que transducen

señales clave para regular tanto la supervivencia como la apoptosis de las células inmunitarias.

### 1) ICOS:

El ICOS (“Inducible costimulator”), un miembro de la familia CD28 / CTLA4, fue descrito en 1996. Tiene un rol en la activación y proliferación de las células T, así como en la inmunidad humoral, crítico para mediar el CD40, combinando la clase de anticuerpo y jugando un rol protector en la inflamación.

El gen que codifica ICOS humano tiene 5 exones y está localizado en el cromosoma 2q33-34, misma región que los genes para CD28 y CTLA-4. El 24% de la secuencia de aminoácidos es idéntica a la del CD28, 17% a la del CTLA-4 y 72% a la del ICOS de ratón. El ICOS se expresa en linfocitos T activados, líneas Th2, algunos timocitos y ciertas células tumorales. En 1999 se descubrió el ligando de ICOS (B7h, ICOSL), glicoproteína de membrana tipo I, de 302 aminoácidos (humana). Se expresa en líneas de células B, subpoblaciones de linfocitos B no estimulados, algunas células dendríticas, monocitos activados y otros tejidos no linfoides. La estimulación *in vitro* vía ICOS aumenta la proliferación de los linfocitos T, la secreción de citocinas, incluyendo IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF [Factor estimulante de granulocitos y macrófagos], INF- $\gamma$  [Interferón] y TNF- $\alpha$  [Factor de necrosis tumoral]) y la expresión de CD40L. Sin la coestimulación de ICOS, se favorece la secreción de INF- $\gamma$  y disminuye la secreción de citocinas promotoras de diferenciación Th2. *In vivo*, ICOS es necesario para el desarrollo de los centros germinales y la producción óptima de anticuerpos: IgG1, IgG2a e IgE. Además, el bloqueo de ICOS aumenta ciertas reacciones mediadas por células Th1. Estos datos sugieren que ICOS participa en la diferenciación de células Th2, aunque otros datos muestran su importancia en algunas respuestas TH1. El ICOS también participa en el desarrollo de enfermedades alérgicas y autoinmunes y en el rechazo de aloinjertos. Los estudios en animales (ratones deficientes en ICOS) han mostrado una respuesta de anticuerpos defectuosa frente a antígenos T-dependientes, el cambio de clase de inmunoglobulina reducido, y una mayor susceptibilidad a desarrollar encefalomielitis autoinmune experimental. Estos

datos sugieren que el ICOS juega un papel protector frente a enfermedades inflamatorias autoinmunes.

Un grupo alemán ha descrito la ausencia de expresión de ICOS en 4 pacientes con hipogammaglobulinemia (grupo I de la clasificación de Freiburg), pertenecientes a dos familias no emparentadas que tenían el mismo defecto genético, una delección de los exones 2 y 3 del gen que codifica ICOS. La expresión de CD69, CD154, CD25, IL-2, IL-4, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-13 tras estimulación fue normal. La alteración en ICOS se describe con un patrón de herencia autosómico recesivo en el cual los pacientes no pueden generar o producir células B de memoria en números normales, ni niveles de inmunoglobulinas adecuadas, y conduce a un cuadro clínico parecido a la IDVC<sup>76,78</sup>. Las mutaciones en ICOS son responsables del defecto en un subgrupo de pacientes con IDCV, con problemas en la co-estimulación. Este defecto puede llevar al descubrimiento de futuros genes involucrados en la IDVC en esa familia de genes, potenciando blancos terapéuticos<sup>76</sup>.

En resumen, el ICOS es una molécula que interviene en la respuesta de linfocitos activados, en la diferenciación, y en la fase efectora de las respuestas de linfocitos T así como en la cooperación de células T-B. La participación de ICOS en el control de las respuestas inmunitarias normales y patológicas debería seguir analizándose en trabajos futuros<sup>77</sup>.

## 2) TACI

Los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR-like) son miembros de una superfamilia de genes, que transducen señales importantes para la regulación, tanto de la supervivencia, como de la apoptosis de las células del sistema inmunitario<sup>29</sup>. El BCMA (B-cell maturation protein A, *TNFRSF17*) y el TACI (transmembrane activator and CAML interactor, *TNFRSF13B*) comparten la capacidad de unirse a dos ligandos: el BAFF (TNF ligands B-cell activating factor, *TNFSF13B*) y el APRIL (a proliferation-inducing ligand, *TNFSF13A*). Un tercer receptor *BAFFR* (*BAFF receptor*, *TNFRSF13C*) se une selectivamente al BAFF. La estructura de estos receptores se diferencia de la de otros miembros

de la superfamilia de TNFR en: 1) Los tres receptores son proteínas transmembrana tipo III, carecen de un péptido a diferencia de las del tipo I que son las más frecuentes, 2) Los típicos TNFR presentan de 3 a 6 dominios ricos en cisteína (CRDs), mientras que el TACI posee dos CRDs (parece ser que solamente uno es necesario), BCMA un CRD y BAFFR uno parcial<sup>79</sup>.

El gen *TNFSF13B* (TACI)<sup>82</sup> está situado en el cromosoma 17p11.2 y tiene cinco exones. El TACI se expresa en células B “naive”, en células B CD5+, en linfocitos B de memoria CD27+, y en células B activadas. Transduce las señales vía el TRAF2,5,6, NF-κB, CAML, NFAT y AP-1. Los ratones TACI -/- presentan: una expansión e hiperreactividad de las células B, autoinmunidad, linfoproliferación y una respuesta alterada T-independiente tipo II. En 2005 se describieron 6 diferentes mutaciones, homocigotas y heterocigotas, en el *TNFSF13B* de pacientes con IDVC, y con DIgA, esporádicos y con componente familiar. La herencia presente es autosómica recesiva y dominante. Se han descrito dos “hotspots” (C104R y A181E); el C104R corresponde a una cisteína muy conservada (CRD) y el A181E a la región transmembrana del TACI. El fenotipo de los pacientes es variable en los casos descritos, y difieren del fenotipo descrito en los ratones TACI -/-. Los humanos no presentan manifestaciones autoinmunitarias graves, ni linfoproliferación, ni expansión de los linfocitos B en sangre periférica<sup>79,80,82</sup>.

El TACI se expresa en células B periféricas con la mayor intensidad observada en el subtipo de células B CD27+, al igual que en células B naive (virgen) y células B CD5+<sup>79</sup>. Grimbacher y Geha identificaron mutaciones en el gen que codifica la molécula TACI (*TNFRSF13B*) en un 10-15% de casos con IDVC, así como en una pequeña fracción de casos con DIgA<sup>80,82</sup>.

Las mutaciones en TACI se asocian a defectos en la generación y/o mantenimiento de las células B de memoria con cambio de isotipo y células plasmáticas, causando hipogammaglobulinemia. Este defecto se manifiesta más plenamente en la respuesta independiente de células T, que conduce a infecciones bacterianas en algunos individuos afectados, mientras que la

inmunidad dependiente de células T al parecer está intacta. En estos individuos, el número de células B es normal o discretamente reducido, con una reducción variable en el número de células B de memoria CD27+ en muchos pacientes, y los niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas séricas alterados. La producción de anticuerpos en respuesta a la vacuna de neumococo esta discretamente disminuida; por lo tanto, estos pacientes, al igual que los IDVC (sin etiología) presentan infecciones recurrentes por bacterias encapsuladas como *Pneumococo* y *Haemophilus*<sup>79,80</sup>.

### 3) BAFF y BAFFR

El gen *TNFSF13B* (BAFF)<sup>79,83</sup> está localizado en el cromosoma 13q34, tiene 6 exones y codifica 285 y 152 aminoácidos para la proteína unida a membrana y soluble, respectivamente. Se expresa en células presentadoras de antígeno, en linfocitos T, neutrófilos y células estromales de médula ósea. Su expresión es estimulada por citocinas como: IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 y CD40L. La forma activa es un heterotrímero. Los ratones BAFF-/- presentan un defecto grave en el desarrollo de las células B, por lo que la respuesta de anticuerpos T-dependiente y T-independiente están gravemente alteradas. El gen *TNFRSF13C* (BAFFR) está localizado en el cromosoma 22q13.1-13.31 se expresa en los linfocitos B y en una subpoblación de linfocitos T activados. Las células plasmáticas presentan una baja expresión en membrana. Los ratones BAFFR -/- presentan un fenotipo grave parecido al de los ratones BAFF-/-, con alteraciones en la presencia de algunas subpoblaciones de células B, con un bloqueo a nivel de T2 y con una respuesta de anticuerpos T-dependiente deficiente. En 2004 se comunicó el primer caso, con una delección en homocigosis en *TNFRSF13C*, que afectaba a la región transmembrana del BAFFR en una familia con IDVC, y presentó herencia autosómica recesiva. La proteína APRIL (*TNFSF13A*)<sup>83</sup> presenta una homología del 50% con el BAFF. A diferencia del BAFF, que solamente se expresa de forma soluble, la expresión de APRIL se ha descrito en células presentadoras de antígeno, células T y en líneas celulares tumorales. Los ratones knock-out APRIL-/- presentan una respuesta de IgA alterada.

Además de su papel como factores de supervivencia de células B, estos BAFF/BAFFR interaccionan en la regulación de la expresión de CD21 y CD23, en la diferenciación de células B en zonas marginales y en la coestimulación de células T *in vitro* e *in vivo*. El BAFFR se expresa en las células B CD19+, y un subtipo de células T activadas de sangre periférica (en humanos). Las células B de memoria CD27+ también lo expresan. Este receptor activa la cinasa inductora de NF- $\kappa$ B, que conduce a la degradación de p100 y la generación de p52<sup>79,83</sup>.

#### 4) CD19

La proteína CD19 con CD21, CD81 y CD255 forma parte de un complejo en la membrana de las células B maduras. Junto con el receptor de antígeno de las células B, este complejo transmite una señal a la célula B que disminuye el umbral de activación por el antígeno. La molécula de superficie CD19 aparece de forma temprana durante el proceso de diferenciación de la célula B en la médula ósea, y permanece en la célula hasta su diferenciación a célula plasmática<sup>84</sup>.

Este año se ha descrito una mutación en el gen CD19, como causa de hipogammaglobulinemia, en la cual la respuesta de las células B maduras a la estimulación antigénica es defectuosa. Esta deficiencia de CD19 no altera la diferenciación de precursores de células B en la médula ósea e incluso las células B CD19- pueden someterse a diferenciación, aunque menos eficiente que las células CD19+, como se ha observado en los ratones knockout para CD19. No obstante, los 4 pacientes descritos en esta publicación tienen células B maduras normales<sup>84</sup>.

Los niveles de CD19 fueron indetectables en un paciente y disminuidos en otros 3; los niveles de CD21 estuvieron disminuidos mientras que los niveles de CD81 y CD255 fueron normales; los números de células B de memoria CD27+ y células B CD5+ estaban disminuidos. En estos pacientes la transcripción de IgG e IgA con hipermutación antígeno dirigida existía en grados variables, indicando que las células B deficientes en CD19 son, en principio, capaces de

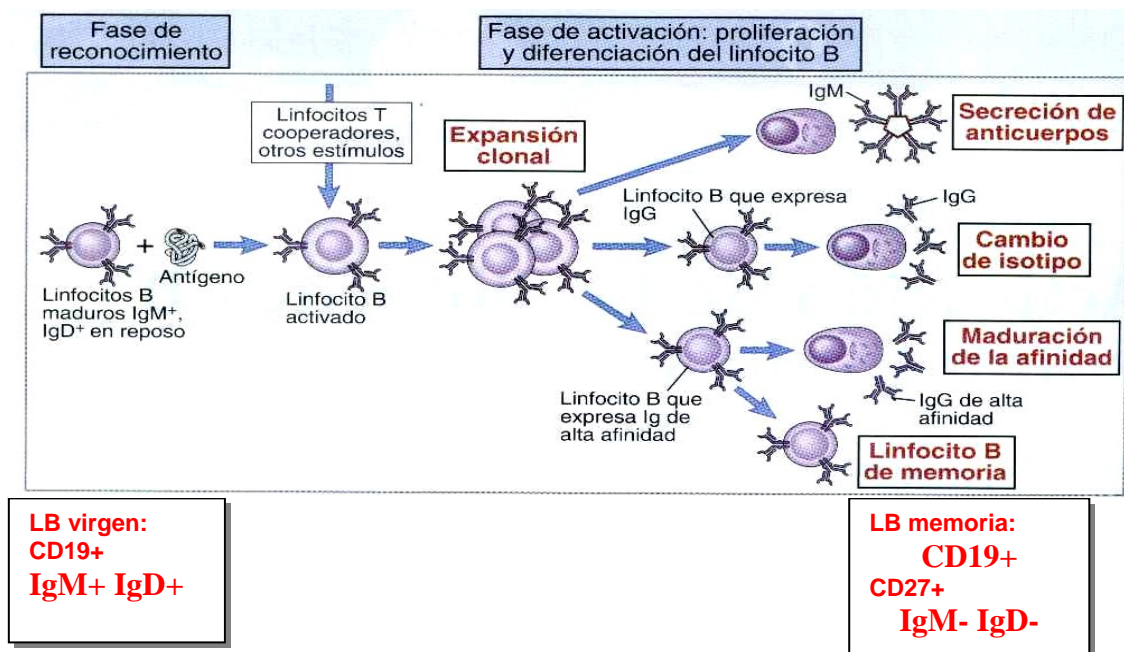
someterse a diferenciación dependiente de antígeno, aunque con eficacia reducida<sup>79,84,85</sup>.

### 1.3.6 Clasificación de los pacientes con IDVC en base a los linfocitos B

Ha habido muchos intentos de clasificar los pacientes con IDVC, pero ninguna de estas clasificaciones es completamente satisfactoria, con respecto a explicar la heterogeneidad de la enfermedad. Una estrategia empleada por algunos investigadores para disminuir la diversidad, ha sido la clasificación en subgrupos, en función de sus características inmunológicas, y así una vez obtenida una cierta homogeneidad en las muestras, poder intentar elucidar la/ s posible/ s etiología/ s del síndrome. Algunas clasificaciones de la IDVC están basadas en la producción de anticuerpos en sistemas de cultivo o hallazgos clínicos y de laboratorios, pero éstos no son útiles para uso rutinario.

La clasificación propuesta por los grupos científicos de Freiburg (Alemania)<sup>86</sup> y Paris (Francia),<sup>87</sup> se basa en la cuantificación de las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria en sangre periférica, identificadas mediante citometría de flujo, utilizando como marcadores, anticuerpos anti-IgD y anti-CD27. La molécula CD27 pertenece a la familia de los genes del receptor de TNF, se expresa en un subgrupo de linfocitos B en sangre y ganglios linfáticos, y en la superficie de los linfocitos T circulantes<sup>88</sup>.

En el curso del desarrollo del LB virgen o *naive* (LB IgD+IgM+), que sale de médula ósea y sigue su proceso de maduración y diferenciación a célula plasmática o LB de memoria, en los tejidos linfoides secundarios, la mayoría de los linfocitos pierden la expresión de IgD e IgM de su superficie, **figura 3**.



**Figura 3.** La activación de la célula B se inicia por el reconocimiento específico del antígeno, que junto a otros estímulos, y la acción de los linfocitos T cooperadores, promueve la proliferación y diferenciación del clon específico de linfocitos B. Parte de la progenie de este clon sintetiza IgM, otras células sufren un cambio de isotipo para producir otras clases de Igs (p.ej., IgG) y otras, después de un proceso de maduración de la afinidad, persisten como células de memoria, las principales efectoras de la respuesta humoral secundaria. Modificado de **Abbas, 2002, p190, Fig 9-1.**

En la sangre periférica humana, los linfocitos B que expresan CD27 (LB CD27+) se subdividen en al menos dos grupos: LB que mantienen la expresión de IgD e IgM (LB CD27+IgD+IgM+) y LB que no la mantienen (LB CD27+IgM-IgD-)<sup>89,90</sup>. Los linfocitos B CD27+IgD-IgM- son los LB de memoria funcionales; es decir, son las células B que efectuaron el cambio de isotipo, y son capaces de producir inmunoglobulinas de todo tipo (IgG, IgA, e IgE), mientras que los LB CD27+IgD+IgM+ corresponden a los LB de memoria no funcionales, los que no han efectuado el cambio de isotipo, y sintetizan únicamente la IgM.

Según la proporción de subpoblaciones de LB de memoria (BM) en sangre periférica, definidas en base a la expresión de los marcadores IgD y CD27, es posible clasificar a los pacientes con IDVC en 3 grandes grupos:<sup>87</sup> (clasificación BM): 1.- **Grupo BM0**, pacientes sin LB de memoria (LB CD27-); 2.- **Grupo BM1**, pacientes con LB de memoria no funcionales (LB de memoria sin cambio



de isotipo, LB CD27+IgD+); 3.- **Grupo BM2**, pacientes con LB de memoria de ambos tipos (LB de memoria con cambio de isotipo, LB CD27+IgD- y LB de memoria sin cambio de isotipo LB CD27+IgD+) en una proporción igual a la población general sana.

Se observó una proporción superior de manifestaciones linfoproliferativas y granulomatosas en los pacientes afectados de IDVC que pertenecían al grupo BM0 (sin linfocitos B de memoria), y de esplenomegalia en los pacientes del grupo BM0 y BM1 (presencia de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo)<sup>87</sup>.

Bryant et al., clasificó a los pacientes de acuerdo a su capacidad para producir IgM, IgA e IgG *in vitro* con estimulación con Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) + IL-2 o anti-IgM + IL-2: El **grupo A** no producían ninguno de los isotipos de inmunoglobulinas *in vitro*, mientras el **grupo B** solo producía IgM, y en el **grupo C** los pacientes eran indistinguibles de los controles sanos produciendo cantidades normales de todos los isotipos *in vitro*, a pesar de bajos niveles séricos de inmunoglobulinas *in vivo*. Esta clasificación aún no está estandarizada, debido a que es una técnica laboriosa y costosa por ser una técnica *in vitro*<sup>91,92</sup>.

La clasificación de Freiburg está basada en la identificación de subpoblaciones de linfocitos B por citometría de flujo, definiendo dos grupos: el **grupo I** comprende pacientes con cambio a células B de memoria (CD27+ IgM- IgD-) inferior a 0.4% del total de linfocitos de sangre periférica, y el **grupo II** incluye los pacientes con número normal de células B de memoria con cambio (>0.4%). El grupo I puede ser subdividido de acuerdo al número de células B CD19+ CD21-: **Ia**, >20% y **Ib**, <20%. Esta clasificación se asocia a hallazgos clínicos como esplenomegalia y citopenias autoinmunes, principalmente en el grupo Ia. En el grupo Ib y II encontraron otros fenómenos autoinmunes como anemia perniciosa o vitíligo<sup>86</sup>.

### 1.3.7 Genética

El defecto molecular de la IDVC es desconocido en la mayoría de los casos. Se han estudiado la IDVC y el DlgA, considerándose que estas alteraciones pueden ser una condición alélica, con una expresión variable de un defecto común, habiendo evidencia que apoya dicha teoría<sup>3</sup>. Aunque la mayoría de los casos de IDVC son esporádicos, las formas familiares pueden ocurrir en aproximadamente 20 - 25% de los casos, y se caracterizan por presentar: patrones de herencia autosómica dominante y recesiva, evidencia de que otros miembros de la misma familia están afectados y una incidencia elevada de DlgA y autoinmunidad indicando que habría una cierta predisposición genética<sup>3,93,94</sup>. Algunos individuos pueden tener una disminución parcial de IgG (comúnmente IgG2 e IgG4), con o sin disminución de IgA, mientras el mismo paciente puede cambiar de DlgA a IDVC<sup>95</sup>. Hay varias publicaciones que indican que pacientes con DlgA, en algunas ocasiones, se acompañan de deficiencia de IgG2 e IgG4, y posteriormente progresan a panhipogammaglobulinemia<sup>36</sup>.

Los genes que juegan un rol importante en el control de la respuesta inmunitaria están localizados en el locus del MHC en el cromosoma 6<sup>96</sup>. Numerosos estudios casos-control de esta enfermedad han mostrado asociaciones con el HLA, sugiriendo la existencia de un locus o loci predisponente en esta región (designado *IGAD1*). Vorechovský, en su estudio, sugiere que la localización más probable de la mutación para la susceptibilidad de DlgA/ IDVC está en la parte telomérica de la región clase II o parte centromérica de la región clase III<sup>97</sup>. Se ha descrito susceptibilidad para la IDVC y el DlgA asociada a los haplotipos que portan los alelos, ya sea HLA-DR1-DR3 o DR7 y HLA-DQB1, que codifican a un aminoácido neutral (no-Asp), residuo 57 de la cadena DQβ. La homocigocidad de HLA clase II fue asociada con el riesgo de IDVC pero no con el DlgA<sup>94,98</sup>; pero esto aún no ha sido aceptado y aún hay consenso para aceptar la mutación/ gen *IGAD1*<sup>97</sup>. En los pacientes con haplotipo HLA-DR3-B8-A1, el riesgo de DlgA e IDVC parece alcanzar un 40% en sus hijos, y solo 5% en sus hermanos<sup>96</sup>. También, se reporta unión del fenotipo de la enfermedad a la región telomérica del cromosoma 5p en dos familias reportadas por Braig, et.al<sup>27</sup>.

La patogénesis de la ID humoral en familias con DIgA e IDVC, puede ser debida una causa ambiental o a un defecto genético en el linaje de las células B<sup>36</sup>. Debido a la heterogeneidad, unida a una alteración en la respuesta inmunitaria celular y humoral, Mullighan et.al, sugieren que el polimorfismo en múltiples genes inmunoreguladores podría determinar el fenotipo clínico de la IDVC. Por esta razón estudiaron la interacción de genes que codifican moléculas claves en la respuesta inmunitaria y polimorfismos, elegidos de acuerdo a sus efectos conocidos, y su asociación con el fenotipo clínico de la IDVC, encontrando que la interacción de los alelos en FNT (488A) e IL-10 (IL-10 a-t-a) confiere susceptibilidad a enfermedad granulomatosa<sup>66,99</sup>.

En 2006 Schäffer y cols, publicaron el análisis de un linaje genético, sugiriendo un locus para IDVC/DIgA en el cromosoma 16q, cerca del marcador DI6S518. Además existe el antecedente para 2 locus genéticos en el cromosoma 16 predisponiendo a enfermedades inmuno-relacionadas y complejas. Los genes NOD2/CARD15 en el 16q están mutados en algunos pacientes con enfermedad de Crohn, y en algunos tipos de enfermedades inflamatorias intestinales (EII), y el 16q parece ser un segundo locus para la EII. Tanto la IDVC como las EII son enfermedades complejas, en las cuales se han encontrado algunos genes susceptibles, pero la mayoría de los pacientes no tienen mutaciones en genes conocidos. Estos hallazgos permiten la identificación del locus predisponente de IDVC en 16q, y esto lleva a la identificación de algún gen susceptible para IDVC<sup>100</sup>.

### **1.3.8 DIAGNOSTICO DIFERENCIAL**

El diagnóstico diferencial de la IDVC se hace en base a la presencia de un fenotipo clínico (pacientes con infecciones sinopulmonares y gastrointestinales recurrentes, infecciones bacterianas graves por gérmenes capsulados, enfermedades autoinmunes, etc.) y un fenotipo inmunológico (descenso significativo de los niveles séricos de IgG e IgA asociados a niveles bajos o

normales de IgM, y una respuesta nula de anticuerpos)<sup>101</sup>. La hipogammaglobulinemia presente en los pacientes con sospecha de IDVC podría ser debida a otras etiologías, por lo cual, se habrían de descartar otros orígenes tanto secundarios (enteropatías con pérdidas de proteínas, síndrome nefrótico, enfermedad linfoproliferativa, infecciones virales, algunos fármacos, etc)<sup>101,102</sup>, como otros defectos primarios de anticuerpos (síndrome de Hiper-IgM, ALX o autosómica recesiva, etc)<sup>101,102,103</sup>. La existencia de casos atípicos,<sup>104,105,106</sup> junto con el solapamiento frecuente de fenotipos entre la IDVC y otras IDP, dificulta en algunas ocasiones un diagnóstico diferencial correcto. Por lo tanto, tras el diagnóstico diferencial se obtiene un “cajón de sastre” de pacientes con IDVC, cuya característica principal es la heterogeneidad (edad de presentación de los primeros síntomas, manifestaciones clínicas, alteraciones inmunológicas, etc). La variabilidad fenotípica presente entre estos pacientes podría ser consecuencia de la interacción de los factores genéticos, más los ambientales. Recientemente, se han descrito algunos defectos monogénicos que están relacionados con la etiología de la IDVC<sup>76,82,83,85</sup>, pero se estima que la frecuencia de la presencia de estos defectos en la población de pacientes no representa más de un 10 por ciento del total de individuos diagnosticados de IDVC. La hipótesis de un origen multifactorial del síndrome ha llevado a especular sobre el papel modulador de los polimorfismos de distintos genes sobre el fenotipo clínico, y entre los candidatos están algunas de las proteínas de la respuesta innata<sup>107</sup>.

### **1.3.9 TRATAMIENTO**

El tratamiento se basa en el reemplazo con gammaglobulina humana, a fin de aportar los anticuerpos de que carecen, antibiótico terapia en las infecciones y fisioterapia en los procesos pulmonares supurativos crónicos. El tratamiento continuado con gammaglobulinas humanas por vía intravenosa es el único capaz de prevenir la aparición de las complicaciones infecciosas, respiratorias y digestivas y de disminuir la incidencia de bronquiectasias, (ya que modula la función de las células T y B y retarda el deterioro de la función pulmonar). También es útil en los procesos autoinmunes, aunque no se ha obtenido

beneficio evidente en el resto de la patología. Antes del reemplazo con IGIV, la mayoría de los pacientes (84%) había tenido al menos un episodio de neumonía, y el 74% tuvo episodios recurrentes de neumonía<sup>24</sup>.

El tratamiento sustitutivo con gammaglobulinas en pacientes con IDVC deberá mantenerse de por vida, y no caer en el error de dejar de administrarlo por hallarse el enfermo en fase asintomática. En la actualidad, el tratamiento con gammaglobulinas humanas comerciales se puede administrar a una dosis de 0.2 a 0.6 gr/ kg/ cada 2-3 semanas, por vía intravenosa (soluciones 3-12%), intramuscular (poco eficaz) o subcutánea (soluciones 16%). Las dosis a administrar variarán en cantidad y tiempo, según la vía de administración, pero éstas se ajustarán en cada paciente, hasta conseguir unas concentraciones de IgG sérica superiores a 500 mg/dl y el control de la sintomatología clínica. El requerimiento puede variar en cada paciente, de acuerdo a la base de IgG y el metabolismo<sup>66</sup>.

Las infusiones con IGIV pueden estar asociadas a reacciones adversas de gravedad variable. Estas reacciones son usualmente leves y caracterizadas por dolor de espalda, cefalea, eritema, escalofríos y mialgias. Las reacciones anafilácticas graves son raras y algunas veces ocasionadas por anticuerpos anti-IgA<sup>66,108</sup>.

El riesgo de infección por VIH parece ser mínimo, porque este virus se elimina durante el proceso de manufactura, pero otros virus como el de la Hepatitis C (VHC) han causado problemas importantes en algunos pacientes (publicaciones anteriores)<sup>15</sup>. Se han descrito casos de enfermos de IDVC con hepatitis B y hepatitis C<sup>109</sup>, cuyo origen de la infección parece ser la infusión de plasma o gammaglobulina endovenosa contaminados.

Otros tratamientos indicados pueden ser: antibióticos, broncodilatadores y corticoesteroides inhalados, incluyendo la fisioterapia para los problemas pulmonares. En el caso de las alteraciones gastrointestinales pueden ser necesarias dietas especiales o incluso nutrición paraenteral. En las

enfermedades autoinmunes asociadas se incrementa la dosis de la IG, y se pueden indicar esteroides sistémicos y esplenectomía, según los hallazgos<sup>66</sup>. Cuando el daño pulmonar es muy importante, está indicado el trasplante pulmonar.

Se han realizado estudios en los cuales se ha tratado con IL-2r-PEG (IL-2 recombinante con polietilenglicol) a pacientes con IDVC, por vía subcutánea. La justificación de la aplicación de este tratamiento se basó en la existencia de un importante porcentaje de pacientes con una producción *in vitro* de IL-2 defectuosa, que quizás fuese la causa de los defectos celulares. Los pacientes presentaron una mejoría *in vitro* de la función de células T y en algunos casos hubo un aumento de la producción de anticuerpos de *novo*<sup>110,111</sup>.

Otra opción de tratamiento ha sido el ácido retinoico 13-cis, un agente que puede inducir la diferenciación de células B *in vitro*<sup>11,66</sup>. Los retinoides son derivados de la vitamina A con efectos importantes en el desarrollo celular: aumentan la respuesta proliferativa a mitógenos y aumentan la producción de las inmunoglobulinas por parte de las células B. El análogo de la vitamina A, retinol 9-cis, provoca un aumento de la síntesis de IgM pero no de IgG por células B normales de IDVC en cultivo. Los niveles séricos de vitamina A se encontraron disminuidos en pacientes con IDVC y un suplemento de vitamina A produjo un aumento de los niveles séricos de IgA e IL-10 así como una caída significativa de TNF- $\alpha$  y de neopterin en suero.

Vacunación: El uso de cualquier vacuna con virus vivos está contraindicada en estos pacientes, principalmente la de poliovirus. El uso de vacunas con microorganismos muertos es probablemente inefectivo, teniendo en cuenta las alteraciones halladas en la producción de anticuerpos, células B de memoria y respuesta de células T<sup>66</sup>.

Cirugía: se usa para tratar enfermedades pulmonares localizadas (bronquiectasias) y es beneficiosa según un estudio de pacientes con hipogammaglobulinemia, seguido entre 3.5 a 5 años. La esplenectomía se usa para tratar la PTI o la enfermedad granulomatosa<sup>66</sup>.

### 1.3.10 PRONÓSTICO

Hacer un diagnóstico precoz es determinante para obtener un mejor pronóstico, ya que hay considerable morbi-mortalidad (aproximadamente de un 27%)<sup>19</sup> debida al retraso en el diagnóstico e inicio de tratamiento, el cual determina si se desarrollará daño pulmonar estructural. Cuando el retraso es mayor de 2 años, el riesgo es significativamente mayor, de acuerdo a un estudio reportado por Thickett et. al, que halló una media de retraso en el diagnóstico de 2,5 años en los niños y de 5,5 años en adultos<sup>17</sup>. Así pues, el éxito o fracaso del tratamiento estará en función de:<sup>11,18,19,35</sup>

- a) El diagnóstico temprano de la enfermedad,
- b) La instauración temprana y permanente del tratamiento a dosis suficientes,
- c) La presencia de lesiones crónicas antes de su instauración.

Las principales causas de muerte son el linfoma y las infecciones pulmonares crónicas (cor pulmonare). En un estudio de Cunningham-Rundles se calculó la sobrevivencia a los 20 años después del diagnóstico de IDVC que fue del 64% en los varones (esperada de 92%) y de 67% en las mujeres (esperada de 94%). Estos datos indican una mortalidad más precoz en los pacientes masculinos que en las mujeres. Los factores asociados a la mortalidad incluyen: niveles de IgG sérica, pobre respuesta a PHA y número de células B reducidas<sup>15,17,19</sup>.

La IDVC es una enfermedad de larga vida que no remite espontáneamente. Se trata de una condición que puede llevar a infecciones graves y enfermedad pulmonar irreversible, aunque hay algunos casos en la literatura en que la

IDVC se corrigió en pacientes infectados por el VIH. La IGIV es beneficiosa para las infecciones, pero desafortunadamente los beneficios no se extienden a otras manifestaciones de la enfermedad, como algunas AI o al riesgo de desarrollar neoplasias, principalmente linfomas<sup>20</sup>.

Aunque el tratamiento con la IGIV ha disminuido la frecuencia de infecciones pulmonares, las complicaciones respiratorias son todavía responsables de un tercio de la mortalidad en la IDVC. Kainulainen et.al demostró una progresión silenciosa de bronquiectasias en 5/14 pacientes mediante TCAR, monitorizados durante 3 años, a pesar del mantenimiento de niveles de IgG pre-infusión de 5 g/l o mas; por lo tanto, además de la IGIV deben de ser consideradas otras medidas como la antibióticoterapia, fisioterapia y función pulmonar controlada<sup>17,23</sup>.

#### **1.4 AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X (XLA, ENFERMEDAD DE BRUTON)**

Es una inmunodeficiencia primaria humoral, caracterizada por la ausencia de linfocitos B maduros en sangre periférica, falta de producción adecuada de inmunoglobulinas, y antecedentes familiares ligados al cromosoma X. Fue descrita por primera vez por Bruton en 1952<sup>3</sup>. Los varones afectados presentan una deficiencia de todos los isotipos de inmunoglobulinas y sufren de infecciones bacterianas recurrentes<sup>113</sup>, principalmente meningitis y neumonía que se presentan a edad temprana. Los criterios para el diagnóstico incluyen la incapacidad para producir anticuerpos, resultando en concentraciones extremadamente bajas de todos los isotipos de inmunoglobulinas, una importante disminución en los linfocitos B circulantes (usualmente < 5/1000 linfocitos) y ausencia de células plasmáticas en los nódulos linfáticos y médula ósea. El número y función de linfocitos T (incluyendo la inmunidad celular) son normales. Las mujeres heterocigotas son asintomáticas, debido a que se produce una inactivación, no al azar, del cromosoma X que lleva el gen mutado en las células B<sup>114</sup>.



El defecto principal es debido a un bloqueo en el desarrollo de las células B. La base molecular de la enfermedad es conocida desde 1993, cuando se relacionaron las mutaciones en el gen que codifica la tirosina cinasa citoplasmática denominada Btk (Bruton tirosina cinasa), de 659 aminoácidos y un peso molecular de 77 kDa, localizado en el cromosoma Xq22<sup>114</sup>, como causantes del bloqueo en la diferenciación del linfocito B, a nivel de célula pre-B, por una expresión defectuosa de la enzima Btk<sup>115</sup>.

El análisis mutacional del gen de la BTK se suele hacer por análisis conformacional del polimorfismo de simple cadena (SSCP) y posterior secuenciación directa del exón afectado. Este método tiene una sensibilidad de aproximadamente un 90%. La disponibilidad de anticuerpos específicos anti-Btk ha permitido la aplicación de nuevas técnicas diagnósticas (western blot, citometría de flujo) que estudian la expresión de la proteína. Éstas son rápidas y tienen una buena sensibilidad (aproximadamente de 90%)<sup>116,117</sup>. Cerca del 10% de pacientes con agammaglobulinemia no tienen mutación en la Btk y cerca de la mitad de ellos son mujeres, siendo una enfermedad recesiva. En estos pacientes existe un bloqueo en el desarrollo de los linfocitos B en el estadio de precursor de células B, por lo que hay pocos o ningún precursor de células B<sup>95</sup> y pocas células B detectables en la periferia. En pacientes previamente etiquetados de IDVC o deficiencia de subclases de IgG se encontraron mutaciones en la Btk; también se encontraron alteraciones en la expresión y la actividad de la Btk.<sup>118</sup>

El diagnóstico diferencial se debe realizar en pacientes con síndrome de hiper IgM ligado a X, y con formas leves de ALX con niveles de LB disminuidos y donde las Igs estén parcialmente disminuidas. Otro diagnóstico diferencial puede ser el síndrome linfoproliferativo ligado a X<sup>3</sup>.

El tratamiento para esta inmunodeficiencia es el reemplazo con IGIV o subcutánea de por vida; además del uso de antibióticos, en caso de ser

necesario<sup>115</sup>. En este caso la gammaglobulina IM no está indicada, ya que no se alcanzan niveles séricos adecuados.

### **1.5 SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO LIGADO AL CROMOSOMA X (XLP, ENFERMEDAD DE DUNCAN).**

Es una inmunodeficiencia primaria que se manifiesta como un fenómeno de inmunodisregulación después de la exposición al VEB (virus de Epstein Bar); aunque un 10% de los pacientes tiene serología negativa y no hay evidencia genómica de la infección<sup>119,120</sup>.

Los pacientes pueden presentar dos fenotipos clínicos: el más frecuente y de peor pronóstico se produce cuando hay infección por el VEB, mientras que un porcentaje menor de los pacientes no están infectados por el VEB y presentan una sintomatología más leve. Las principales manifestaciones clínicas son: mononucleosis infecciosa (58%), hipogammaglobulinemia (31%) y linfoma de células B (30%, es la secuela más común). Hay otras manifestaciones menos frecuentes como la anemia aplásica, la vasculitis y la granulomatosis linfomatoide pulmonar<sup>119</sup>.

El gen subyacente en el XLP es SH2D1A (gen 1A que contiene el dominio SH2), expresado en células T y NK (Natural Killer) y que codifica una pequeña proteína adaptadora con un único dominio SH2. El SH2D1A se une al SLAM (CD150), 2B4 (CD244) y otros receptores linfoides<sup>121</sup>.

El gen responsable de la enfermedad fue descrito en 1998 y está localizado en el cromosoma Xq25, formado por 4 exones. La molécula que codifica es una proteína llamada SAP (proteína asociada a la molécula señalizadora de activación linfocítica), que consta de 128 aminoácidos y tiene un sólo dominio SH2 con una pequeña cola terminal de 25 aminoácidos<sup>122</sup>.

La SAP es una proteína de 15 kDa que es expresada en las células T (no se ha encontrado ni en células B ni en monocitos). Actúa participando en la regulación de las interacciones entre las moléculas de la superficie celular T y B. El déficit de SAP en pacientes con XLP empeora la señal de transducción de SLAM (molécula señalizadora de activación linfocítica) y 2B4, conduciendo a una disminución en la producción de INF- $\gamma$  por la células T colaboradoras y disminución de la citotoxicidad de las células NK. Además de una señal de transducción anormal, se pueden producir alteraciones en las funciones CD4 y CD8, contribuyendo a la incapacidad del sistema inmunitario para controlar las infecciones por el VEB, y probablemente otros virus<sup>106</sup>. No son conocidos los mecanismos celulares que llevan a la expansión de las células B<sup>119</sup>.

Las teorías propuestas acerca de la función de la SAP son: La SAP puede actuar como una molécula en la transducción de señales de activación en células T (resultando por ejemplo en producción de INF- $\gamma$  o incremento en la actividad citolítica), tras el contacto de células T-B (en parte mediado por interacción homóloga SLAM-SLAM), y en células NK. Como 2B4 se une a CD48 a la superficie de células B infectadas por VEB y la SAP también, puede actuar como una molécula inhibitoria, por competición con SHP2 fosfatasa unido al SLAM en células T. Se ha encontrado que la molécula 2B4 está asociada a SAP en células NK, y posiblemente en células T activadas induciendo activación (citotoxicidad), mientras que en ausencia del SAP, media señales inhibitorias<sup>95</sup>.

El diagnóstico se realiza por la detección de la mutación en el gen que codifica la proteína SAP. En un 35% de los casos no se han encontrado mutaciones por lo cual no debe descartarse la enfermedad, ya que hay estudios que indican que puede estar involucrado un segundo locus genético, como el XIAP (Proteína Inhibidor de Apoptosis ligado a X). Esta proteína es un potente inhibidor de la actividad de la caspasa (Latour, et.al. Conferencia de Enfermedad linfoproliferativa ligada a X, Budapest-2006), correspondiendo al XLP2 en un 20% de estos pacientes<sup>123</sup>. En algunos pacientes, a pesar de la

ausencia de la mutación en los exones de este gen, la proteína SAP no se ha encontrado y en estos casos el análisis de la expresión de la proteína SAP es una alternativa para realizar el diagnóstico molecular<sup>95</sup>. Éste ya se ha aplicado en otras IDP como XLA y WAS. El estudio de la expresión de la proteína puede ser vital en casos con sospecha de XLP, donde el diagnóstico es difícil y su rapidez tiene importantes implicaciones terapéuticas. En esta ID, el tratamiento de elección es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, idealmente antes de la instalación de la infección por el VEB<sup>119,124</sup>.

## 1.6 DÉFICIT DE LCK

La pobre casuística de pacientes con déficit de lck define dos fenotipos clínicos diferenciados: aquellos que presentan una patología grave de inmunodeficiencia severa combinada y cuyo único tratamiento eficaz es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, y los que presentan un fenotipo menos grave con linfopenia selectiva de linfocitos T CD4+ e hipogammaglobulinemia<sup>125,126</sup>.

La Lck es una tirosina cinasa de 56 kD perteneciente a la familia Src, se expresa en todas las etapas de maduración de los timocitos, y está asociada con el dominio citoplasmático del CD4 y CD8<sup>127</sup>. La lck parece ser mas vital para el desarrollo de células T (la señal TCR normal requiere ambas lck y ZAP70 y ambas han sido implicadas en jugar un rol vital en la selección tímica). La afinidad del complejo TCR-CD3 para el antígeno-CMH I/II es baja, estabilizándose esta unión por medio de los co-receptores CD4 y CD8. A esto hay que sumar que las señales enviadas por el TCR-CD3, al unirse al antígeno, son aumentadas unas 100 veces por la interacción CD4/CD8 (lck) al CMH II/I. La lck fosforila los residuos de tirosina de los ITAM (Motivo de activación del inmunoreceptor vía tirosina) de las cadenas  $\zeta$  del CD3, iniciando así la cadena de activación de las células T<sup>1</sup>. La alteración del gen lck en modelos animales (ratones) produce un bloqueo de la maduración y activación de los linfocitos T<sup>125,128</sup>.

Se estudió un paciente con manifestaciones clínicas leves (engrosamiento de los nódulos linfáticos del hilio en forma bilateral) y linfopenia a expensas de CD4+, catalogado de IDVC. Se halló una proliferación linfocítica disminuida, en relación a controles y posteriormente se halló una expresión del 40% de la proteína Ick, por Western blot. De acuerdo a estos hallazgos se diagnosticó de deficiencia de Ick, con lo cual vemos que algunos pacientes con diagnóstico inicial de IDVC pueden cambiar su diagnóstico conforme las bases moleculares de otras inmunodeficiencias<sup>124</sup>. El tratamiento de esta patología se establecerá en base a las manifestaciones clínicas presentes.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1 Antecedentes:**

- Actualmente, se desconocen cuál o cuáles son los mecanismos etiopatogénicos responsables de la Inmunodeficiencia Variable Común.
- No existe ningún test diagnóstico específico de IDVC, el diagnóstico se basa en la presencia de un fenotipo clínico e inmunológico.
- Este fenotipo es a menudo frecuente en otras IDP, dificultando en estos casos un diagnóstico diferencial correcto.
- Incremento de fenotipos atípicos en IDP.
- El diagnóstico de IDVC es consecuencia de la exclusión de otros síndromes en los cuáles las bases moleculares ya han sido descritas.
- El tratamiento, el pronóstico y el consejo genético familiar puede variar entre estas IDP que tienen un fenotipo similar.
- La IDVC es la IDP más frecuente en la que los pacientes tienen manifestaciones clínicas.

## **2.2 Hipótesis de trabajo:**

- Una de las fuentes de heterogeneidad presente en los pacientes con IDVC es debida a que hay enfermos catalogados incorrectamente de IDVC cuando en realidad éstos tienen otra patología (IDP con hipogammaglobulinemia) en la que se conoce su etiología.
- Existe una asociación entre los defectos en la presencia de subpoblaciones de los linfocitos B de memoria y el fenotipo clínico de los pacientes con IDVC.
- Una de las posibles etiologías de la hipogammaglobulinemia, podría ser un defecto en la colaboración T-B. Un modelo de anergia/tolerancia reversible de los linfocitos B producida por la falta de un coestímulo apropiado podría explicar la producción defectuosa de anticuerpos, así como la aparición de la enfermedad en la edad adulta y el paso de déficit selectivo de IgA a IDVC descrito en algunos pacientes. El defecto de coestimulación podría consistir en una disfunción de la vía del eje coestimulador ICOS-ICOSL.

### 2.3 Objetivos:

- Diseñar una metodología de diagnóstico diferencial que permita excluir a los pacientes diagnosticados de IDVC, pero que en realidad tienen otra IDP de origen molecular definido, (evitando el error diagnóstico) con una técnica rápida, relativamente fácil, reproducible y accesible para un laboratorio de inmunología.
- Analizar los linfocitos B (LB) de controles sanos, utilizando los marcadores de IgD y CD27, para establecer los valores de normalidad para las siguientes subpoblaciones: LB de memoria totales (LB CD27+), subpoblación de LB de memoria sin cambio de isotipo (LB CD27+IgD+) y LB de memoria con cambio de isotipo (LB CD27+IgD-).
- Clasificar los pacientes en tres grupos: grupo MB0: LB de memoria (LB CD27+) 2 DE (desviación estándar) por debajo de la media de controles sanos, grupo MB1: LB de memoria con cambio de isotipo (LB CD27+IgD-) 2 DE por debajo de la media de controles sanos, y grupo MB2: LB de memoria con cambio de isotipo (LB CD27+IgD-) y sin cambio de isotipo (LB CD27+IgD+) en proporción parecida a los controles sanos.
- Correlacionar los aspectos clínicos e inmunológicos de los tres grupos de enfermos.
- Estudiar la expresión de ICOS en la membrana de linfocitos T activados de pacientes diagnosticados de IDVC.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Estudio de la expresión de proteínas btk, Ick y SAP en pacientes con IDVC.

##### 3.1.1 Población de estudio

El grupo estuvo conformado por pacientes diagnosticados de IDVC, según los criterios establecidos por el grupo de inmunodeficiencias de la IUIS de la WHO (Organización Mundial de la Salud) y en seguimiento clínico en la consulta de inmunodeficiencias primarias del Servicio de Neumología del área general del Hospital Universitari Vall d'Hebron (29 pacientes), en la consulta de Inmunodeficiencias del área infantil del Hospital Universitari Vall d'Hebron (16 pacientes) y de la consulta de Medicina Interna del Hospital Universitari de Bellvitge (12 pacientes).

**Se incluyeron** solo los pacientes con seguimiento clínico y que acuden a la administración de gammaglobulina a la policlínica de inmunodeficiencias pediátrica y de adultos en forma regular.

**Se excluyeron** pacientes con hipogammaglobulinemia secundaria o pacientes en tratamiento con quimioterapia por linfoma y/o algún otro tipo de cáncer, al momento del estudio.

En el estudio fueron un total de 57 pacientes con diagnóstico de IDVC (16 pediátricos y 41 adultos, de los cuales se excluyeron 2), 37 del sexo masculino y 18 del sexo femenino. Con edades comprendidas entre 4 y 76 años con una media de 36.6 años. En las **tablas 3.1, 3.2 y 3.3**, se resumen los datos clínicos y de laboratorio de todos los pacientes recogidos del expediente clínico al momento del diagnóstico.

**Tabla 3.1. Datos clínicos**

	Edad (años)	Sexo	H. F.	Otras enfermedades	Síntomas Respiratorios	Bronquiectasias	Síntomas Digestivos	Giardiasis	Edad de Inicio de síntomas	Edad de diagnóstico	Intervalo
<b>P1</b>	17	F	NO	NO	SI	NO	SI	NO	7 a	13 a	6 a
<b>P2</b>	13	M	NO	Asma	SI	NO	NO	NO	10 a	11 a	1 a
<b>P3</b>	11	M	NO	NO	SI	SI	SI	NO	1 a	2 a	1 a
<b>P4</b>	15	M	NO	NO	SI	SI	NO	NO	5 a	15 a	10 a
<b>P5</b>	16	M	SI	NO	SI	SI	SI	NO	4 m	6 a	5.5 a
<b>P6</b>	11	M	NO	NO	SI	NO	NO	NO	1.6 a	3 a	1.5 a
<b>P7</b>	16	M	NO	NO	SI	NO	SI	NO	7 m	6 a	5 a
<b>P8</b>	15	F	NO	NO	SI	SI	SI	NO	2 m	3 a	2.4 a
<b>P9</b>	18	M	NO	NO	SI	NO	NO	NO	8 a	16 a	6 a
<b>P10</b>	2	M	SI	NO	NO	NO	SI	NO	6.5 m	1 a	4 m
<b>P11</b>	4	M	SI	NO	SI	NO	SI	NO	6 m	7 m	1 m
<b>P12</b>	9	M	SI	NO	SI	NO	NO	SI	7 m	9 m	2 m
<b>P13</b>	16	M	NO	NO	SI	SI	NO	NO	4 a	5 a	1 a
<b>P14</b>	18	M	NO	NO	SI	NO	SI	SI	6 a	9 a	3 a
<b>P15</b>	11	M	SI	Alergia	SI	NO	NO	NO	4 a	7 a	3 a
<b>P16</b>	13	F	SI	Alergia	SI	SI	SI	NO	9 a	11 a	2 a
<b>A1</b>	59	M	NO	NO	SI	SI	NO	NO	52 a	54 a	2 a
<b>A2</b>	76	M	NO	Timoma-DM	SI	SI	NO	NO	70 a	71 a	1 a
<b>A3</b>	61	F	NO	Asma- EN	SI	NO	SI	NO	54 a	54 a	0 a
<b>A4</b>	56	M	NO	PTI- AS	NO	NO	NO	NO	51 a	54 a	3 a
<b>A5</b>	29	M	NO	Sd Noonan	SI	SI	SI	NO	5 a	6 a	1 a
<b>A6</b>	46	F	NO	GA, AP,HNL	SI	SI	SI	NO	26 a	26 a	0 a
<b>A7</b>	31	F	NO	HE	SI	NO	NO	NO	20 a	22 a	2 a
<b>A8</b>	60	M	NO	FP, AG	SI	SI	NO	NO	56 a	58 a	2 a
<b>A9</b>	58	M	NO	BC, E	SI	NO	NO	NO	55 a	56 a	1 a
<b>A10</b>	26	M	NO	NO	NO	NO	SI	SI	8 a	22 a	14 a

A11	63	F	NO	AHA, E, V, TBP	SI	NO	NO	NO	58 a	58 a	0 a
A12	59	F	NO	EP, M, Asma	SI	SI	SI	SI	22 a	42 a	20 a
A13	41	M	NO	TA, Atrofia V	SI	SI	SI	SI	10 a	35 a	25 a
A14	31	M	NO	Sd. Robinstein	SI	SI	NO	NO	22 a	26 a	4 a
A15	51	F	NO	NO	SI	SI	SI	NO	10 a	49 a	39 a
A16	31	M	NO	NO	NO	SI	NO	NO	12 a	22 a	10 a
A17	41	F	NO	Enanismo const	SI	SI	NO	NO	¿ a	39 a	a
A18	55	M	NO	Enf. AI y esple	SI	SI	SI	NO	23 a	54 a	31 a
A19	73	F	NO	Bocio	SI	SI	NO	NO	67 a	70 a	3 a
A20	35	F	NO	NO	SI	SI	SI	NO	2 a	26 a	24 a
A21	23	M	NO	Esplenomeg	NO	SI	SI	SI	18 a	19 a	1 a
A22	60	F	NO	NO	SI	SI	NO	NO	20 a	56 a	36 a
A23	62	M	NO	Esplenomeg	SI	SI	SI	NO	9 a	44 a	35 a
A24	42	F	NO	NO	SI	SI	SI	NO	18 a	38 a	20 a
A25	60	M	NO	NO	SI	SI	SI	NO	24 a	56 a	32 a
A26	52	F	NO	NO	SI	SI	SI	SI	20 a	33 a	13 a
A27	49	F	NO	NO	SI	SI	SI	NO	39 a	46 a	7 a
A28	69	M	NO	Esplenomeg	SI	SI	SI	NO	52 a	58 a	6 a
A29	31	M	hIgA	Esplenomeg	SI	SI	SI	SI	5 a	23 a	18 a
A30	38	M	NO	Esplenomeg	SI	SI	SI	SI	4 a	35 a	31 a
A31	40	F	NO	PTI, esplenec	SI	SI	SI	SI	13 a	32 a	19 a
A32	31	M	NO	Malabso y psoria	SI	SI	SI	NO		22 a	
A33	26	M	hXLA	Esplenomeg	SI	SI	NO	NO	4 a	6 a	2 a
A34	22	F	NO	Esplenomeg	SI	SI	SI	SI	6 a	14 a	8 a
A35	44	M	NO	Linfoma Hod, IgA	SI	SI	NO	NO	7 a	43 a	36 a
A36	40	M	NO	Gastritis cron atro	SI	SI	SI	SI	¿ a	16 a	
A37	54	M	SI	Ca parótida	SI	SI	NO	NO	10 a	50 a	40 a
A38	32	M	NO	NO	NO	SI	SI	SI	25 a	25 a	<1 a
A39	27	M	¿	Ca próstata	SI	¿	NO	NO	6 a	9 a	3 a
A40	70	F	NO	CA de piel, esple	SI	SI	SI	NO	57 a	58 a	1 a
A41	27	M	SI	PTI, Esplenecto	SI	SI	SI	NO	6 a	14 a	8 a

**Tabla 3.2. Datos inmunológicos humorales**

	IgG	IgA	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Leucos	N:L	Plaquetas
P1	404	7	63	240	114	12	5	9630	59.9/27.2	563,000
P2	409	50	97	320	59	25	44	4600	32.2/48.6	233,000
P3	206	12	32	240	100	10	14	15600	32.9/57.6	479,000
P4	580	3	377	474	5	5	5	12600	65.3/27.6	148,000
P5	447	140	20	247	5	88	5	10800	66/28	565,000
P6	438	7	97	220	60	21	12	11000	30/61.2	184,000
P7	382	9	26	290	60	34	19	7500	38.6/53.9	330,000
P8	389	21	106	280	42	14	25	7500	52.2/40.7	277,000
P9	434	34.8	22	352	5	5	5	7030	63.9/25.4	248,000
P10	152	37	14	-	-	-	-	10700	32.2/56	476,000
P11	170	10	8	216	79	31	5	11200	39/48.6	476,000
P12	251	27	27	275	84	78	2.8	17500	74/16	490,000
P13	306	5	59.2	271	70	0	31	6700	51.4/25.3	375,000
P14	125	6	17	176	170	7	5	12700	42/50	305,000
P15	425	7	40	309	45	21	6	7300	40.1/47.2	254,000
P16	519	57.9	101	412	182	35	11	11900	53.2/30.8	
A1	110	< 25	39.2	101	65.4	35.9	< 4.5	10,800	64.2/25.5	291,000
A2	71	< 25.9	< 18.6	232	10.8	25.2	-	6,150	50.7/34.2	237,000
A3	231	< 31	37.5	-	-	-	-	8,500	61.5/30.5	372,000
A4	360	25.9	41.1	754 c/tx	369	41.5	23.1	10900	63.4/22.2	425,000
A5	150	0	30	-	-	-	-	5,000	46.6/39.1	182,000
A6	285	25	13	-	-	-	-	8,370	68.5/23.9	408,000
A7	277	30.6	25	-	-	-	-	2,000	68.8/28.1	42,000
A8	397	83.6	76.9	297	119	5.05	8.25	5,050	65/30	206,000
A9	320	117	66.7	1020 c/tx	558	47.6	105	7,990	57/30.6	195,000
A10	396	99.3	62.8	213	180	15.8	7.38	5,620	57.8/33.7	225,000
A11	391	25.8	22.9	239	86.1	12	20.1	9820	68.5/24.3	171,000
A12	276	36	13	-	-	-	-	10,000	48.1/42	247,000
A13	151	7	<9	128	42	5	5	4400	50.9/36.7	145,000
A14	404	<7	<14	483 c /tx	192	13	7	5000	57.7/30.7	179,000
A15	385	2	54	252	37	8	<5	6400	66/20	264,000
A16	285	<7	21	232 c/tx	166	27	<5	9400	63/24	202,000
A17	126	1	10	59	17	5	5	4300	44.3/39.6	263,000

A18	232	<10	12	191	79	17	5	4300	63/29	101,000
A19	49	7	7	198 c/ tx	51	6	-	9800	61.6/29.1	380,000
A20	663	<7	29	440	280	20	<5	5900	62/33	218,000
A21	305	<7	30	185	67	23	5	7700	71/18	166,000
A22	217	<7	9	209	10	24	<5	3900	60/26	81,000
A23	73	<1	27	360	90	22	11	4800	62/32.3	228,000
A24	237	<7	66	139	98	<5	<5	11200	73/16	326,000
A25	338	<7	16	180	114	5	<5	7400	72/20	156,000
A26	44	1	15	328 c/tx	340	<5	<5	3000	55/33	262,000
A27	293	<7	8	133	48	12	<5	8670	66/23	256,000
A28	544	9	27	480 c/tx	8	80	<5	8100	72.2/22.1	227,000
A29	354	<7	11	172	110	18	<1	6900	71/20 *	270,000
A30	330	<10	46	281	5	52	5	3300	62/21	134,000
A31	60.3	<7	10	120 c/tx	56	90	5	14030	56/28	571,000
A32	584	<7	14	--	-	-	-	4,000	72.3/12.5	128,000
A33	209	18	36	274 c/tx	272	5	5	9900	63/20	207,000
A34	173	<6	20	653 c/tx	204	16	23	4400	53/24	188,000
A35	1178	6	39	1071	10	47	5	9300	75.9/14.4	248,000
A36	208	26	21	445 c/tx	266	30	5	4820	63.3/31.4	209,000
A37	80	<10	<10	-	-	-	-	13200	69/22	259,000
A38	352	14	12	320	80	21	5	4200	62/29	263,000
A39	83	6	6.2	-	-	-	-	-	-	
A40	387	7	13	380 c/tx	160	19	5	4600	65.1/29.9	330,000
A41	310	2	17	90	157	96	7.1	4600	52.5/29.7	126,000

**Tabla 3.3. Datos inmunológicos celulares**

	Linfos Totales	CD3 %	CD4 %	CD4 abs.	CD8 %	CD8 abs.	índice 4/8	CD19 %	CD19 abs.	NK %	NK abs.	PHA %	OKT3 %
P1	2619	74	53	1388	21	550	2.5	19	498	6	157	157	16
P2	2236	62	41	917	21	470	2.05	13	291	19	425	46	21
P3	8986	68	48	4313	21	1887	2.2	31	2786	4	359	43	62
P4	3478	63	20	696	38	1322	0.53	6	209	30	1043	48	55
P5	3024	77	50	1512	29	877	1.7	19	575	8	242	82	116
P6	6732	66	41	2760	26	1750	1.5	25	1683	8	539	94	2.1
P7	4043	70	41	1658	33	1334	1.2	10	404	17	687	41	6.7
P8	3053	55	53	1618	14	428	3.7	13	397	16	488	15	25
P9	1786	68	47	839	20	357	2.35	18	321	14	250	20	14
P10	5992	68	45	2696	20	598	2.2	19	1138	12	719	-	-
P11	5443	66	48	2613	16	871	3	22	1197	10	544	81	28
P12	2800	75	53	1484	23	644	2.3	18	504	5	140	124	15
P13	1695	66	37	627	34	576	1.09	22	373	18	305	15	7.9
P14	6350	84	49	3112	27	1715	1.8	12	762	5	318	67	31
P15	3446	77	46	1585	33	1137	1.39	10	345	12	414	39	16
P16	3665	67	38.4	1407	21	773	1.8	16.2	593	15.7	575	26	-
A1	2754	76	31	854	44	1212	0.52	9	248	-	-	-	-
A2	2103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	2592	77	28	726	48	1244	0.58	7	181				
A4	2420	75	43	1040	41	992	1.04	8	194				
A5	1955	91	56	1095	35	684	1.6	15 - 0	293 - 0				
A6	2000	60	26	520	30	600	0.87	18 - 5	360				
A7	562	93	78	438	12	67	6.5	3	17				
A8	1515	64	9	136	61	924	0.14	26	394				
A9	2445	66	43	1051	23	562	1.87	20	489				
A10	1894	81	41	776	30	568	1.37	11	208				

A11	2386	91	59	1408	31	740	1.9	5	119				
A12	4200	65	39	1638	30	1260	1.3	24 - 0	1008 - 0				
A13	1615	90	49	791	37	598	1.3	4	65	2	32	120	76
A14	1535	83	62	952	16	246	3.8	10	153.5	6	92	643	
A15	1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A16	2256	73	43	974	32	725	1.3	11	249	13	294	59	27
A17	1703	86	36	613	47	800	0.77	11	187	2	34	-	84
A18	1247	78	41	511	37	461	1.1	4	50	23	287	66	4.4
A19	2852	75	16	456	65	1854	0.2	13	371	12	342	-	53
A20	1947	68	46	896	26	506	1.7	15	293	14	273	123	39
A21	1386	73	40	554	48	665	0.81	8	111	13	180	-	30
A22	1014	72	33	335	43	436	0.77	19	193	7	71	-	7
A23	1550	86	21	325	60	930	0.35	12	186	4	62	142	17
A24	1792	71	35	627	41	735	0.85	12	215	16	287	57	65
A25	1480	88	50	740	34	503	1.5	6	89	7	104	-	-
A26	990	90	42	416	46	455	0.9	1	9.9	4	40	3.6	1.6
A27	1994	76	52	1036	22	439	2.36	13	259	10	199	129	47
A28	1790	52	21	376	31	556	0.7	10	179	28	358	12	3.6
A29	1380	85	32	442	51	704	0.6	6	83	4	55	69	
A30	693	81	48	333	30	208	1.6	9	62	9	62	-	-
A31	3928	66	28	1100	39	1532	0.7	18	707	5	196	31	-
A32	500	92	28	140	59	295	0.47	4	20	3	15	72	55
A33	1800	81	43	774	38	684	1.1	14	252	4	72	59	
A34	1056	71	40	422	29	306	1.37	7	74	21	222	120	-
A35	1339	45	15	201	26	348	0.58	37	495	18	241	29	9
A36	1513	84	43	651	39	590	1.1	6	91	9	136	84	11
A37	2904	73	18	523	53	1539	0.34	13	377	15	436	-	-
A38	1218	71	29	353	48	585	0.6	8	97	14	171	62	29
A39		73	39		39		1	2				31.8	
A40	1375	72	35	481	40	550	0.8	8	110	4	55	21	2.8
A41	1366	58	43	587	40	546	1.07	10-1	137				



### **3.1.2 Recopilación de datos clínicos e inmunológicos de los pacientes con IDVC.**

Los datos clínicos de estos pacientes se obtuvieron mediante una revisión detallada del expediente clínico en cada uno de los centros clínicos, se obtuvieron los siguientes datos: las manifestaciones clínicas más relevantes, edad de inicio de los síntomas, edad al diagnóstico y datos de laboratorio **tablas 3.1, 3.2 y 3.3.**

También se revisó los estudios analíticos y pruebas complementarias que se realizan a todos los pacientes con IDVC como: hemograma completo, cuantificación de inmunoglobulinas séricas, determinación de subpoblaciones linfocitarias, así como la respuesta proliferativa linfocitaria, correspondiendo estos datos a la fecha del diagnóstico, realizados con los métodos habituales de laboratorio ( se especifican mas adelante).

### **3.1.3 Estudio de la expresión de proteínas en células mononucleadas (Western blot)**

#### **3.1.3.1 Procesamiento de muestras.**

a).- Tipo de muestra

1.- 2 a 5 ml de sangre venosa periférica (en adultos 10 ml), con EDTA 0.05% como anticoagulante, fueron extraídos de los pacientes e individuos sanos.

b).- Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad (ficoll).

1.- Se centrifugaron las muestras, a 1250 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

2.- Se descartó el plasma, y el sedimento fue mezclado con PBS. Posteriormente se pasó a otro tubo en el que previamente se había colocado 3 ml de Lymphoprep™ (Axis-SHIELD PoCAs, Oslo Norway), el procedimiento se realizó con cuidado para no mezclar la sangre con el ficoll y quedara una relación aproximada de 1/3 de ficoll y 2/3 de sangre diluida con PBS.

3.- Se centrifugó a 1750 rpm durante 25 minutos a temperatura de 20° C.

4.- Se extrajo la capa blanca de células mononucleadas (MN) que había entre el PBS y el ficoll y se colocó en otro tubo.

5.- Posteriormente se le realizaron dos lavados con PBS a 1250 rpm durante 10 minutos a 16° C.

### **3.1.3.2 Recuento y viabilidad celular**

El procedimiento para evaluar la viabilidad celular y conocer el número de células mononucleadas obtenidas fue el siguiente:

1.- El pellet del último lavado realizado, se resuspendió en 900 µl de PBS. Se mezcló 10 µl de la suspensión con las células con 10 µl de azul tripán y posteriormente se colocaron 10 µl de la mezcla en una cámara de Neubauer.

2.- Se contaron las células vivas (transparentes) al microscopio óptico a 40X. Las muestras que tenían más de un 5 % de células muertas fueron desestimadas.

### 3.1.3.3 Lisis celular

1.- Una vez contadas las células se procedió a la lisis, se realizó un lavado con PBS a 1250 rpm durante 10 minutos a 16° C y se extrajo todo el sobrenadante tratando de dejar lo más seco posible el pellet.

2.- Se procedió a la preparación del tampón de lisis el cuál se prepara en el instante y en hielo, con los reactivos mencionados en la **tabla 4**.

3.- El pellet se resuspendió en 200 a 300 µl del tampón de lisis de acuerdo al número de células obtenido, y se dejó durante 10 minutos en hielo, agitando suavemente cada 2-3 minutos.

4.- Se centrifugó a 4° C durante 10 minutos a 13.000 rpm.

5.- El sobrenadante se alicuotó (60-70 µl / alícuota) y posteriormente se congeló a -20° C.

<b>Reactivos stock</b>	<b>1 ml</b>	<b>Concentración final</b>
H <sub>2</sub> O ultrapura	810 µl	
10% NP-40	100 µl	1 %
1M Tris ( pH8)	20 µl	20 mM
5M ClNa	26 µl	130 mM
Leupeptina	1 µl	20 mM
1M DTT	1 µl	1 mM
Aprotinina	10 µl	1%
100mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 µl	100 mM
100 mM PMSF	10 µl	1 mM
500 mM NaF	20 µl	10 mM

Tabla 4. Reactivos utilizados en la solución de lisis.

## **3.2 Estudio de la expresión de proteínas de lisados de células mononucleadas.**

### **3.2.1 Concentración de proteínas de los lisados celulares**

La concentración de proteínas de los lisados de células dependía del número absoluto de células mononucleadas de cada paciente, así como, del volumen de sangre extraído. Aunque siempre intentamos obtener un volumen fijo de sangre (aproximadamente 5 ml en pacientes pediátricos y de 10 ml en adultos), en los primeros esto no fue siempre posible, ya que hay que tener en cuenta que son pacientes pediátricos y en ocasiones el acceso venoso es difícil. Aún así, se obtuvo un rendimiento aceptable en casi todos los casos, excepto en los pacientes A14 y A17, donde no se obtuvo buena cantidad de proteína.

### **3.2.2 Determinación de la concentración de proteínas en lisados celulares.**

Para la realización de este procedimiento se eligió el kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce, USA), su fórmula está basada en el ácido bicínico (BCA) para la detección colorimétrica y cuantificación de la proteína total. Este método combina la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por una proteína en un medio alcalino (la reacción de biuret) con la alta sensibilidad y selectividad de la detección colorimétrica del catión cúprico ( $\text{Cu}^{+1}$ ) usando un reactivo que contenga ácido bicínico. El color púrpura de la reacción de este examen es formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cúprico. Este complejo soluble en agua presenta una fuerte absorbancia a 562 nm que es lineal con el incremento de la concentración de proteína.

No pudimos utilizar el Comassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, USA), porque NP40 al 1% presente en la solución de lisis interferirá en los resultados, cosa que no ocurrió con el BCA Protein Assay Reagent (Pierce, USA).

1.-Primero se preparó la curva de calibración utilizando como estándar la albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 2 mg/ ml (Pierce, USA). Se hizo de la siguiente manera:

BSA (2mg/ml) (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Concentración final BSA ( mg/ml)
0	0.5	0.0
0.05	0.45	0.2
0.1	0.4	0.4
0.2	0.3	0.8
0.25	0.25	1.0
0.3	0.2	1.2

2.- Las muestras problema se diluyeron 1/10 en H<sub>2</sub>O.

3.- Se utilizó un tubo con H<sub>2</sub>O como blanco.

4.- La preparación final de las muestras con los reactivos de trabajo incluida la curva, fue como sigue:

	Problema	Curva	Blanco
	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml de H <sub>2</sub> O
Reactivo de trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

5.- Se mezcló bien las muestras (vortex, MS2 Minishaker IKA<sup>R</sup>).

6.- Incubación de las muestras en baño durante 30 minutos a 37° C.

7.- Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

8.- Se leyeron las muestras en un espectrofotómetro (Kontron, Instruments. Uvikon 930) a una absorbancia de 562 nm.

9.- Se calculó la curva de calibración introduciendo los valores de nuestros estándares.

10.- El cálculo de la concentración de proteínas:

Concentración de proteínas = Absorbancia x factor de concentración de la curva (mg/ ml). Después multiplicado por 10 (dilución que se realizó en las muestras).

### **3.2.3 Electroforesis**

Material:

- Cubeta X Cell II™ Mini-Cell ( Novex, Germany)
- Geles NuPAGE<sup>R</sup> 4-12% Bis- Tris de 10 y 12 pocillos (Novex)
- Agua Ultrapura (Milli-Q)
- NuPAGE<sup>R</sup> SDS Running Buffer 1X ( MES y MOPS) ( Invitrogen, UK)
- NuPAGE<sup>R</sup> LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen, UK)
- NuPAGE<sup>R</sup> Reducing Agent 10X (Invitrogen, UK)
- NuPAGE<sup>R</sup> Antioxidant (Invitrogen, UK)

1.- Preparación de la muestra:

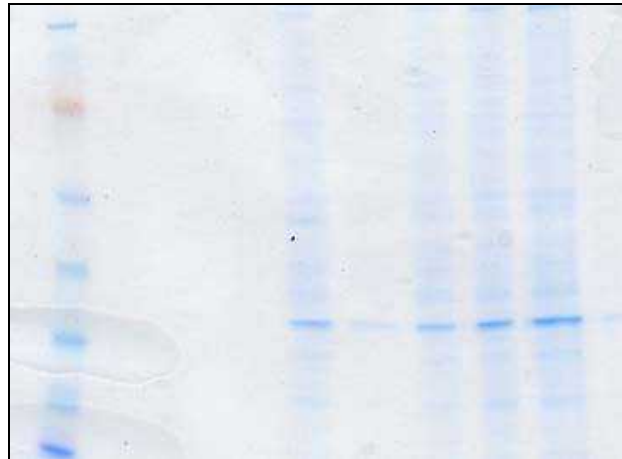
- 30 µg de proteína
- 7.5 µl de NuPAGE Sample Buffer 4X
- 3 µl de NuPage reducing agent 10X

- Se completó con 30  $\mu$ l de agua ultrapura.
- 2.- Se mezcló bien y se calentó la muestra en un Tembloc (Selecta) a 70° C durante 10 minutos, y se dejó enfriar cinco minutos a temperatura ambiente.
  - 3.- Se extrajo el casete con el gel NuPAGE 4- 12 % de 10 o 12 pocillos de su envoltura de plástico, se lavó con agua destilada, se quitó el peine y se lavaron los pocillos con tampón de electroforesis (1X).
  - 4.- Se colocó el casete en la cubeta para formar la cámara interior, se agregó el tampón de electroforesis (1X) y se observó que no perdiera solución, tras comprobar esto, se llenó la cámara hasta 1 cm. aproximadamente del borde superior.
  - 5.- Se cargaron los pocillos con las muestras, se colocó 10  $\mu$ l de marcador de peso molecular (See Blue<sup>R</sup> Plus2 Pre- Stained Standard, Invitrogen, figura 4) y 30  $\mu$ l de cada muestra.
  - 6.- Se llenó la cámara exterior con tampón de electroforesis 1X hasta 1cm debajo del borde superior, se dispensó 500  $\mu$ l de NuPAGE<sup>R</sup> Antioxidante.
  - 7.- Se conectaron los cables de los electrodos a la fuente. Las condiciones de la electroforesis fueron a voltaje constante (200 V) e intensidad variable (110-115 mA al inicio y al final 50-60 mA) durante 55-60 minutos.

#### **3.2.4. Elección de un sistema de geles comerciales.**

La elección de un sistema geles de poliacrilamida comercial fue realizada teniendo en cuenta la finalidad del trabajo: test de aplicación clínica. El sistema de geles utilizados: NuPAGE<sup>R</sup> Bis-Tris Gel 4 – 12% (Invitrogen), presentaba teóricamente una serie de ventajas técnicas en comparación con el método

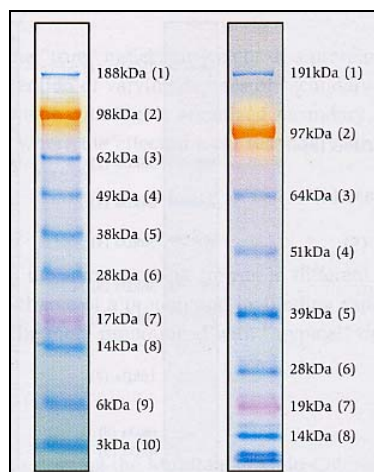
Laemmli tradicional. Hecho que fue observado al comparar con un sistema no comercial (datos no mostrados) anteriormente estandarizado<sup>129</sup>. Hubo otras ventajas: disminución de la manipulación sustancias tóxicas y de la carga de trabajo del personal técnico. Aunque el coste del reactivo era mayor se ahorra en horas de trabajo. (**Figura 4**)



**Figura 4.** Gel teñido con Gel Code<sup>R</sup> Blue Stain Reagent. Para mostrar las condiciones de la electroforesis.

### 3.2.5 Evaluación de la electroforesis

Para comprobar que las condiciones de la electroforesis eran las adecuadas y las proteínas habían corrido se tiñeron las proteínas con un colorante, (**figura 5**), se utilizó un marcador de peso molecular de la casa comercial.



**Figura 5.** Imagen de la forma de separación de las proteínas de acuerdo al tampón de electroforesis utilizado (MES o MOPS, respectivamente), proporcionado por la casa comercial.



### 3.2.6 Transferencia: sistema semi-seco

El inmunoblot es usado para identificar proteínas reconocidas por anticuerpos poli o monoclonales para lo cuál, las proteínas son transferidas eletroforeticamente desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, PVDF o Nylon. Las proteínas transferidas son unidas a la superficie de la membrana. El resto de la superficie es bloqueado por inmersión de la membrana en una solución que contiene un agente bloqueante (solución proteica). Después de incubar con el anticuerpo primario, la membrana es lavada y los complejos antígeno-anticuerpo son identificados por un anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Los substratos cromogénicos o luminiscentes son entonces usados para visualizar la actividad.

Material:

- Papel filtro Whatmann 3 mm
- Membrana de nitrocelulosa 8x8 cm (BIO-RAD, 0.2  $\mu$ m)
- Gel NuPAGE con las proteínas.
- NuPAGE<sup>R</sup> Transfer Buffer 1X
- Cubeta de transferencia semiseca
- Agua ultrapura
- Metanol y NuPAGE Antioxidante (para preparar la solución de transferencia, ver soluciones).

1.- Se hidrató la membrana de nitrocelulosa en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente se dejó 5 minutos más en tampón de transferencia. Se humedeció el papel Whatman de 3 MM con tampón de transferencia durante 10 minutos.

2.- Se abrió el casete con una espátula y cuidadosamente se cortó la parte superior y el borde inferior del gel, después se despegó completamente el gel del casete, humedeciéndolo un poco en el tampón de transferencia.

3.- Se colocaron encima del Blot 5 papeles de filtro, sobre estos la membrana de nitrocelulosa, sobre ésta el gel y en último lugar otros 5 papeles de filtro.

4.- Se eliminaron las posibles burbujas de aire localizadas entre el gel y la membrana.

5.- Se conectó a la fuente de energía (Power-Pac 200, BIO-RAD).

6.- Se transfirió a 30V constante durante 45 minutos, con intensidad variable (inicio 0.54 mA y al final 0.35 mA).

### **3.2.7 Inmunodetección**

1.- Bloqueo de la membrana

a).- Después de la transferencia, se lavó la membrana con solución de PBS-T 0.05% durante 10 minutos.

b).- Se Incubó con solución de bloqueo (leche desnatada al 5% en PBS-T 0.05%) durante una hora en agitación suave y a temperatura ambiente.

c).- Se realizó un lavado de la membrana durante 5 minutos con PBS-T 0.05% en agitación suave.

2.- Incubación con anticuerpos

a).- Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios

- IgG de ratón anti-Btk monoclonal (Transduction Laboratories).

Anticuerpos secundarios

- Anti- IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

- IgG de ratón anti-Btk monoclonal (PharMingen)

- Anti- IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

- IgG de conejo anti-Btk policlonal H360B (Londres)

- Anti- IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

- IgG de conejo anti- SAP policlonal (donado por la Dra. Nichols)

- Anti- IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

- IgG de conejo anti- SAP policlonal (Santa Cruz)

- Anti- IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

- IgG de ratón anti- LcK monoclonal (Transduction Laboratorios).

- Anti- IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

- IgG de ratón anti-  $\beta$ - actina monoclonal (Sigma)

- Anti- IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (H+L) (Pierce)

b).- Todos los anticuerpos se incubaron a temperatura ambiente, y en las condiciones especificadas en la **tabla 5**.

c).- Después de los lavados se incubó con el anticuerpo secundario (especificado arriba) durante una hora, en agitación a temperatura ambiente.

d).- Se preparó la solución de substratos (Luminol y Enhancer) 1:1, (SuperSignal<sup>R</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce), y se incubó la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

e).- La exposición de la membrana al film fue entre 1-5 minutos de acuerdo a la imagen obtenida al revelarla. Los films que se utilizaron fueron CL-Xposure TM films (Pierce).

f).- El revelado se realizó en el servicio radiodiagnóstico del Hospital Vall d'Hebron (Curix402, Agfa-Gevaert).

Anticuerpo 1	Concentración	Tiempo incuba.	Lavados	Anticuerpo 2	Concentración	Lavados	Bloqueo
Btk AcMN BD-TL	1:250 10 ml PBS-T 40 µl Ac con leche	1 hora	6 x 5'	Anti- ratón	1:5000 10 ml PBS-T 2 µl Ac con leche	6 x 5'	Leche al 0.5% + PBS-T 0.05%
Lck AcMN BD-PH	1:1000 10 ml PBS-T 10 µl Ac	2 horas	1 x 15' 3 x 5'	Anti- ratón	1:20,000 20 ml de PBS-T 1 µl Ac	6 x 5'	Leche al 0.5% + PBS-T 0.05%
SAP Ac Policlonal (Dra. Nichols)	1:1000 10 ml PBS-T * 10 µl Ac con leche	1 hora	6 x 5'	Anti- conejo	1: 20,000 30 ml PBS-T * 1 µl Ac	6 x5'	Leche al 0.5% + PBS-T 0.05%
B- actina Ac MN BD-TL	1:5000 10 ml de PBS-T 2 µl Ac con leche	1 hora	6 x 5'	Anti-ratón	1:40,000 40 ml de PBS-T 1 µl de Ac	6 x 5'	Leche al 0.5% + PBS-T 0.05%

\*PBST- 0.1 %

**Tabla 5.** Anticuerpos que se probaron y concentraciones finales.

### 3.2.8 Evaluación de los anticuerpos primarios

Si queríamos que el test fuese exportable y reproducible en otros laboratorios era importante evaluar distintos anticuerpos primarios, siendo prioritario que la fuente fuese asequible (origen comercial) y la monoclonalidad de éstos (Resultados):

1.- Valoración de anticuerpos primarios anti-Btk.

a).- Anticuerpo policlonal de Londres (no comercial).

b).- Anticuerpo policlonal (PharMingen), en nuestro trabajo no funcionó. No se muestra imagen.

c).- Anticuerpo monoclonal anti-Btk (Transduction Laboratorios), utilizado en nuestro trabajo. Se hicieron varias titulaciones previas a seleccionar nuestra dilución.

2.- Valoración de anticuerpo monoclonal primario anti-Lck. (Transduction Laboratorios).

3.- Valoración de anticuerpo policlonal primario anti –SAP.

a).- Anticuerpo policlonal (Santa Cruz), no funciono en nuestro trabajo.

b).- Anticuerpo policlonal donado por la Dra. K. Nichols. Mostramos la titulación de acuerdo a lo recomendado por ella.

Otra ventaja de usar anticuerpos monoclonales, por ejemplo Btk y Lck, se puede incubar al mismo tiempo con la  $\beta$ -actina corroborar que la cantidad de proteína es adecuada. Imagen Btk y Lck (con actina).

### **3.2.9 Controles**

a).- Controles: 6 Individuos sanos, donantes voluntarios, fueron utilizados como controles normales de la expresión de proteínas (controles positivos). 4 pacientes diagnosticados de ALX fueron utilizados como control negativo para la expresión de Btk y 1 paciente diagnosticado de XLP fue utilizado como control negativo de la expresión de SAP. En estos enfermos controles el diagnóstico está confirmado por el estudio mutacional (**tabla 6**).

	Mutación	Gen
C1 (ALX)	346 del AA ins T	BTK
C2 (ALX)	G613D	BTK
C3 (ALX)	L402P	BTK
C5 (ALX)	1846insTA	BTK
C4 (LPX)	Try 100>stop	SH2D1A

**Tabla 6.** Defectos mutacionales de los pacientes controles.

Se utilizaron otros controles como:

Btk: (+) Lisado celular EB1 (Transduction Laboratories).

(-) Pacientes con diagnóstico de XLA.

Lck: (+) Lisado celular Jurkat (Transduction Laboratories).

(-) Lisado celular EB1 (Transduction Laboratories).

Sap: (+) Lisado celular Jurkat (Transduction Laboratories).

(-) Lisado celular de fibroblastos y línea K562.

### 3.2.10 Stripping

a).- Para reutilizar las membranas en que se había realizado la técnica de inmunoblot, se eliminaron los anticuerpos unidos a las proteínas mediante la incubación de la membrana con 20 ml de Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce) durante 40 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. Tras esta operación las membranas se pudieron incubar con otros anticuerpos primarios. En nuestro caso se utilizó para demostrar la cantidad adecuada de la muestra, estudiando la expresión de una proteína ubicua como es la:  $\beta$ -actina.

b).- Se lavó la membrana en 3 ocasiones con PBS-T 0.05%.

c).- Nuevamente se incubó con solución de bloqueo al 5% durante una hora en agitación suave y a temperatura ambiente.

d).- Posteriormente se procedió a la incubación con el anticuerpo anti- $\beta$ -actina, como se especifica en la tabla 5.

### 3.2.11 Soluciones y Tampones

a).- PBS

- Dulbecco's Phosphate buffered saline ( Biological Industries, Israel)
- 1 litro de agua ultrapura

b).- PBS- T 0.05% y 0.1%

- Dulbecco's phosphate buffered saline ( Biological Industries, Israel)
- 0.5 y 1 ml respectivamente de Tween 20 ( Sigma)

c).- Tampón de electroforesis 1X (1000 ml.)

- 50 ml de NuPAGE<sup>R</sup> SDS Running Buffer ( MOPS o MES) (20X)
- 950 ml de agua ultrapura.

d).- Tampón de transferencia 1X (1000 ml)

- 849 ml de agua ultrapura
- 50 ml de NuPAGE<sup>R</sup> Transfer Buffer (20X)
- 1 ml de NuPAGE<sup>R</sup> Antioxidant
- 100 ml de metanol

e). - Sample buffer 4X (10 ml) pH 8.5

- 4 g glicerol
- 0.682 g Tris base
- 0.666 g Tris HCL
- 0.800 g LDS
- 0.006 g EDTA
- 0.75 ml de solución 1% de Serva blue G250
- 0.25 ml de solución 1% Fenol rojo
- Agua ultrapura

f).- MOPS SDS Running Buffer (20X) 500 ml. pH 7.7

- 104.6 g MOPS 3- (N- morpholino) propane sulfonic acid ( 1M)
- 60.6 g Tris Base ( 1 M)
- 10 g SDS ( 69.3 mM)

- 3 g EDTA ( 20.5 mM)
  - Agua ultrapura
- g).- MES SDS Running Buffer (20X) 500 ml. pH 7.3
- 97.6 g MES 2- ( N- morpholino) ethane sulfonic acid ( 1M)
  - 60.6 g Tris Base ( 1M)
  - 10 g SDS ( 69.3 mM)
  - 3 g EDTA ( 20.5 mM)
  - Agua ultrapura
- h).- NuPAGE<sup>R</sup> Transfer Buffer (20X) 125 ml. pH7.2
- 10.2 g Bicine ( 500 mM)
  - 13.08 g Bis-Tris (500 mM)
  - 0.75 g EDTA (20.5 mM)
  - 1 mM Clorobutanol
  - Agua ultrapura.
- i).- Solución de bloqueo
- 2.5 gr de leche en polvo desnatada (sveltesse)
  - 50 ml de PBS-T 0.05%
- j). - See Blue<sup>R</sup> Plus2 pre- stained standard
- Tris-HCl
  - Formamide
  - SDS
  - Rojo fenol
- k). - Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer (Pierce)
- l). - Gel Code<sup>R</sup> Blue Stain Reagent (Pierce).



### **3.3 GRUPOS DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO DE LINFOCITOS B DE MEMORIA.**

#### **3.3.1 Grupo de estudio**

Este grupo estuvo formado por pacientes diagnosticados de IDVC, en seguimiento clínico en la consulta de Inmunodeficiencias Primarias del Servicio de Neumología del área general del Hospital Universitari Vall d'Hebron (30 pacientes), en la consulta de Inmunodeficiencias del área infantil del Hospital Universitari Vall d'Hebron (4 pacientes) y en la consulta de Medicina Interna del Hospital de Bellvitge (7 pacientes).

**Se incluyeron** sólo los pacientes con seguimiento clínico y tratamiento sustitutivo con gammaglobulina endovenosa (GGEV) regular.

**Se excluyeron** los pacientes con IDVC con una enfermedad tumoral o enfermedad autoinmune, que requería tratamiento inmunosupresor (quimioterapia, corticoesteroides, ciclosporina) en el momento del estudio.

En el estudio se incluyeron 41 pacientes, 20 mujeres y 21 varones, con edades comprendidas entre 14 y 64 años, con una media de 37 años. En las **tablas 7.1 y 7.2** (pag. 77-78) se resumen los datos clínicos y analíticos de los 41 pacientes en el momento del diagnóstico. Todos los pacientes presentaron valores de IgG < 450 mg/dl o valores de IgG < 600 mg/dl, IgA y/o IgM disminuidos y ausencia de la producción de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación.

**Tabla 7.1** Datos clínicos iniciales y al diagnóstico de los pacientes con IDVC incluidos en el estudio.

Nº de paciente	Edad actual / Sexo (años)	Edad de inicio de síntomas (años)	Síntomas iniciales	Edad al diagnóstico (años)	Manifestaciones clínicas al diagnóstico
1	44/V	17	Neumonias	34	IRR, DR
2	40/V	34	Neumonias, DR, DIgA	37	IRR, DR
3	18/V	2	Neumonias	6	IRR
4	44/M	12	Neumonias	40	IRR, Leucopenia
5	42/M	13	PTI	30	IRR, DR
6	53/M	37	Neumonias	50	IRR, Artralgias
7	15/M	10	AHAI, DR	12	IRR, DR
8	28/V	4	Bronquitis, DR	6	IRR, DR
9	34/V	6	Neumonias	24	IRR, DR
10	24/M	6	Neumonias	15	IRR, DR
11	24/M	13	Bronquitis	16	IRR
12	16/M	6	Bronquitis	16	IRR
13	25/V	4	Neumonias	11	IRR, Artralgias
14	21/V	5	Bronquitis	9	IRR, DR, Astenia
15	61/M	9	Neumonias	59	IRR, DR
16	54/M	7	Neumonias	41	IRR
17	51/M	38	Bronquitis, DR	46	IRR, DR
18	38/M	14	Neumonias, DR, DIgA	27	IRR, DR
19	19/V	4	Neumonias	9	IRR
20	21/M	9	Amigdalitis, DR	13	DR
21	25/V	17	Amigdalitis, Otitis, DR	19	IRR, DR
22	20/V	8	Neumonias	16	IRR
23	45/M	34	Neumonias	39	IRR, DR
24	56/V	4	Neumonias	25	IRR
25	33/M	22	Neumonias	33	IRR
26	63/M	40	Bronquitis	59	IRR
27	61/V	30	Neumonias	54	IRR, DR
28	44/V	16	Bronquitis, DIgA	34	IRR, DR
29	58/V	30	PTI	54	PTI
30	33/V	12	Amigdalitis, Otitis	23	IRR, DR
31	44/M	25	Amigdalitis	41	IRR
32	38/M	13	Bronquitis	37	IRR
33	64/V	33	Bronquitis	43	IRR
34	25/M	9	HAI, DIgA	10	HAI, Vitiligo
34	14/V	5	Bronquitis	7	IRR, DR
35	18/V	5	Amigdalitis, Otitis	6	IRR
37	53/V	46	Vasculitis autoinmune?	51	Alop. areata
38	30/M	11	Neumonias	21	IRR, DR
39	50/M	48	Faringitis	49	IRR, DR
40	34/V	4	Sinusitis	33	IRR
41	28/V	4	Neumonias	6	IRR

Abreviaturas: **IRR** Infecciones Respiratorias Recurrentes, **DR** Diarreas recidivantes, **DIgA** Déficit de IgA, **PTI** Púrpura Trombocitopénica Idiopática, **AHAI** Anemia Hemolítica Autoinmune, **HAI** Hepatitis Autoinmune.

**Tabla 7.2.** Datos inmunológicos al diagnóstico de los pacientes con IDVC incluidos en el estudio.

Paciente	Edad al diagnóstico (años)	IgG al diagnóstico (mg/dl)	IgA al diagnóstico (mg/dl)	IgM al diagnóstico (mg/dl)	IgG1 al diagnóstico (mg/dl)	IgG2 al diagnóstico (mg/dl)	IgG3 al diagnóstico (mg/dl)	Respuesta a vacunación
1	34	562	<7	116	530	116	90	negativa
2	37	549	<6,7	56	513	33	162	negativa
3	6	447	140	35	247	5	88	negativa
4	40	133	<5	8	88	23	<5	ND
5	30	313	<7	42	200	60	8	ND
6	50	385	<7	54	252	37	8	negativa
7	12	505	35	62	288	52	95	negativa
8	6	209	18	36	88	23	<5	ND
9	24	43	7	6	ND	ND	ND	negativa
10	15	173	<7	20	ND	ND	ND	ND
11	16	400	<7	<10	172	228	<5	ND
12	16	95	<7	<10	ND	ND	ND	ND
13	11	147	17	<10	103	5	49	negativa
14	9	125	<7	17	177	170	7	ND
15	59	466	80	94	419	59	21	negativa
16	41	98	84	39	ND	ND	ND	ND
17	46	268	<7	7	170	46	11	negativa
18	27	440	<7	25	ND	ND	ND	ND
19	9	131	13	40	80	39	14	ND
20	13	404	<7	63	244	44	39	ND
21	19	305	<7	24	185	67	23	negativa
22	16	376	17	22	352	5	<5	ND
23	39	389	<7	90	151	96	<5	negativa
24	25	80	<7	<10	ND	ND	ND	ND
25	33	114	<7	28	130	5	9	negativa
26	59	217	<7	9	209	23	<5	negativa
27	54	243	<7	20	146	73	27	ND
28	34	160	<7	82	168	11	<5	ND
29	54	300	25	25	ND	ND	ND	ND
30	23	285	<7	21	ND	ND	ND	ND
31	41	445	271	191	381	10	22	negativa
32	37	123	<7	12	75	40	<5	negativa
33	43	123	<7	19	200	248	<5	negativa
34	10	438	<7	64	348	5	12	negativa
35	7	425	<7	63	309	45	21	ND
36	6	368	8	30	290	60	34	ND
37	51	374	30	35	281	83	5	ND
38	21	439	88	172	275	128	44	negativa
39	49	300	9	3	ND	ND	ND	ND
40	33	114	52	30	75	16	8	negativa
41	6	275	60	40	280	34	32	negativa

No se muestran datos de la IgG4 por su escaso valor clínico. Edad de diagnóstico corresponde a la edad de la realización de las determinaciones inmunológicas expuestas. **ND** = No Disponible.

### **3.3.2 Recopilación de datos clínicos e inmunológicos de los pacientes con IDVC.**

Los datos clínicos e inmunológicos se obtuvieron mediante una revisión detallada de la historia clínica de los pacientes en cada uno de los centros clínicos. Para esta etapa del estudio se recogieron los estudios analíticos y pruebas complementarias que se realizan a todos los pacientes con IDVC son: hemograma completo, cuantificación de inmunoglobulinas séricas, determinación de subpoblaciones y función linfocitarias, pruebas de función respiratoria (PFR), tomografía axial computarizada (TAC) de tórax y abdomen y radiografía de senos paranasales.

A estas pruebas fundamentales, se le añaden otras, más específicas y más selectivas según la sintomatología clínica: cultivo de esputo, coprocultivo para bacterias y parásitos, tránsito intestinal, test del aliento de Xilosa y biopsia intestinal para el estudio histológico y para la investigación de parásitos en el jugo duodenal.

Para valorar las bronquiectasias, esplenomegalia y aumento de ganglios linfáticos, se recogieron los resultados del TAC toraco-abdominal realizado a cada paciente a lo largo de su último control clínico regular en el año 2004-2005. En los pacientes con bronquiectasias se valoró la presencia o no de expectoración. Los parámetros de función pulmonar que se valoraron fueron el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEMS) y la capacidad vital forzada (CVF). Los valores se expresaron como porcentaje de los predictivos establecidos por Roca *et al*<sup>130</sup>. Enfermedad pulmonar crónica (EPC) fue definida cuando en los pacientes con bronquiectasias los valores en la espirometría fueron inferiores al 80% de los valores predictivos<sup>130</sup>.

En los pacientes con IDVC se recogieron también los siguientes datos: edad al inicio de los síntomas y al diagnóstico (para calcular el retraso diagnóstico);

edad de inicio del tratamiento sustitutivo (para calcular la cantidad de meses en tratamiento) y niveles de inmunoglobulinas, subclases de IgG y la valoración de la capacidad de formación de anticuerpos específicos en el momento del diagnóstico.

### 3.3.3 Subpoblaciones linfocitarias

La cuantificación de los linfocitos T, B y NK se realizó en la Unidad de Inmunología del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) mediante citometría de flujo (CMF, ver plantillas de análisis de subpoblaciones linfocitarias, Anexo N°1) en un FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences [BDBs], San Jose, CA, EEUU) con los siguientes anticuerpos monoclonales (AcMo) marcados con fluorocromos suministrados por la misma empresa comercial: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD16+anti-CD56. En la **tabla 8** se muestran las subpoblaciones linfocitarias así identificadas y los rangos de referencia, en porcentajes y números absolutos.

Tipo de marcador CD utilizado	Características linfocitarias	Rango de normalidad	
		%	$\times 10^9 / l$
CD3+	Linfocito T (LT)	55.0 – 84.0	0.69 – 2.54
CD4+ CD3+	LT colaboradores	31.0 – 60.0	0.41 – 1.59
CD8+ CD3+	LT citotóxicos	13.0 – 41.0	0.19 – 1.14
Índice CD4+/CD8+		1.1 – 1.4	
CD19+	Linfocitos B (LB)	6.0 – 25.0	0.09 – 0.66
CD56+ CD16+ CD3-	NK	5.0 – 27.0	0.09 – 0.59

**Tabla 8:** Subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica. Se muestran los marcadores CD que identifican las subpoblaciones linfocitarias y sus rangos de normalidad para la población adulta.

El porcentaje de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados se evaluó utilizando el anticuerpo anti-HLA-DR suministrado por la misma empresa comercial.

### 3.3.4 Función linfocitaria

La valoración de la función de los linfocitos T se realizó igualmente en la unidad de Inmunología del HUVH, mediante CMF en linfocitos previamente estimulados<sup>131</sup>. Se detectó la expresión de la molécula CD69 (con el AcMo anti-CD69 marcado con fluorocromo, suministrado por BDBs) en células T CD3+, CD4+ y CD8+ tras la estimulación con PHA (Phytohemagglutinin de GIBCO, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) y anti-CD3 (PeliCluster CD3 de Sanquin Amsterdam, Holanda) durante 16 horas.

Los rangos de referencia en porcentajes fueron los siguientes:

CD69+ CD3+ en respuesta a PHA ..... > 65 %

CD69+ CD4+ en respuesta a Anti- CD3.....> 46 %

CD69+ CD8+ en respuesta a Anti- CD3.....> 31 %

### 3.3.5 Inmunoglobulinas séricas

La cuantificación de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM se realizó en los Laboratorios Clínicos del HUVH por un método de turbidimetría en Olympus AU 5400 (Goffin Meyvis, Hoeilaart, Bélgica). Los valores de referencia para la edad adulta fueron: IgG = 850 - 1600mg/dl, IgA = 75 - 350mg/dl, IgM = 58 - 250mg/dl.

### 3.3.6 Subclases de Inmunoglobulinas

La cuantificación de subclases de IgG se realizó en la Unidad de Inmunología del HUVH por un método de ELISA. Los valores de referencia establecidos para la edad adulta fueron<sup>132</sup>: IgG1 = 261 - 1081 mg/dl, IgG2 = 112 - 408 mg/dl, IgG3 = 22 - 288 mg/dl, IgG4 = 5 - 156mg/dl.

### 3.3.7 Producción de anticuerpos específicos

La valoración de la capacidad de producción de anticuerpos específicos se realizó en la Unidad de Inmunología del HUVH por un método de ELISA. Se valoró la producción de los anticuerpos frente a antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo B (HiB). Para la vacunación de los pacientes se utilizaron la vacuna pneumocócica PNU-Immune 23 polivalente (Lederle Laboratories División, Pearl River, NY), que incluía 23 serotipos y la vacuna PedvaxHiB (Merck Sharp & Dohme, West Point, PA). Para valorar la respuesta positiva se midió la concentración de los anticuerpos específicos en dos muestras, una antes de la administración de la vacuna y otra 21 días después<sup>133,134</sup>.

La determinación de anticuerpos específicos frente a *Streptococcus pneumoniae* se realizó por un método de ELISA utilizando como el antígeno la vacuna pneumocócica, la misma que se utilizó para la vacunación de los pacientes. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA) utilizando un suero de referencia calibrado frente a una preparación llamada PN-A, procedente de la European Quality Scheme (Oxfordshire Health Authority, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom) con el valor asignado de 70 unidades/ml de IgG anti-neumococo. Se consideró respuesta positiva, el aumento de la concentración de IgG anti-neumococo de al menos 395 UA/ml sobre el valor basal (el valor prevacunal)<sup>133</sup>.

La determinación de anticuerpos específicos frente a HiB se realizó por un método de ELISA utilizando como antígeno el polisacárido HiB conjugado a albúmina sérica humana, descrita por M.J. Rodrigo y colaboradores<sup>134</sup>. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/ml}$  utilizando el suero de referencia de 70  $\mu\text{g/ml}$  de Center of Biological Evaluation and Review, U.S. Food and Drug Administration (FDA). Se consideró respuesta positiva, el aumento de la concentración de IgG anti-HiB de al menos 2,28  $\mu\text{g/ml}$  sobre el valor basal (el valor prevacunal)<sup>134</sup>.

### **3.3.8 Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B**

La cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B (LB) se realizó según el protocolo cedido por el Dr. Piqueras<sup>87</sup>.

#### **3.3.8.1 Preparación de la muestra**

##### **1. Tipo de muestra**

Se utilizaron 5 mL de sangre venosa periférica, con EDTA 0,05% como anticoagulante de los controles sanos y pacientes con IDVC incluidos en el estudio. La extracción se realizó en el momento previo a la administración del tratamiento sustitutivo con gammaglobulina intravenosa.

##### **2. Obtención de células mononucleadas mediante gradiente de densidad.**

- a. La muestra de sangre periférica fue diluida a 1:2 con solución fisiológica y posteriormente depositada cuidadosamente sobre 3 ml de Lymphoprep (Fresenius Kabi Norge AS, Noruega) en tubo de plástico de 10 ml. La relación fue de 1/3 de Lymphoprep y 2/3 de sangre diluida.
- b. Posteriormente se centrifugó a 1750 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente.
- c. Una vez centrifugada se extrajo la capa blanca de células mononucleadas que apareció sobre la capa del Lymphoprep y se colocó en otro tubo de plástico de 10 ml para proceder a su lavado.
- d. Finalmente se realizaron dos lavados con solución fisiológica a 1250 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

##### **3. Recuento y viabilidad celular, suspensión celular**



- a. El botón celular obtenido tras el último lavado realizado se resuspendió en 900  $\mu$ l del RPMI 1640 de GIBCO (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, EEUU)
- b. Se mezclaron 10  $\mu$ l de las células con 10  $\mu$ l de azul tripán y posteriormente se colocaron 10  $\mu$ l de la mezcla en una cámara de Neubauer.
- c. Las células vivas (que no han captado el colorante) se contaron en un microscopio óptico a 40x y se desestimaron las muestras que tenían más de un 5% de células muertas.
- d. Finalmente las células se resuspendieron en RPMI 1640 hasta conseguir una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml.

#### 4. Tinción celular

Para la tinción de células mononucleadas separadas de sangre periférica se utilizaron los siguientes AcMo: anti-CD19 conjugado con PC7 de Immunotech (Immunotech, Marseille, Francia), anti-IgD conjugado con FITC de Dako (Dako A/S, Dinamarca) y anti-CD27 conjugado con PE de Southern Biotech (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) con el siguiente protocolo:

1. Se colocó 50  $\mu$ l de la suspensión celular preparada en el paso anterior en un tubo de poliestireno
2. A dicha suspensión se añadieron los anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos, en la dilución y cantidad indicada en la **tabla 9**.
3. La suspensión celular así preparada se agitó suavemente y se incubó a 4°C, en la oscuridad durante 20 minutos.
4. A cada tubo se añadió 2 ml de Solución de lisis de BDBs y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en oscuridad.
5. Los tubos se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a 20°C.
6. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de FACSFlow de BDBs.

Anticuerpo monoclonal	Dilución Previa	μL /tubo
Anti-CD19-PC7	Ninguna	2
Anti-IgD-PE	1:40	4
Anti-CD27-FITC	1:5	4

Tabla 9. AcMo utilizados para la tinción de las células mononucleadas.

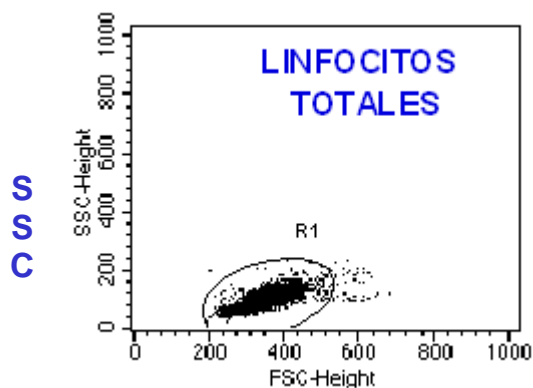
### 3.3.8.2 Análisis de las subpoblaciones de linfocitos B

Las muestras se adquirieron y analizaron en un citómetro FACSCalibur de BDBs que tiene incorporadas dos fuentes de laser (de 488 nm y de 633 nm). En la **figura 6** se muestran las plantillas elaboradas con la versión 3.2 del programa CellQuest de BDBs para la adquisición y análisis de las muestras.

En cada estudio se incluyó una muestra de sangre control para establecer los límites de positividad y negatividad para cada fluorocromo y cada AcMo. La adquisición se limitó a la ventana creada en linfocitos, seleccionados en función de tamaño y granularidad (FSC y SSC, ver la región R1 en la figura 6) y se terminó una vez adquiridas 5.000 células CD19+ (ventana en FL-3, ver la región R2 en la figura 6).

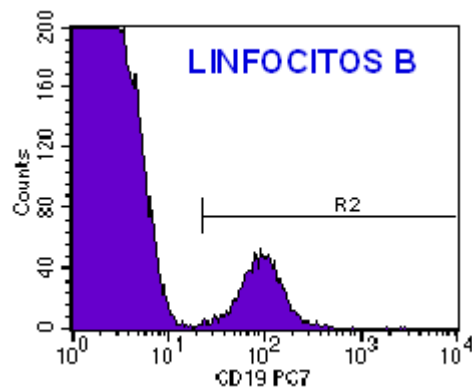
Con este diseño de plantillas se pudo identificar y cuantificar las siguientes subpoblaciones de LB de sangre periférica<sup>87</sup>: a) Subpoblación de LB naive: LB CD27-IgD+, b) Subpoblación de LB de memoria sin cambio de isotipo: LB CD27+IgD+, y c) Subpoblación de LB de memoria con cambio de isotipo: LB CD27+IgD- (figura 6).

**Subpoblaciones de Linfocitos B (LB)  
determinadas mediante citometría de flujo.**



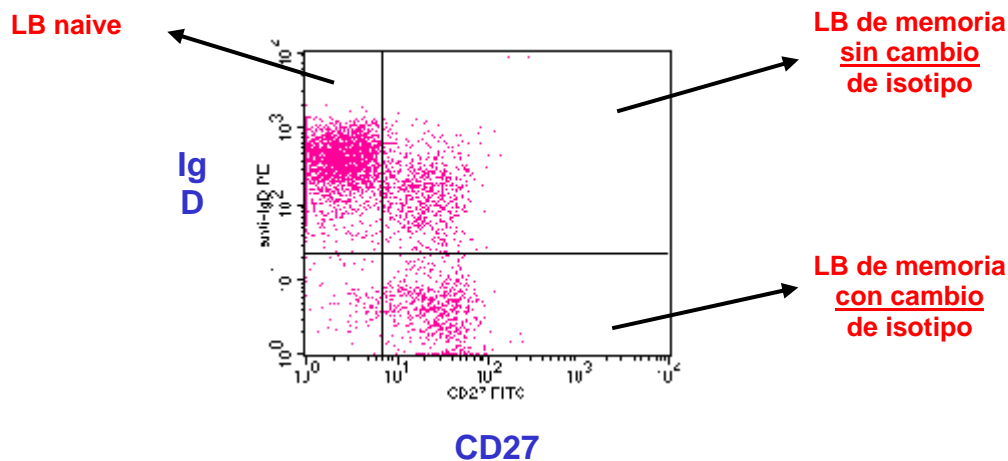
**FSC**

La región **R1** contiene los linfocitos totales obtenidos de sangre periférica mediante centrifugación en un gradiente de densidad (Lymphoprep) y seleccionados en función de tamaño (FSC) y granularidad (SSC).



**CD19**

La región **R2** contiene los linfocitos B seleccionados con el marcador de superficie CD19.



Subpoblaciones de LB:

LB de memoria **sin cambio** de isotipo son células CD27+IgD+ (cuadrante superior derecha).  
 LB de memoria **con cambio** de isotipo son células CD27+ IgD- (cuadrante inferior derecha).  
 LB naive son células CD27-IgD+ (cuadrante superior izquierda).

**Figura 6.** Plantillas para la adquisición y análisis de las subpoblaciones de linfocitos B (LB) elaboradas con el programa CellQuest de Becton Dickinson Biosciencias (San José, California).

### 3.4 Estudio de la expresión de ICOS

#### 3.4.1 Obtención de datos:

Aquí seleccionamos los pacientes que tuvieron mas familiares con alguna inmunodeficiencia primaria y/o enfermedades autoinmunes, además de pacientes que su diagnóstico inicial fue DIgA y posteriormente cambiaron a IDVC. En ellos se recopilaron los datos clínicos como: enfermedades respiratorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades neoplásicas y enfermedades digestivas.

Al igual que los datos inmunológicos al diagnóstico: concentración de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), poblaciones linfocitarias y función linfocitaria. Se muestran en las **tablas 10, 11, 12 y 13**, los datos de estos pacientes por familias así como su pedegree.

**Tabla 10.** Familia (1) DC

	Hermano	Hermana 1	Hermana 2	Hermana 3	Padre
Clínica	IVRS Enfermedad de Crohn, DIgA	Tiroiditis autoinmune	Bronquitis, Neumonía, DIgA	Otitis de repetición, Anemia ferropénica, diarreas, DIgA	Neumonía, Bronquiectasias, IDVC
Hemoglobina	5.5	13.9	11.7	12.7	
Leucocitos	15,700	4,200	5,800	6,700	13,200
Plaquetas	301,000	26,100	232,000	286,000	259,000
IgG / IgG2	1467/540	915	1,628/280	2132/ 1200	80
IgA	<10	122	<10	<10	<10
IgM	131	116	151	93	<10
CD3	64% - 1,152	81 %	79% - 1896	78% - 1560	73%
CD4	31% - 558	47 %	42% - 1008	48% - 960	18%
CD8	32% - 576	33 %	35% - 840	27% - 540	53%
CD19	8% - 144	8%	9% - 216	13% - 260	13%
CD16/56	25% - 450	11%	11% - 264	7% - 140	15%
Índice CD4/CD8	1	1.4%	1.2	1.8	0.34
HLA DR+ CD8	4%			6%	
HLA DR+ CD4	3%			15%	
PHA					NH
OKT3					NH
CD27+CD19+					38.86%
HLA	A, B57, DR7		A, B57 DR7	A, B8 DR3,DR7	

**Tabla 11.** Familia (2) MC

	<b>Madre</b>	<b>Padre</b>	<b>Paciente</b>	<b>Hermano 1</b>	<b>Hermano 2</b>
Clínica	Síndrome Malabsorción	Síndrome febril persistente	IDVC		Bronquitis, ARJ, alergia
Hemoglobina	12.4	17		14	16.3
Leucocitos	9,600	7,600	7,300	3,900	5,600
Plaquetas	250,000	212,000		260,000	208,000
IgG / IgG2	546	1070/69	639	981/123	931 – 734
IgA	121	195	<7	97	179 – 153
IgM	43	89	66	62	88 – 40
CD3	79% - 2,370	83% - 3156	78	63% - 2,450	
CD4	61% - 1830	37% - 1440	46	36% - 1414	
CD8	17% - 520	44% - 1697	33	23% - 897	
CD19	6% - 180	10% - 371	10	18% - 702	
CD16/56	12% - 360	5% - 187	12	14% - 546	
Índice CD4/CD8	3.6	0.8	1.39	1.6	
PHA			150%		
OKT3			16%		
CD27+CD19+			18.09 %		

ARJ=Artritis reumatoide juvenil

**Tabla 12. FAMILIA (3) CU**

	<b>Madre</b>	<b>Paciente 1</b>	<b>Paciente 2</b>	<b>Paciente 3</b>
Clínica		IDVC, bronquiectasias	Rx. DPT, Diarrea prol.	Celulitis, sepsis
Hemoglobina		12.3	12.4	12.9
Leucocitos		8,300	5,000	7,200
Plaquetas		323,000	294,000	316,000
IgG		447	404	280 - 437
IgA		140	16	10 - 52
IgM		20	<10	32 - 21
CD3		77% - 3024	66% - 5443	75% - 2,800
CD4		50% - 1512	48% - 2613	53% - 1484
CD8		29% - 877	16% - 871	23% - 644
CD19		19% - 575	22% - 1197	18% - 504
CD16/56		8% - 242	10% - 544	5% - 140
Índice CD4/CD8		1.7	3	2.3
PHA		82%	81%	
OKT3		116% - 27%	28%	
CD27+CD19+		4.2 %		

Rx. DPT= Reacción a DPT

**Tabla 13.** Cuatro pacientes que inicialmente presentaban deficiencia de IgA y posteriormente desarrollaron deficiencia de las otras inmunoglobulinas por lo que se les cambio el diagnóstico de IDCV. Se muestra en la siguiente tabla los datos clínicos de estas pacientes.

	<b>Paciente 1 (A)</b>	<b>Paciente 2 (V)</b>	<b>Paciente 3(S)</b>	<b>Paciente 4 (E)</b>
Clinica	Diarrea, artritis crónica juvenil, giardiasis, atrofia de vellosidades	Bronquiectasias, neumonías, neutropenia autoinmune	Vitiligo, hepatitis autoinmune	
Deficiencia de IgA	9 años de edad	7 años de edad	8 años de edad	14 años
IDVC	17 años de edad	8 años de edad	14 años de edad	26 años
Hemoglobina	11.7	13.5 – 14.1	12.2 – 13.7	
Leucocitos	11,000	5,170 – 5,400	4,000 – 6,000	5,900
Plaquetas	228,000	174,000 – 162,000	117,000 – 167,000	218,000
Neutros	76.2	42.4 – 32.3	57.8 – 56.3	62%
Linfos	15.5	44.6 – 57.00	33.8 – 35.2	33%
IgG	484	815 – 1044	574 – 675	663
IgA	<10	12 - <5	<7 - <5	< 7
IgM	22	21 - <5	92 – 59	29
Linfocitos totales	72%	93%	72%	68%
CD4+	35%	23%	32%	46%
CD8+	35%	71%	38%	26%
Indice 4/8	1	0.32	0.84	1.7
CD19+	20%	2%	21%	15%
CD16/56+		3%	8%	14%
PHA				123%
OKT3				39%
CD27+CD19+				7.21%

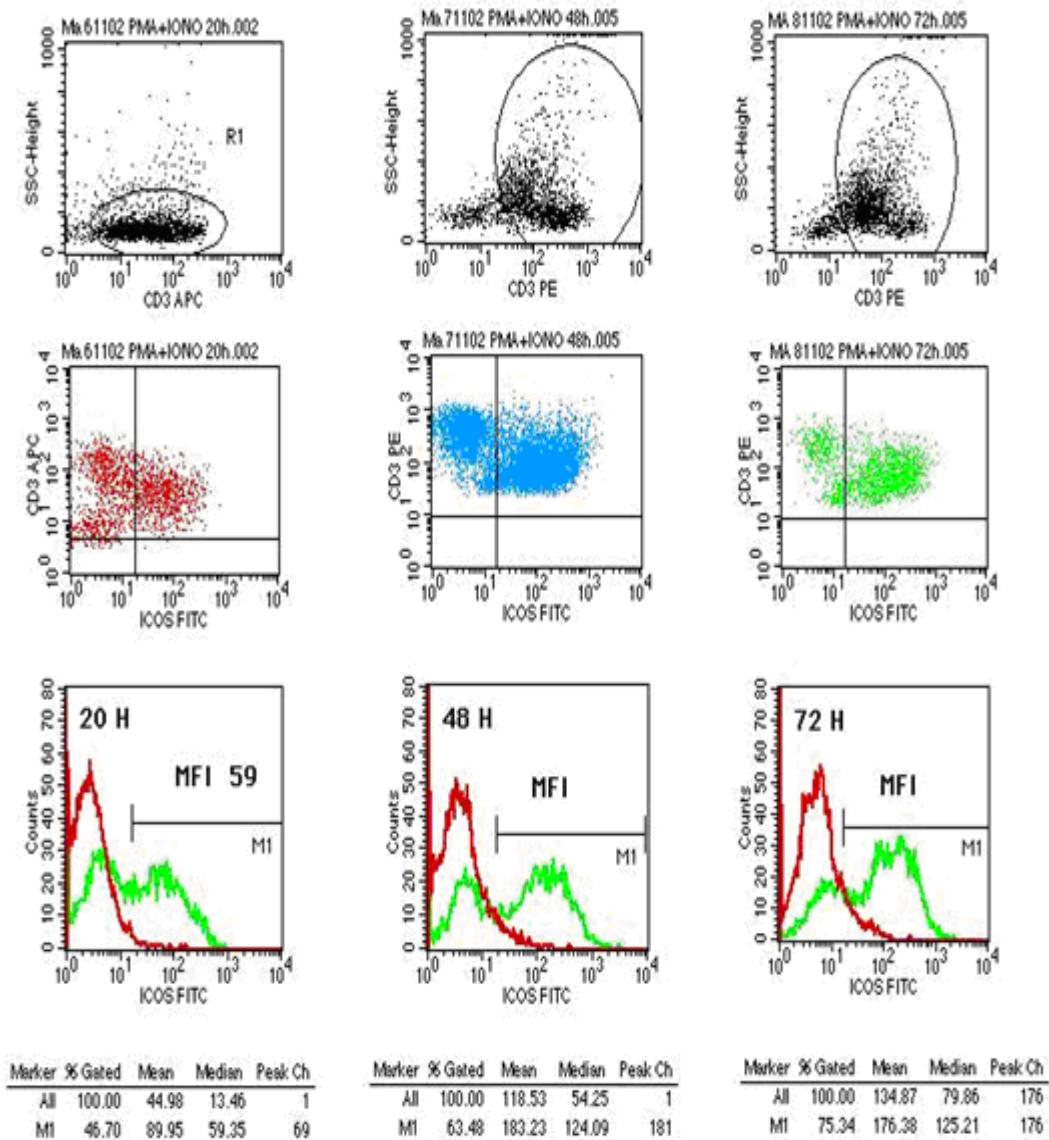
### 3.4.2 Preparación celular y estimulación

1. Separación de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) heparinizada por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.
2. Se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 1 ml de RPMI 1640 suplementado con penicilina, estreptomycin, L-glutamina y suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS). Estas se incubaron con 10  $\mu$ l PMA (100 ng/ ml) (Sigma) más 10  $\mu$ l ionomicina (1  $\mu$ g /ml) (Sigma), durante 48 horas al 5% de CO<sub>2</sub> y 37° C en el tubo con estímulo.
3. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 1200 rpm y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS.
4. En los tubos 1 (células sin estímulo) y 2 (células con estímulo), se incubaron  $3 \times 10^5$  células/ 100  $\mu$ l, durante 20 minutos con IgG FITC de hamster armenio (donado por el Dr. J.M. Rojo del CSIC, Madrid) como control negativo más anti-CD3 PE (Beckton Dickinson).

5. En los tubos 3 (células sin estímulo) y 4 (células con estímulo), se incubaron  $3 \times 10^5$  células/ 100  $\mu$ l, durante 20 minutos con anti-ICOS FITC (anticuerpo monoclonal de hamster armenio C398.4A, donado por el Dr. J.M. Rojo del CSIC, Madrid) más anti-CD3 PE (Beckton Dickinson).
6. En los tubos 5 (células sin estímulo) y 6 (células con estímulo), se incubaron  $3 \times 10^5$  células/ 100  $\mu$ l, durante 20 minutos con anti-CD69 PE (Beckton Dickinson), como control de activación celular.

#### **3.4.3 Análisis por citometría de flujo de molécula ICOS.**

1. Se selecciona la ventana de los linfocitos activados y se estudia en un histograma (FL1) la expresión de ICOS FITC, utilizando como control negativo las células no activadas. En un histograma en FL2 se analiza la expresión de CD69 en la muestra activada, se utiliza como control negativo las células no activadas, (ver punto 3.3.8.2). **Figura 7.**



**Figura 7.-** Imágenes de la curva de la expresión de ICOS a diferentes tiempos de estimulación en células MN de sangre periférica, en pacientes sanos. Se determino la MFI (Intensidad de fluorescencia media), la cual no hubo diferencia significativa entre los pacientes ( $p < 0.05$ ).



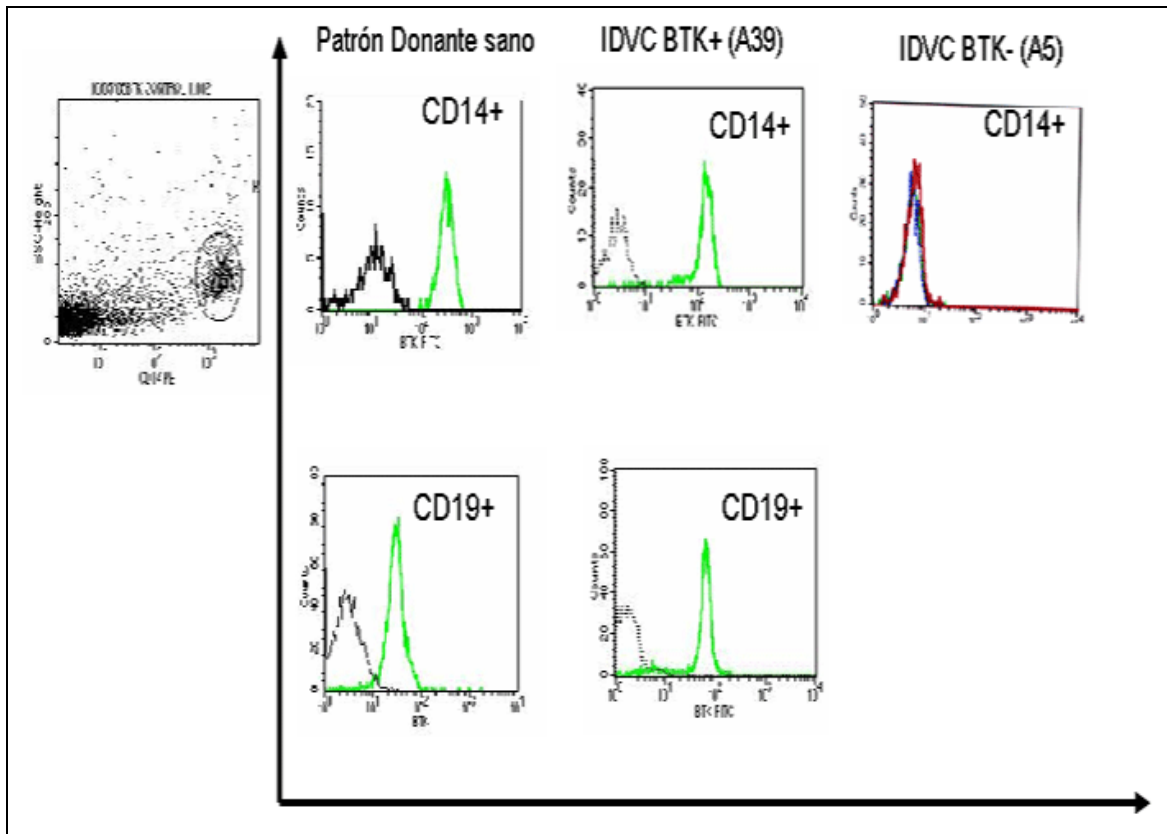
### **3.5 Análisis de la expresión intracelular de Btk por citometría de flujo en monocitos**

#### **3.5.1 Preparación de la muestra**

1. Separación de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) heparinizada por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.
2. Suspender  $1 \times 10^6$  de PBMC en 100  $\mu$ l de PBS en un tubo de polipropileno.
3. Fijar las células en 2 ml de solución lisante (Becton Dickinson) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar una vez en PBS a 1200 rpm durante 5 minutos.
5. Permeabilizar las células en 0.5 ml de solución permeabilizante de (Becton Dickinson) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar dos veces en PBS/A/A (PBS + 1% Albúmina bovina + 0.1% azida sódica) a 1200 rpm durante 5 minutos.
7. Incubar con 50  $\mu$ l de suero de ratón (1:5) diluido en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Incubar con o sin 4  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal anti-Btk (28-2H, IgG1) (40  $\mu$ g/ml) durante 20 minutos en hielo (donado por Dr. T. Miyawaki, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japón).
9. Lavar dos veces en PBS/A/A a 1200 rpm durante 5 minutos.
10. Incubar las células resuspendidas en 50  $\mu$ l de PBS/A/A con 5  $\mu$ l de anticuerpo IgG1 anti-ratón conjugado con FITC (BD) (1:20) durante 20 minutos en hielo.
11. Lavar dos veces en PBS/A/A a 1200 rpm durante 5 minutos.
12. Incubar con 50  $\mu$ l de suero de ratón (1:5) diluido en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Marcar con anticuerpo monoclonal anti-CD14 PE (BD) durante 20 minutos en hielo.
14. Lavar una vez con PBS a 1200 rpm durante 5 minutos.
15. Resuspender en 0.5 ml de PBS.

### 3.5.2 Análisis por citometría de flujo

1. Se selecciona la ventana de monocitos CD14+ (PE) y se estudia en un histograma (FL1) la expresión de Btk FITC, utilizando anticuerpo IgG1 anti-ratón conjugado con FITC como control negativo, (ver punto 3.3.8.2). **Figura 8.**



**Figura 8.-** Se muestran las imágenes de la expresión de la proteína Btk. Del lado izquierdo se muestra la imagen de linfocitos totales, en los cuales se realiza una ventana, mostrando del lado derecho la expresión de monocitos CD14+ en la parte superior, en un paciente sano, otro con IDVC y el tercero un paciente con ALX, y en la parte inferior, monocitos CD19+ en paciente sano y paciente con IDVC. Solo se realizó el estudio en estos pacientes.

## 3.6 ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES

### 3.6.1 Estudio de la expresión de proteínas Btk, Lck, SAP en pacientes con IDVC.

Para el análisis de los datos clínicos en el estudio de la expresión de proteínas se determinaron solo medidas porcentuales, y la expresión positiva o negativa de las bandas de cada una de las proteínas estudiadas.

### 3.6.2 Estudio de los linfocitos B de memoria en pacientes con IDVC.

Para las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria se estableció como punto de corte el valor mínimo obtenido de las determinaciones de estas subpoblaciones en los controles. Dicho valor fue el que mejor diferenciaba los pacientes de los controles y a su vez permitió hacer tres grupos de pacientes: **el grupo BM0** incluyó a los pacientes con LB de memoria totales (LB CD27+) inferior al punto de corte establecido para esta población en los controles, **el grupo BM1** incluyó a los pacientes con LB de memoria con cambio de isotipo (LB CD27+IgD-) inferior al punto de corte establecido para esta población en los controles, y **el grupo BM2** incluyó a los pacientes con LB de memoria totales y LB de memoria con cambio de isotipo (LB CD27+IgD-) superiores a dichos límites.

Una vez clasificados, se comparó el fenotipo clínico de los pacientes en cada grupo BM. Se compararon las frecuencias de diferentes patologías estudiadas en los pacientes, mediante la construcción de las tablas de contingencia y utilizando la prueba de independencia de la  $\chi^2$  de Pearson/Fisher.

## **4. RESULTADOS**

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Estudio de la expresión de proteínas Btk, Lck y SAP en pacientes diagnosticados de IDVC**

#### **4.1.1. Datos demográficos**

Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes con diagnóstico de IDVC de los hospitales Vall d' Hebron (general y materno-infantil) y el hospital de Bellvitge. Fueron un total de 57 pacientes con diagnóstico de IDVC (16 pediátricos y 41 adultos, de los cuales se excluyeron 2), 37 del sexo masculino y 18 del sexo femenino. Con edades comprendidas entre 4 y 76 años con una media de 36.6 años. El 18.1 % de los pacientes tenía familiares de primer grado con antecedentes de IDP (IDVC, deficiencia IgA y deficiencia de subclases) y el 80% restante no presentaba este dato. En relación al peso y la talla, sólo 2 pacientes pediátricos estaban por debajo de los percentiles normales para edad y sexo (retraso ponduestatural), en el resto el peso y la talla estaban dentro de los límites normales.

Observamos que todos los pacientes en el grupo pediátrico iniciaron sus síntomas antes de los 10 años de edad, pero en los adultos obviamente hubo una variabilidad, en el cual el 38.46% (n=15) iniciaron sus síntomas antes de los 10 años de edad y el 33.3% (n=13) fue entre los 10 y 30 años de edad. El intervalo de tiempo entre la aparición de los primeros síntomas y el diagnóstico fue de una media de 3.2 años en el grupo pediátrico. Mientras que en adultos la media fue de 13.1 años (1- 40 años), reportándose parecida a otras series estudiadas [10.88 años (rango 1-65) a 21.49 años (rango 2-42)<sup>19</sup>,] dependiendo de la serie estudiada. Un dato muy significativo fue que el paciente (P10) tuvo un retraso de 10 años en el diagnóstico presentándose con bronquiectasias y datos de insuficiencia respiratoria.

Muchos pacientes se presentan en forma tardía al inmunólogo con lo cual presentan un daño pulmonar bien establecido el cual no es reversible a cualquier grado de terapia con GGEV<sup>35</sup>.

#### **4.1.2 Manifestaciones clínicas**

##### **a) Manifestaciones respiratorias**

Las manifestaciones clínicas respiratorias fueron las más frecuentes en ambos grupos de pacientes con IDVC con un 89% (49/55). Los síntomas más comunes fueron otitis, faringitis, sinusitis y neumonía, causados por infecciones virales y/o bacterianas. El 69.09% de los pacientes tuvieron bronquiectasias al diagnóstico (38/55), cabe aclarar que este problema se presentó mas en los adultos.

##### **b) Manifestaciones digestivas**

Las manifestaciones digestivas estuvieron presentes en un 61.81%, con síntomas como diarrea, dolor abdominal recurrente. La giardiasis estuvo presente en un 23.63% de los pacientes.

##### **c) Manifestaciones autoinmunes**

Al momento de diagnóstico sólo un paciente pediátrico (P16) presentó enfermedad hemolítica autoinmune. En cambio se observó en un 23% de los pacientes adultos, como PTI, AHA, vitíligo, eritema nodoso, etc.

##### **d) Cáncer**

No se diagnosticó de neoplasia en ningún enfermo pediátrico, en cambio en los adultos se observó un 9% de estas patologías (cáncer baso celular de timo, cáncer de parótida, linfoma no Hodking, etc.)

##### **e) Alergia**

Al 12% de todos los pacientes pediátricos (7/55) se le diagnosticó alguna enfermedad alérgica, como asma, rinitis y urticaria.

d) Hiperplasia linfoide

Se encontró en 1 solo paciente adulto correspondiendo al 1.8%.

e) Esplenomegalia

Se observó en un 23.6% de los pacientes también predominó en el grupo de los adultos.

#### 4.1.3 Datos inmunológicos

Los datos inmunológicos recabados, fueron los del momento del diagnóstico en nuestro hospital cuando aún no recibían tratamiento, para valorar adecuadamente las alteraciones inmunológicas. Los datos inmunoquímicos más relevantes fueron: el 98.18% de los pacientes tuvieron una concentración de IgG por debajo de los valores de referencia (un paciente presentaba IgG normal pero tenía IgA e IgM disminuidas A35), mientras que el 90.9% presentaron un déficit de IgA (<10 mg/ dl, el 66%) y el 80% de IgM. El 18.18% tuvieron al menos dos clases de inmunoglobulinas disminuidas y el 76.36% presentaron panhipogammaglobulinemia. En 3 pacientes había solo deficiencia de IgG (no de IgA e IgM), y se catalogaron como IDVC.

En los datos celulares se encontró: 6 pacientes presentaron leucocitosis (11.11%). El 51.85% (28/54) linfocitosis. El 11.11% (6/54) tuvieron unos valores de linfocitos absolutos por debajo de los límites normales. En 20 pacientes se observó linfopenia CD4+ (37.73%). El 26.41% (14/53) de los pacientes tenían unos CD8+ por debajo de los límites de la normalidad. Hubo inversión de cociente CD4+/CD8+ en 22 pacientes (40.74%).

El porcentaje de linfocitos B CD19+ estuvo disminuido en un 28.30% (15/53) de los enfermos, mientras que el 36.53% (19/52) presentó linfopenia B. Se encontró un paciente que tuvo una linfopenia B profunda ( $\leq 1\%$ ) y 3 pacientes en sus primeras determinaciones de CD19+ sus porcentajes estaban normales y en reportes posteriores habían disminuido a 0 o 1%. Las células NK (CD56+) estuvieron disminuidas en un 30% (12/40) de los pacientes. La respuesta a mitógenos (PHA y OKT3) fue parcialmente deficiente en un 12.2% y 25.8% respectivamente.

Algunos datos no se encontraron en el expediente clínico, (no se especifica causa), y no se registraron debido, a que eran datos posteriores a la administración de GGIV y ya estaban alterados, aclarando que no se tomaron en cuenta para los porcentajes.

#### **4.1.4 Edad: primeros síntomas-diagnóstico-tratamiento**

La aparición de los primeros síntomas, fue muy variable ya que en el grupo pediátrico (16/16) fue antes de los 10 años de edad y en un 38.46% de los adultos también fue antes de esta edad. Un 56.25% (9/16) de los pacientes presentó clínica antes de los 2 años. El intervalo de tiempo entre el inicio de síntomas y la edad de diagnóstico varió entre 1 mes y 40 años, los pacientes que se diagnosticaron mas pronto fue debido a que tenían familiares con alguna ID, la media fue de 3.2 años en los pediátricos y de 12.6 años para los adultos. El tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (IGGV) se instauró, en todos los enfermos, desde la fecha de su diagnóstico.

El 70.37% de los pacientes tenían bronquiectasias al diagnóstico. De los pacientes pediátricos el P10 tuvo el mayor retraso en el diagnóstico (10 años) y ya presentaba una importante afectación pulmonar con datos de insuficiencia respiratoria.



Debido a la diversidad de esta patología, encontramos diferencias en ambos grupos, viendo que hay más complicaciones o patologías agregadas en los pacientes adultos, separamos los dos grupos y mostramos el porcentaje de los datos clínicos y de laboratorio por separado. (Tabla 14)

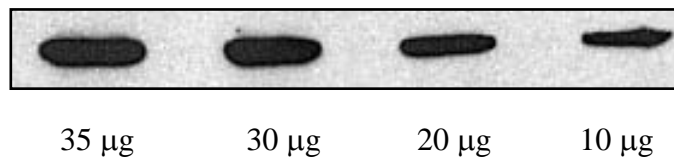
Síntomas	Pediátricos (16)	Adultos (39)
Respiratorios	93.75 %	87.17 %
Bronquiectasias	37.5 %	82.05 %
Digestivos	56.25 %	64.10 %
Giardiasis	12.5 %	28.20 %
Alergias	9 %	0
Esplenomegalia	0 %	23.6 %
Cáncer	0 %	9 %
Enfermedades AI	6.25 %	16.3 %

Parámetros inmunológicos (inferior a valores de referencia)	Pediátricos	Adultos
IgG	100 % (16/16)	97.43 % (38/39)
IgA	87.5 % (14/16)	92.30 % (36/39)
IgM	56.25 % (9/16)	89.74 % (35/39)
3 Igs	43.75 % (7/16)	89.74 % (35/39)
2 Igs	56.25% (9/16)	2.56% (1/39)
Leucocitosis	0	13.15 % (5/38)
Plaquetopenia	0	13.15 % (5/38)
Linfocitos absolutos	6.25 % (1/16)	13.15% (5/38)
CD3 %	18.75% (3/16)	24.32 % (9/37)
CD4 %	6.24% (1/16)	51.35% (19/37)
CD4 absolutos	18.75 % (3/16)	58.3 % (21/36)
CD8 %	56.25 % (9/16)	13.51 % (5/37)
CD8 absolutos	43.75 % (7/16)	22.22 % (8/36)
Índice 4/8	6.25 % (1/16)	55.26 % (21/38)
CD19 %	31.25 % (5/16)	27.02% (10/37)
CD19 absolutos	25% (4/16)	41.66 % (15/36)
NK %	31.25 % (5/16)	29.16 % (7/24)
NK absolutos	12.5 % (2/16)	41.66 % (10/24)
PHA	13.3 % (2/15)	11.11 % (2/18)
OKT3	14.2 % (2/14)	35.29 % (6/17)

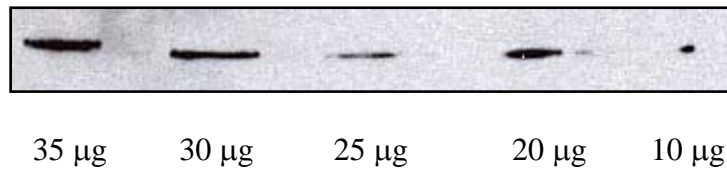
**Tabla 14.-** Como se observa, los datos como cáncer, enfermedades autoinmunes y esplenomegalia, lo encontramos mas en el grupo adulto, lo pacientes pediátricos tenían mucho menos patología agregada. Incluyendo en los datos de laboratorio encontramos más alteraciones en adultos.

#### 4.1.5 Estandarización de la concentración de anticuerpos.

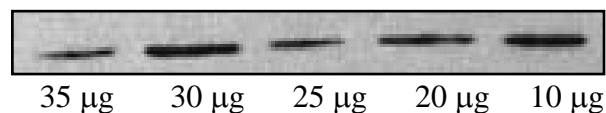
Para estandarizar la técnica con el uso de diferentes anticuerpos, probamos con anticuerpos poli o monoclonales de diferentes compañías comerciales y a diferentes concentraciones. A continuación mostramos las imágenes de los anticuerpos utilizados para el WB.



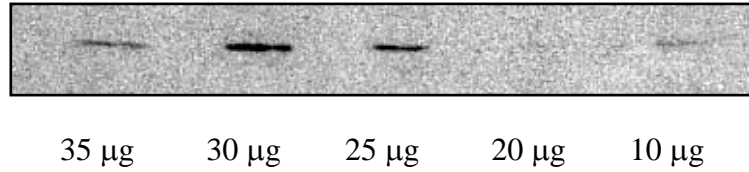
**Figura 9.** Imagen de WB (western blot) donde se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Btk Londres (H360B), a una dilución 1:500 y el anticuerpo secundario anti- conejo HRP a una dilución 1:40,000. Se muestra la cantidad de proteína utilizada en cada pocillo, muestra de controles sanos.



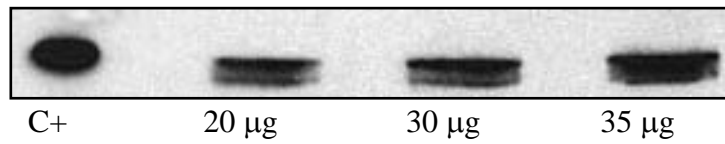
**Figura 10.1.** Imagen de WB donde se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Btk (Transduction Laboratorios), a una dilución 1:250 y el anticuerpo secundario anti- ratón HRP a una dilución 1:10,000. Se muestra la cantidad de proteína utilizada en cada pocillo, muestra de controles sanos.



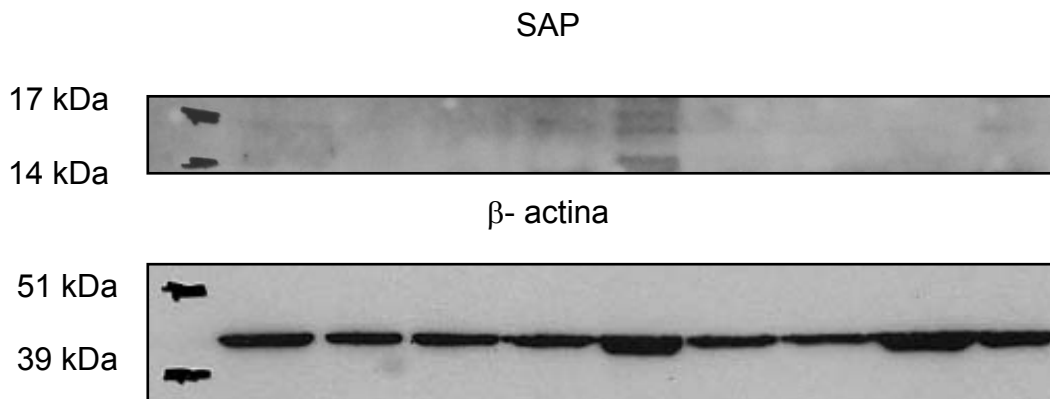
**Figura 10.2.** Imagen de WB donde se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Btk (Transduction Laboratorios), a una dilución 1:250 y el anticuerpo secundario anti- ratón HRP a una dilución 1:5,000. Se muestra la cantidad de proteína utilizada en cada pocillo, muestra de controles sanos.



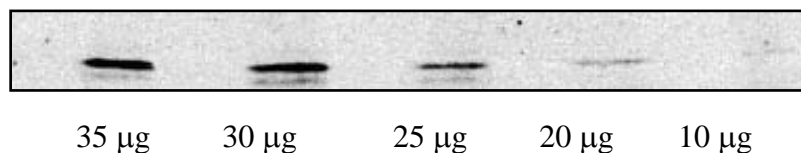
**Figura 10.3.** Imagen de WB donde se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Btk (Transduction Laboratorios), a una dilución 1:250 y el anticuerpo secundario anti- ratón HRP a una dilución 1:5,000. También se muestra la cantidad de proteína de cada muestra. Controles sanos.



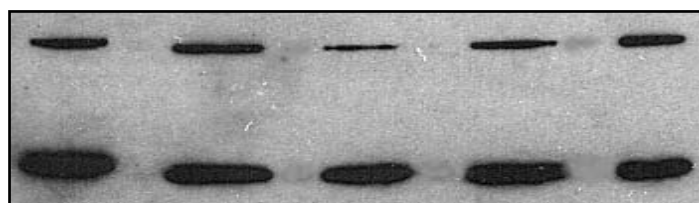
**Figura 11.** Imagen de WB donde se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Lck (Transduction Laboratorios), a una dilución 1:500 y el anticuerpo secundario anti- ratón HRP a una dilución 1:20,000. También se muestra la cantidad de proteína de cada muestra. Controles sanos.



**Figura 12.** Imagen de WB donde se utilizó el anticuerpo policlonal anti-SAP (Santa Cruz), a una dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario anti- conejo HRP a una dilución 1:5,000. También se muestra (debajo) la cantidad de muestra con β-actina. Controles sanos.



**Figura 13.** Imagen de WB donde se utilizó el anticuerpo policlonal anti-SAP (Dra. K. Nichols), a una dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario anti- conejo HRP a una dilución 1:20,000. También se muestra la cantidad de proteína de cada muestra. Controles sanos.



C+      P5      P6      P7      P8

**Figura 14.-** Arriba: anti-Btk monoclonal 1:250, con anti-mouse HRP 1:5,000. Abajo anti-b-actina monoclonal 1:5,000 con anti-mouse a 1:40,000. En esta imagen se muestra la incubación de los dos anticuerpos al mismo tiempo, todos los pacientes expresan la proteína Btk.

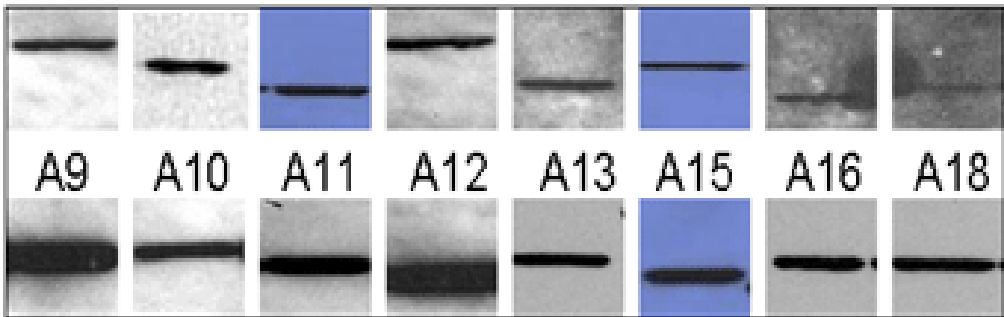
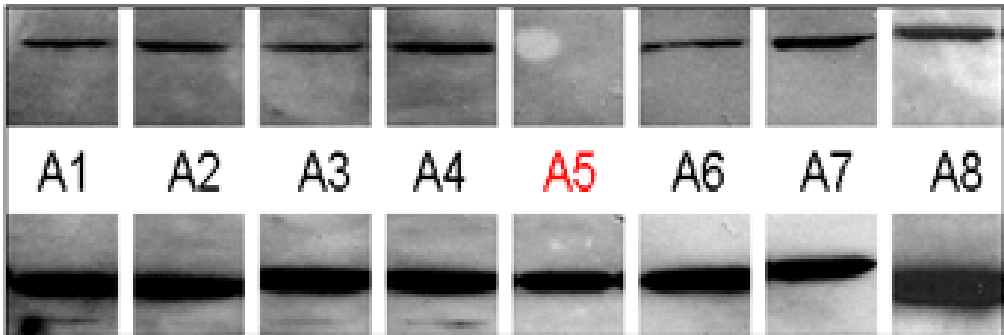
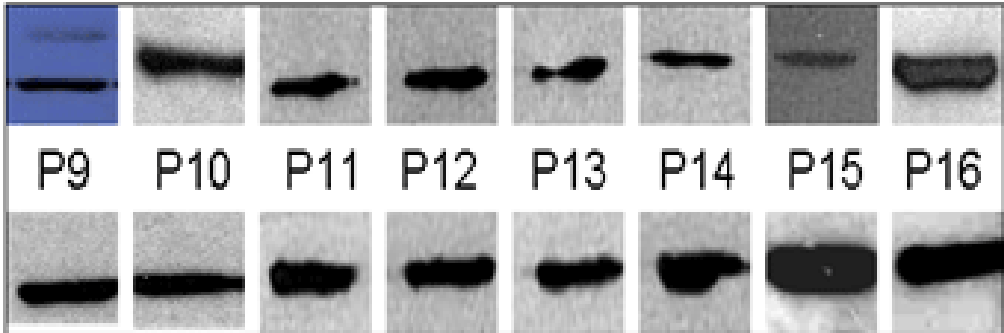
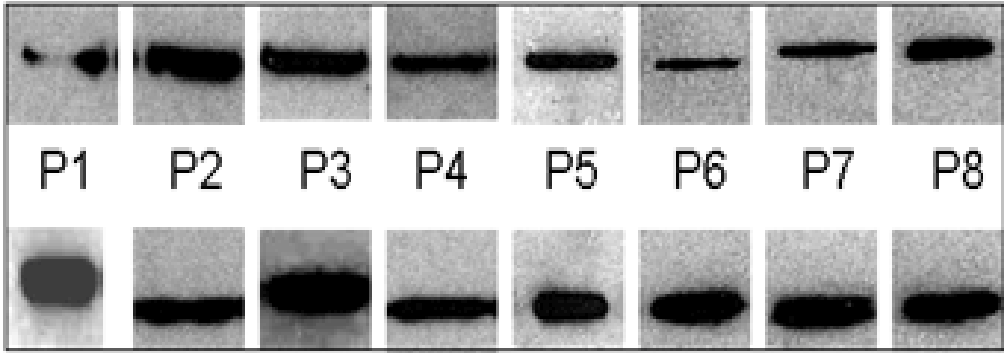
#### 4.1.6 Expresión e imágenes de la proteína Btk (figura15)

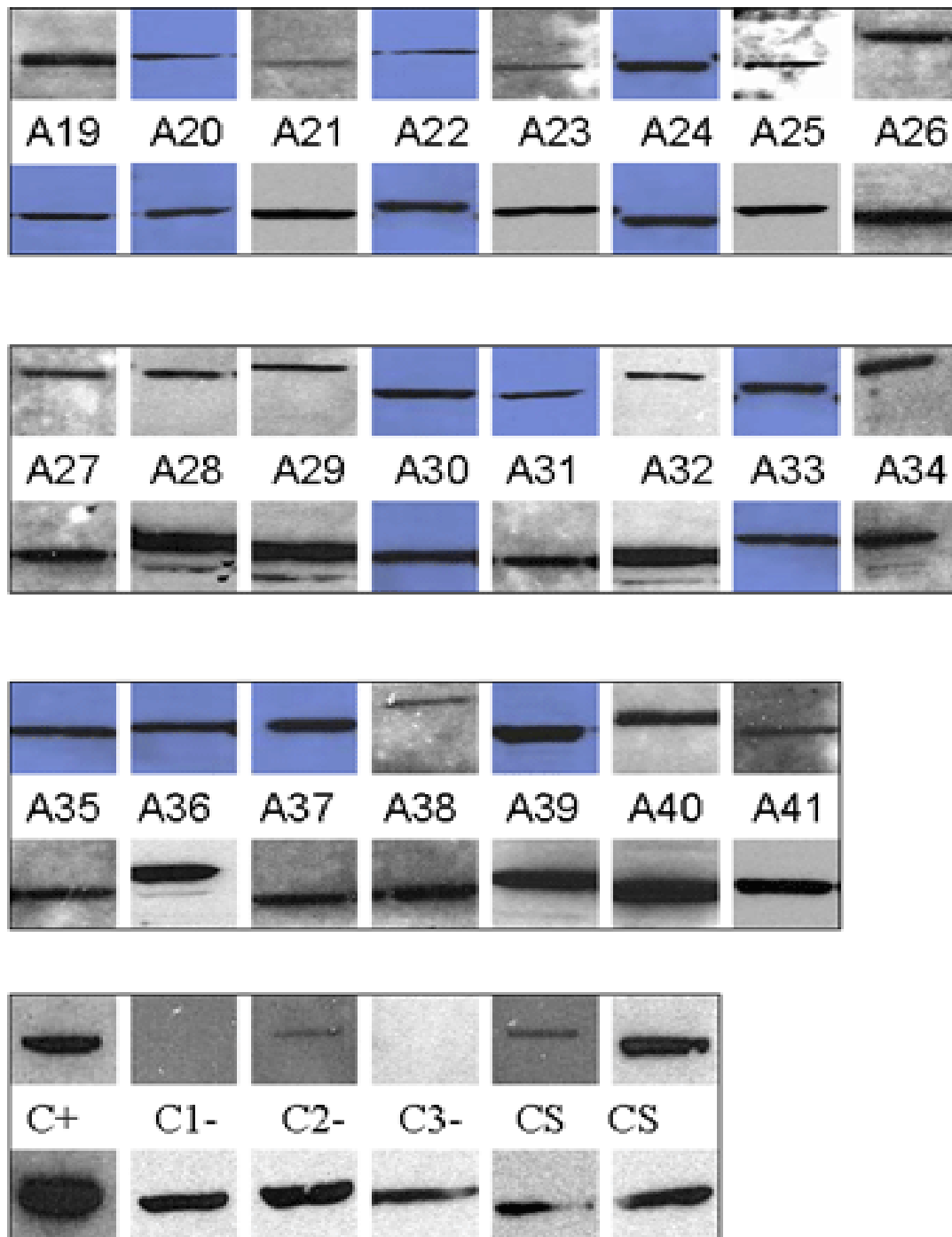
- Pacientes con IDVC y Linfocitos B <1%: A5, A39, de estos solo el paciente A5 no expresó la banda de Btk (**tabla 15**).
- Controles con diagnóstico de XLA ( C1,C2,C3)
- No expresan Btk (C1,C3)
- El control C2 expresa Btk pero su problema es funcional.

Paciente	Edad	Sexo	IgG	IgA	IgM	CD19%	CD19 abs.
A5	29	M	150	0	30	0	0
A39	27	M	83	6	6.2	2%	

**Tabla 15.-** Pacientes A5 y A39, presentan linfopenia a expensas de CD19+, pero solo el paciente A5 no expresa banda para la proteína Btk. Se muestra los niveles de Igs y de CD19+.

Del total de los pacientes estudiados solo un paciente (A5) no tuvo expresión de la banda Btk, que corresponde a un masculino de 29 años de edad, y tiene también el diagnóstico de síndrome de Nonan, se envió muestra sanguínea para el estudio genético, reportándose una mutación en el exón 18 de C1790T, a nivel proteico P597L (realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Paz de Madrid, Dra. MC García). El paciente A39 presentaba una linfopenia a expensas de CD19+ (2%) pero la expresión de su banda fue normal.





**Figura 15.-** Imágenes de Western blot, donde observamos, la proteína Btk (77 kDa) en la parte de arriba, y en la parte de abajo la banda de la proteína  $\beta$ -actina (42 kDa). En la parte inferior de la imagen se muestran los controles, para esta proteína. En todos los pocillos se utilizó 30 mg de proteína.

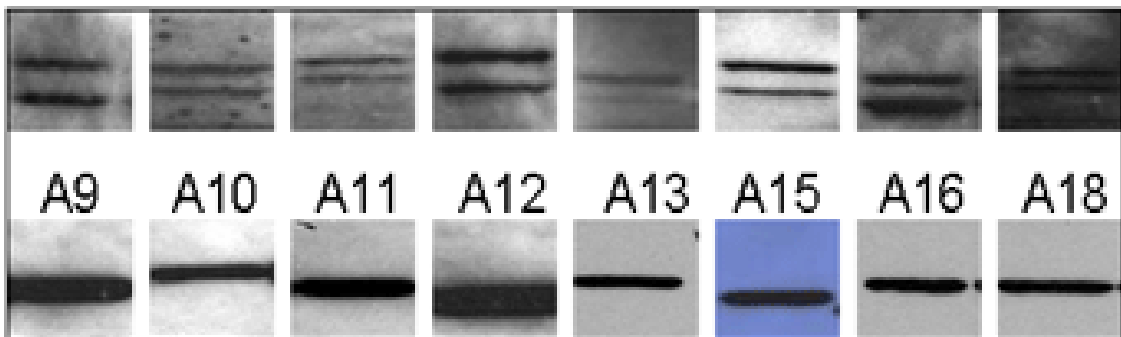
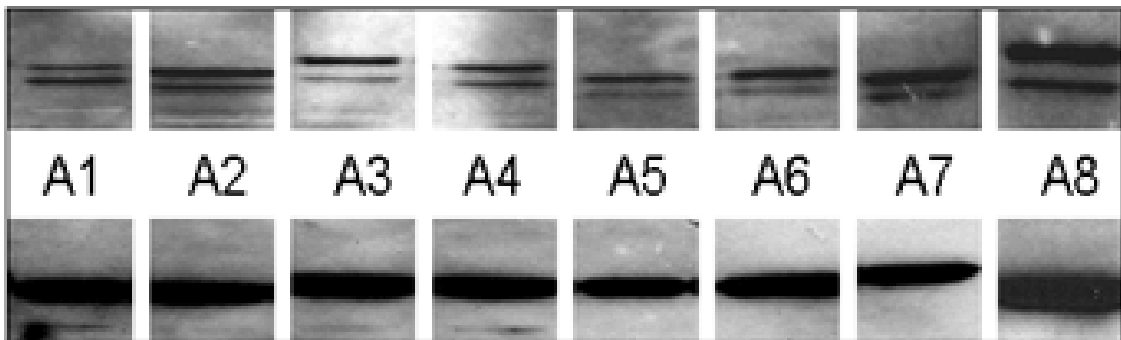
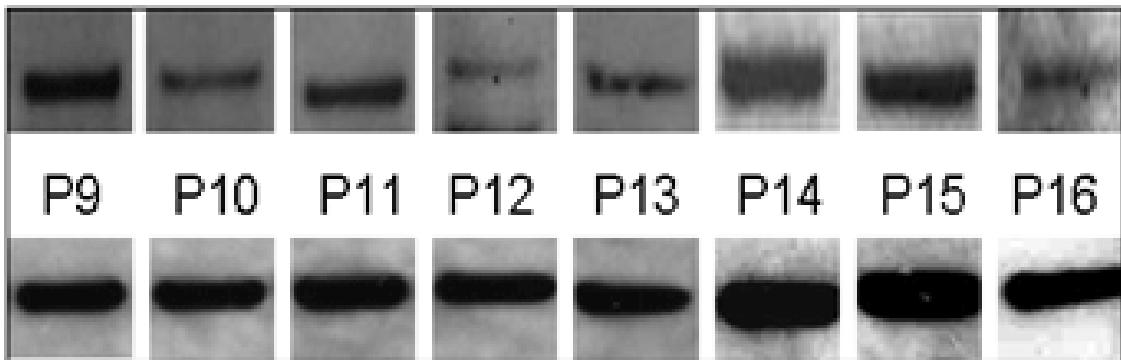
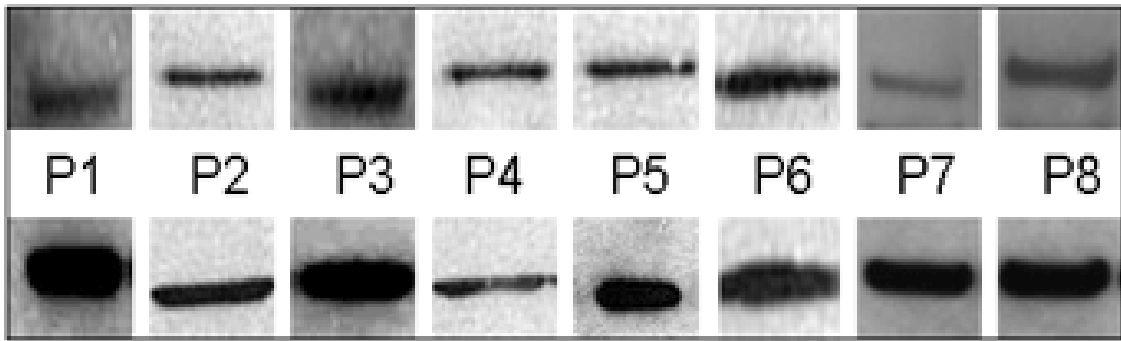
#### 4.1.7 Expresión e imágenes de la proteína Lck (figura 16)

- Pacientes con IDVC y linfopenia CD4+ (tabla 16)
- Pacientes con IDVC y CD4+ normales

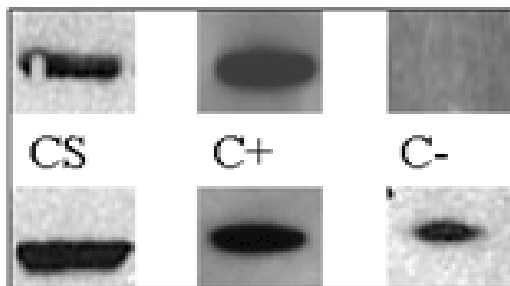
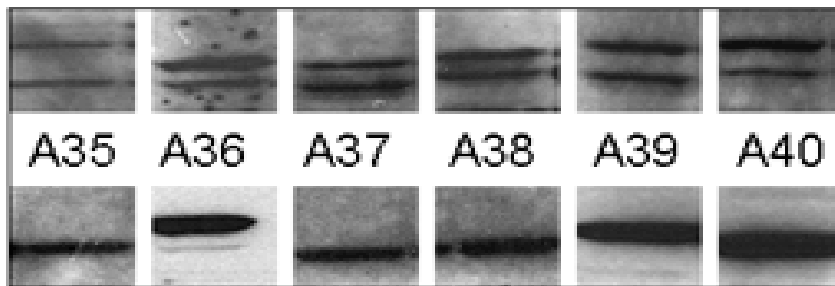
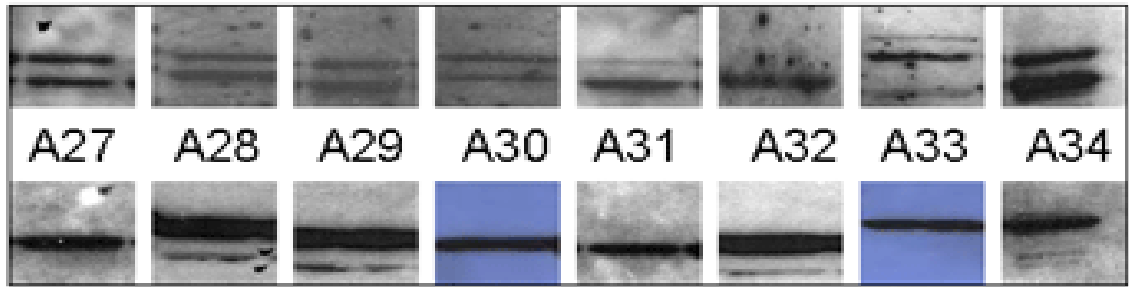
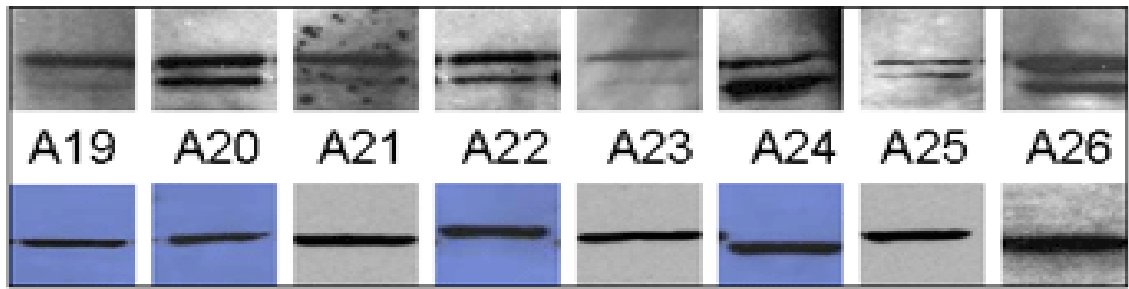
Paciente	Edad	Sexo	CD3%	CD4%	CD4 abs.	CD8%	CD8 abs.
P16	13	F	67	38.4	1407	21	773
A11	63	F	65	39	1638	30	1260
A35	44	M	45	15	201	26	348

**Tabla 16.-** Todos los pacientes expresaron normalmente la Lck, Solo mostramos pacientes con enfermedad linfoproliferativa al diagnóstico, pero no tenían linfopenia a expensas de CD4+.

En el caso de la expresión de la proteína Lck se revisó con mas énfasis a los pacientes que tenían linfopenia a expensas de CD4+ y fueron (24/55) el 43.6% de los cuales ninguno tenía ausencia de la expresión de esta proteína. La paciente P16 tenía al diagnóstico enfermedad linfoproliferativa cerebral, la paciente A11 presentaba granulomas hepáticos y el paciente A35, linfoma de Hodking.







**Figura 16.-** Imágenes de Western blot, donde observamos, la proteína Lck (56 kDa) en la parte de arriba, y en la parte de abajo la banda de la proteína  $\beta$ -actina (42 kDa). En la parte inferior de la imagen se muestran los controles, para esta proteína. En todos los pocillos se utilizó 30 mg de proteína.

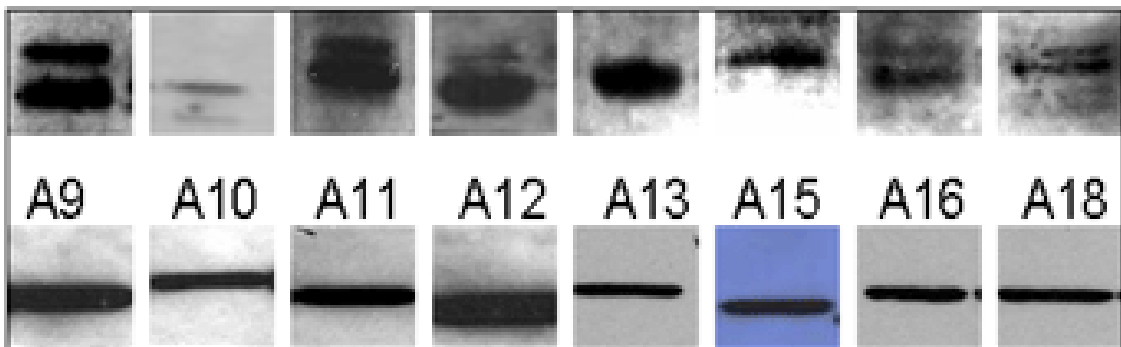
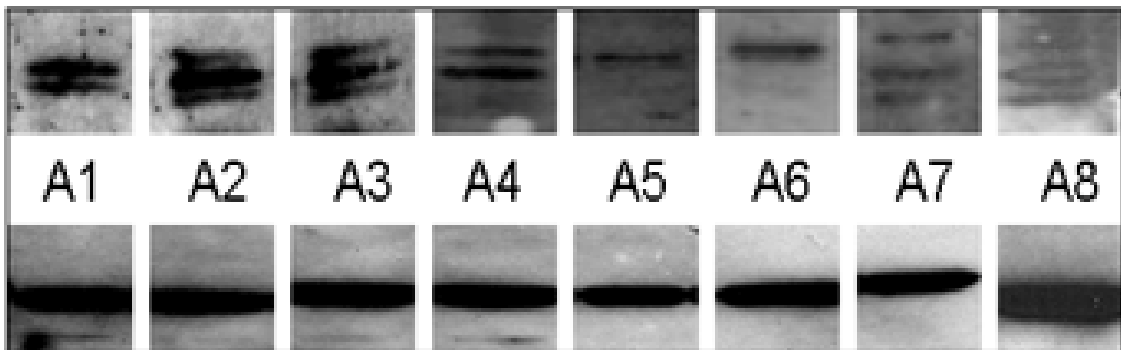
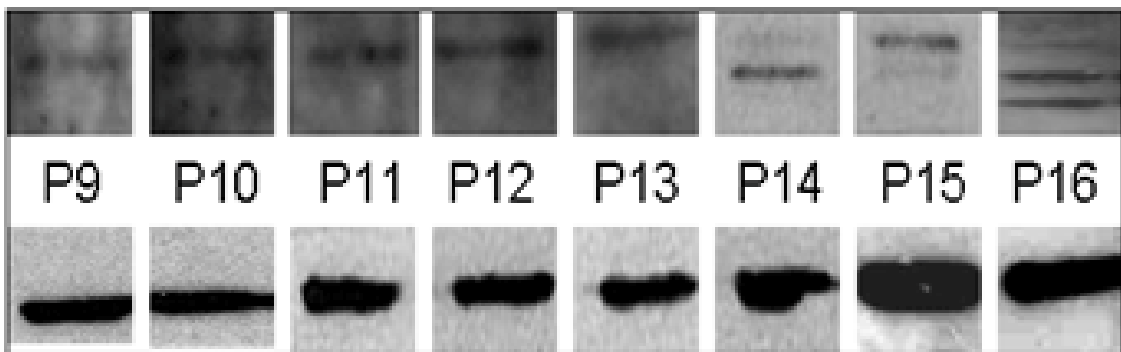
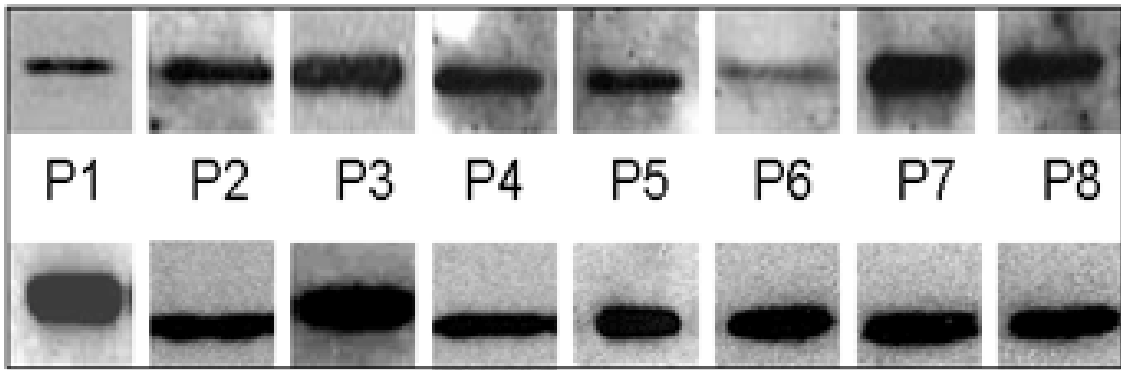
#### 4.1.8 Expresión e imágenes de la proteína SAP (figura 17)

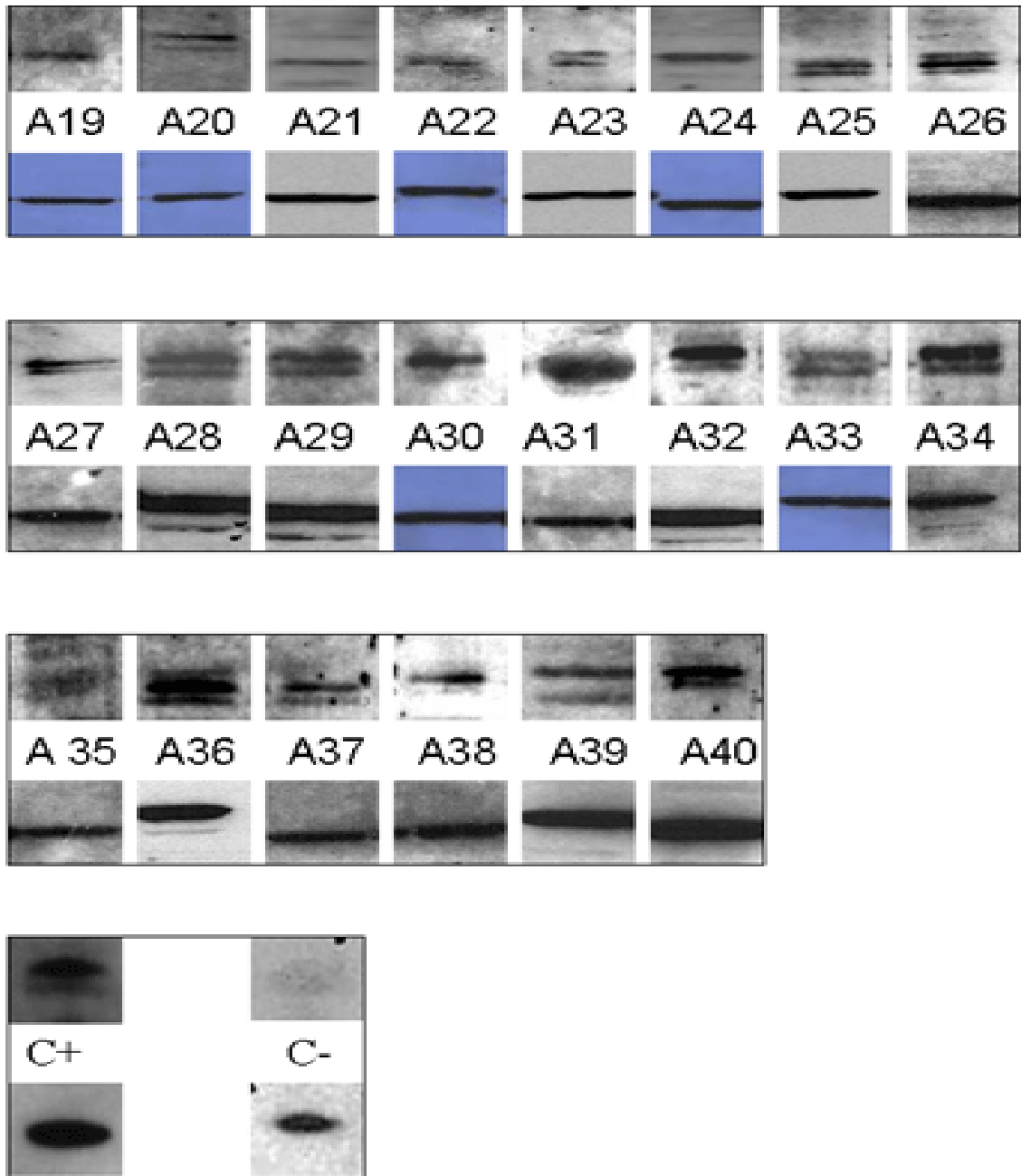
- Pacientes con CMV (+) P4 y A10 (tabla 17)
- Control con diagnóstico de XLP (C4)
- Pacientes con CMV (-).

Paciente	Edad	Sexo	CD3%	CD4%	CD4 abs.	CD8%	CD8 abs.	Banda
P4	15	M	63	20	696	38	1322	Presente
A10	26	M	81	41	776	30	568	Disminuida

**Tabla 17.-** Pacientes con linfopenia CD4 o CD8. Los pacientes P4 y A10 tenían CMV positivo, pero el primero tiene banda presente y el segundo la banda esta disminuida.

La expresión de SAP fue normal en todos los pacientes, en esta proteína usamos como control negativo a un paciente (C4) que tenía diagnóstico de XLP, pero observamos que aunque en forma muy débil expresaba proteína, probablemente debido al tipo de mutación (Tyr100>stop) que produciría una proteína truncada quizás inestable pero que reconocen los anticuerpos anti-SAP. La línea celular no linfocítica (K562) utilizada como control negativo no expresó ninguna banda. Tampoco se re-diagnosticó ningún caso de XLP pero si nos sirvió para descartarlo ya que el P4 tenía una fuerte sospecha clínico-radiológica de esta patología (pendiente resultado genético) y CMV positivo. Otro paciente con CMV positivo fue el paciente A10, pero su banda estaba presente.





**Figura 17.-** Imágenes de Western blot, donde observamos, la proteína SAP (17 kDa) en la parte de arriba, y en la parte de abajo la banda de la proteína  $\beta$ -actina (42 kDa). En la parte inferior de la imagen se muestran los controles, para esta proteína. En todos los pocillos se utilizó 30 mg de proteína.

Nota: Abreviaturas utilizadas: **P=** Pediátrico, **A=** Adulto, **C+=** Control Positivo, **C-** = Control Negativo, **CS=** Control Sano, **C1, C2, C3** = Pacientes con ALX.

## 4.2 ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS B DE MEMORIA EN PACIENTES CON IDVC

### 4.2.1 Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B en controles y pacientes con IDVC

Se analizaron las subpoblaciones de linfocitos B (LB) en muestras de sangre periférica de 41 pacientes con IDVC y 29 controles. En los controles el porcentaje de LB *naive* (media  $\pm$  1DE) fue del 57%  $\pm$  14%, el de LB de memoria totales fue del 39%  $\pm$  13%, el de LB de memoria sin cambio de isotipo fue del 17%  $\pm$  6% y el de LB con cambio de isotipo fue del 22%  $\pm$  8%, **tabla 18**.

**Tabla 18.** Descripción estadística de subpoblaciones de LB en controles y pacientes con IDVC

		LB	LB <i>naive</i>	LB de Memoria (% del total de LB)		
		(% de linf. tot)	(% del total de LB)	totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo
Grupo Control n=29	media	8	57	39	17	22
	DE	3	14	13	6	8
	Valor Mínimo	3	30	13	6	6
	Valor Máximo	16	85	67	32	40

		LB	LB <i>naive</i>	LB de Memoria (% del total de LB)		
		(% de linf. tot)	(% del total de LB)	totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo
Pacientes n=41	media	7	83**	15**	11	3**
	DE	3	16	15	12	5
	Valor Mínimo	2	35	2	2	0
	Valor Máximo	16	95	61	43	27

\*\* diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.000001$ ) comparando con el grupo control.

La distribución de estas subpoblaciones fue muy diferente en los pacientes. Se encontró por un lado, un aumento significativo de la proporción de los LB *naive* ( $p < 0,00001$ ), y por el otro, una disminución significativa de los LB de memoria ( $p < 0,00001$ ), sobre todo a expensas de los LB de memoria con cambio de isotipo, la subpoblación más alterada en la mayoría de los pacientes con IDVC. Estas diferencias no guardaron relación con el porcentaje de los LB totales que no difirió entre el grupo control y los pacientes, ( $8 \pm 3\%$  vs.  $7 \pm 3\%$ , **tabla 18**).

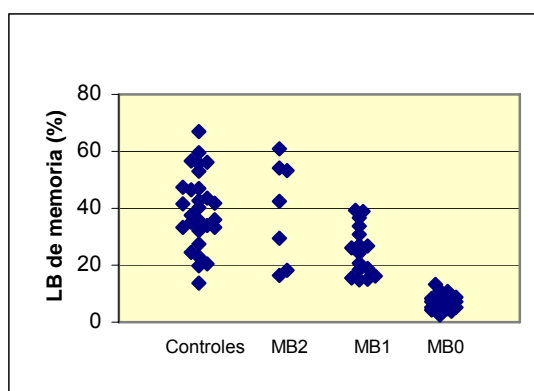
Se confirmó una disminución significativa ( $p < 0,000001$ ) de los LB de memoria en pacientes con IDVC, al compararlos con el grupo control sano. Esta disminución fue debida sobre todo a la disminución de los LB de memoria con cambio de isotipo y no guardaba relación con el número total de LB.

#### 4.2.2 Clasificación de los pacientes con IDVC en grupos según la cuantificación de los LB de memoria.

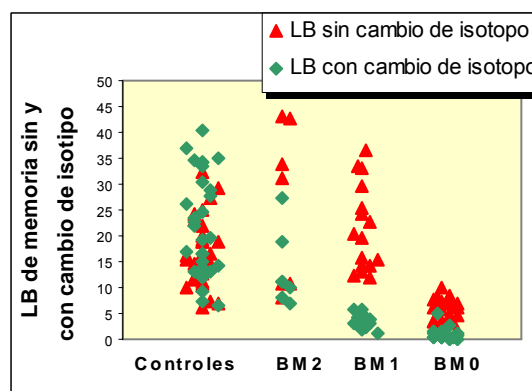
En este estudio, para la clasificación de los pacientes con IDVC en grupos según la cuantificación de las subpoblaciones de los LB de memoria, se utilizó como punto de corte la media menos dos desviaciones estándar de las determinaciones de estas subpoblaciones en los controles. Así el punto de corte para los LB de memoria totales fue el 13% (rombos azules en la figura 18a) y para los LB de memoria con cambio de isotipo fue el 6% (rombos verdes en la figura 18b) del total de los LB de sangre periférica.

Los pacientes que presentaron un porcentaje de los LB de memoria totales inferior al 13% formaron el grupo **BM0**. Este grupo incluyó el 44% (18/41) del total de pacientes estudiados.

A



B



**Figura 18.** Porcentajes de LB de memoria del total de los LB de sangre periférica en diferentes grupos de pacientes. Para más explicaciones ver el texto.

Los pacientes que presentaron un porcentaje de los LB de memoria totales superior al 13% pero los LB de memoria con cambio de isotipo inferior al 6,5% (rombos verdes en la **figura 18b**) formaron el **grupo BM1**. Este grupo incluyó el 39% (16/41) de todos los pacientes estudiados.

Los pacientes que presentaron tanto el porcentaje de los LB de memoria totales (rombos azules en la **figura 18a**) como el porcentaje de los LB de memoria con cambio de isotipo (rombos verdes en la **figura 18b**) superior a los respectivos puntos de corte, formaron el **grupo BM2**. Este grupo incluyó el 17% (7/41) de todos los pacientes estudiados.

En las páginas siguientes se detallan las imágenes de las subpoblaciones de LB, identificadas mediante citometría de flujo, utilizando los marcadores de CD27 e IgD, en todos los pacientes con IDVC estudiados y en 24 de los 29 controles analizados (**figura 19**). Además, en la **tabla 19** están resumidos los parámetros estadísticos descriptivos de las subpoblaciones de LB en cada grupo BM.

**Tabla 19.** Descripción estadística de subpoblaciones de LB en los grupos de pacientes con IDVC

		LB (%de PB MNC)	LB naive (% del total de LB)	LB de Memoria (% del total de LB)		
				totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo
<b>Grupo BM2</b> n=7/41 17%	media	8	58	39	26*	13*
	SD	4	17	17	14	7
	Valor Mínimo	2	35	16	8	7
	Valor Máximo	15	83	61	43	27

		LB (%de PB MNC)	LB naive (% del total de LB)	LB de Memoria (% del total de LB)		
				totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo
<b>Grupo BM1</b> n=16/41 39%	media	8	73**#	25**#	21*	4**#
	SD	3	9	8	8	1
	Valor Mínimo	3	58	15	12	1
	Valor Máximo	12	87	39	36	6

		LB (%de PB MNC)	LB naive (% del total de LB)	LB de Memoria (% del total de LB)		
				totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo
<b>Grupo BM0</b> n=18/41 44%	media	7	91**	7**\$	6**\$	1**
	SD	3	3	3	2	1
	Valor Mínimo	3	86	2	2	0
	Valor Máximo	16	95	13	10	5

\*\*diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.000001$ ) comparando con el grupo control.

\*diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) comparando con el grupo control.

\$ diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.000001$ ) comparando con el grupo BM1

# diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) comparando con el grupo BM2

Mediante la cuantificación de los linfocitos B de memoria (BM) y de sus subpoblaciones (con y sin cambio de isotipo), podemos dividir a los pacientes con IDVC en tres grupos BM: BM0, BM1 y BM2. (Figuras 19, 20, 21, 22).

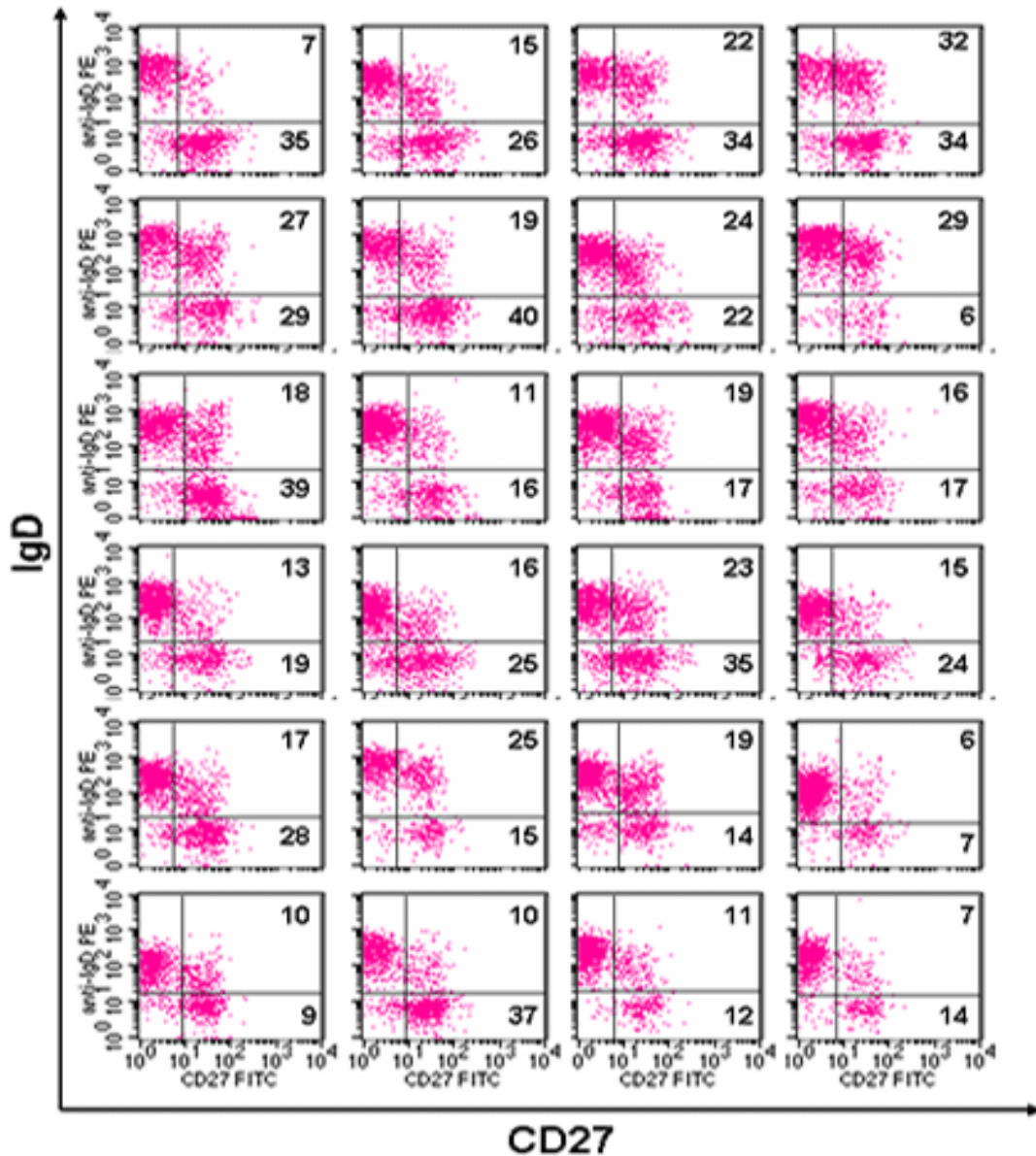
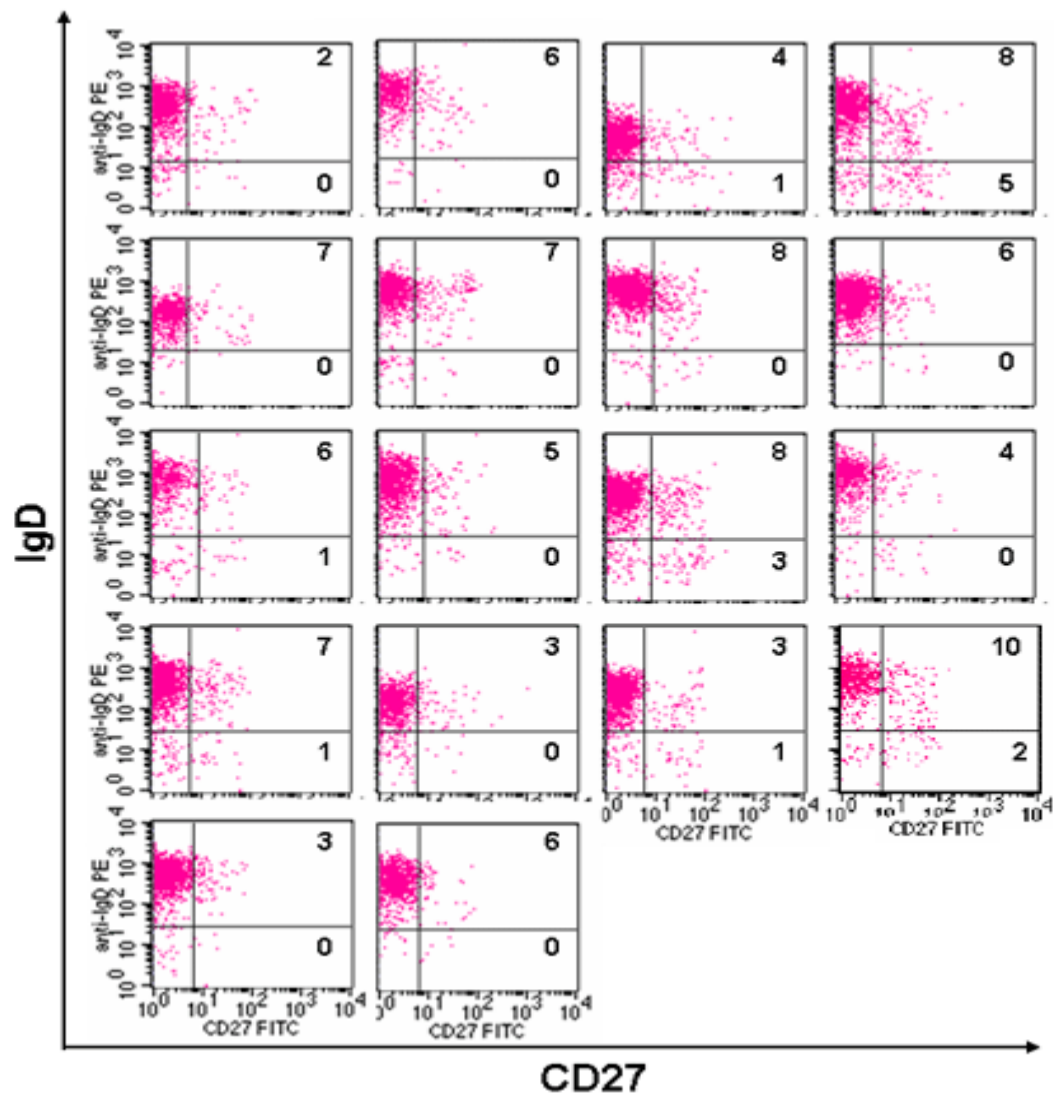
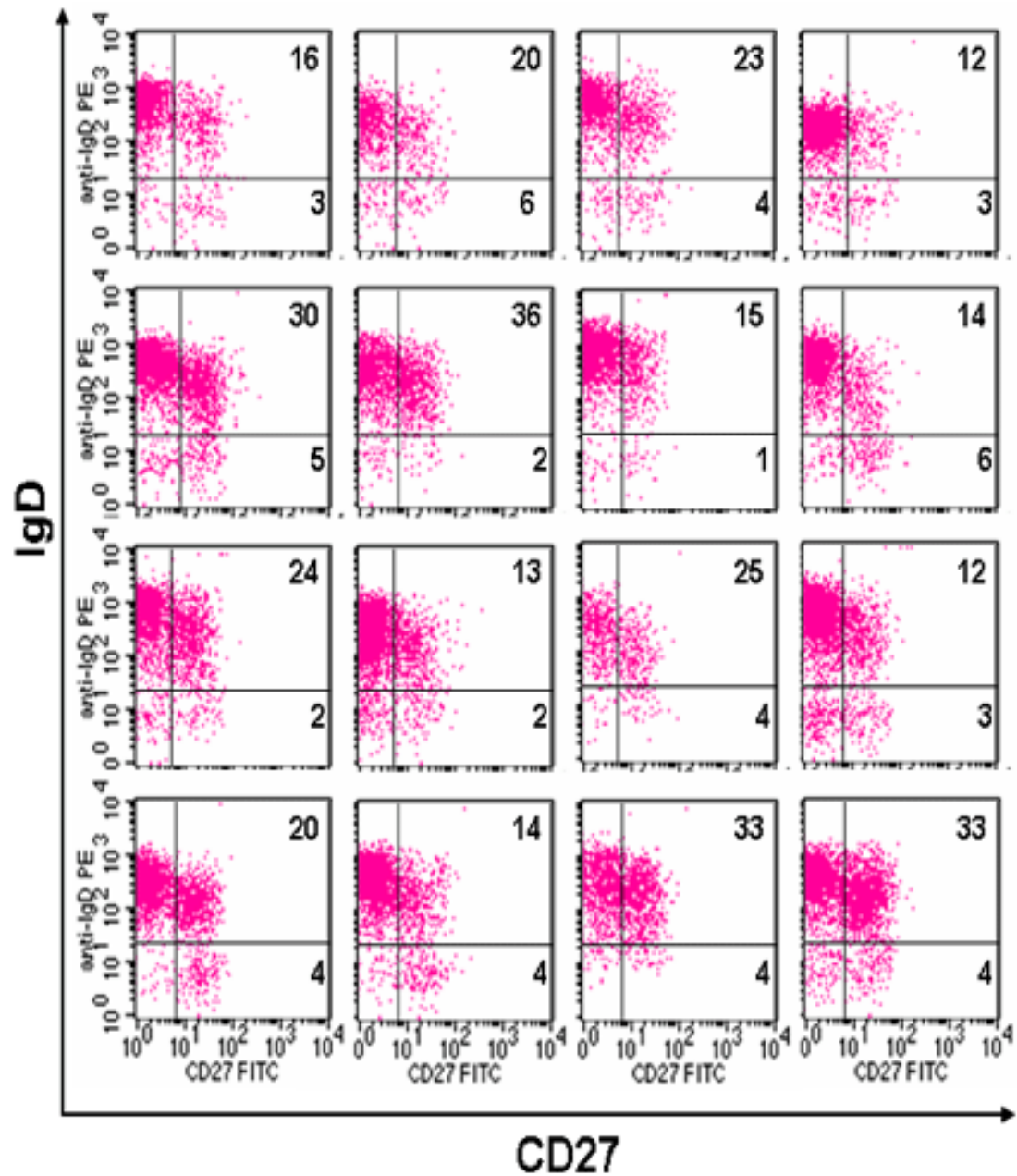


Figura 19.- Imágenes de las subpoblaciones de LB en una muestra de 24 **controles** del banco de sangre. El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, cuadrante superior derecho) y con cambio de isotipo (células B CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>, cuadrante inferior derecho).

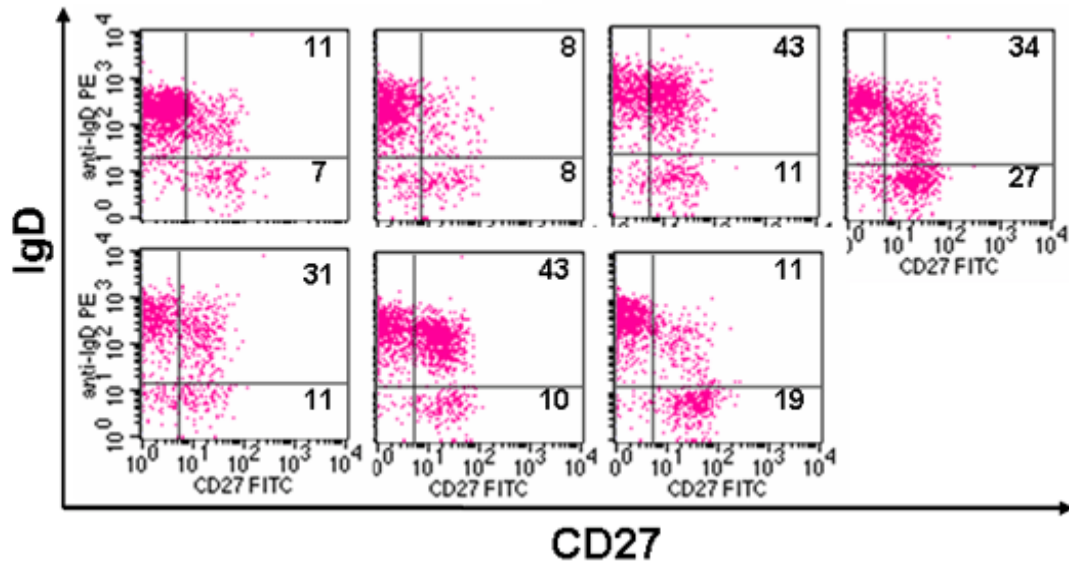




**Figura 20.-** Imágenes donde se muestran las subpoblaciones de LB en los 18 pacientes del grupo **BM0**. El numero indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo) células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecho) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecho).



**Figura 21.-** Imágenes donde se muestran las subpoblaciones de LB en los 16 pacientes del grupo BM1. El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecho) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecho).



**Figura 22.-** Imágenes donde se muestran las subpoblaciones de LB en los 7 pacientes del **grupo BM2**. El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecho) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecho).

#### 4.2.3. Caracterización clínica e inmunológica de los pacientes con IDVC clasificados en grupos BM

##### 4.2.3.1. Datos generales y antecedentes familiares

En la **tabla 20** se resumen los datos clínicos analizados de los 41 pacientes con IDVC incluidos en el estudio. La edad de inicio de los síntomas osciló entre 2 y 48 años, con una mediana de 11 años y la del diagnóstico entre 6 y 59 años, con una mediana de 29 años. El tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas y el inicio del tratamiento/diagnóstico, osciló entre 1 y 50 años, con una mediana de 13 años. En todos los pacientes, el tratamiento se inició pocos meses después del diagnóstico.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes clasificados según la cuantificación de las subpoblaciones de los LB de memoria (clasificación BM), al estudiar las variables: edad actual, edad del inicio de los síntomas, edad al diagnóstico y meses en tratamiento.

Tabla 20. Datos clínicos de pacientes con IDVC

Paciente	Edad actual / Sexo (años)	Edad de inicio de síntomas (años)	Edad al diagnóstico (años)	Meses en tratamiento	Manifestaciones clínicas al diagnóstico	Evolución clínica	Enfermedad Autoinmune	Sinusitis en Rx	Bronquiectasias***	CVF %	VEMS %	Esplenomegalia (TAC)
<b>Grupo BM0</b>												
1	44/V	17	34	123	IRR, DR	Malabsorción, Expectorción	AHAI, PTI, Alop. areata	sí	2	37	25	sí
2	40/V	34	37	36	IRR, DR	Expectorción, Diarreas no infecciosas	Alop. areata, Hipo T	no	2	83	98	sí
3	18/V	2	6	132	IRR	Expectorción	no	no	2	91	92	no
4	44/M	12	40	40	IRR, Leucopenia	Nada	Leucopenia	sí	1	67	75	no
5	42/M	13	30	144	IRR, DR	Malabsorción, artralgias	PTI	no	1	80	84	sí
6	53/M	37	50	36	IRR, Artralgias	Nada	AR	no	1	86	99	no
7	15/M	10	12	39	IRR, DR	Malabsorción, Expectorción	AHAI, PTI	no	2	66	61	sí
8	28/V	4	6	252	IRR, DR	Malabsorción	HipoT subclínico	sí	1	84	102	sí
9	34/V	6	24	120	IRR, DR	Malabsorción, Expectorción	Psoriasis	sí	2	89	87	sí
10	23/M	6	15	96	IRR, DR	Malabsorción	no	no	1	112	116	sí
11	24/M	13	16	96	IRR	Expectorción	no	sí	2	60	52	no
12	16/M	6	16	4	IRR	Nada	no	sí	0	nd	nd	sí
13	25/V	4	11	2	IRR, Artralgias	Expectorción	no	no	2	73	80	no
14	21/V	5	9	132	IRR, DR, Astenia	Expectorción, DR	no	sí	2	101	99	no
15	61/M	9	59	28	IRR, DR	Expectorción, Diarreas no infecciosas	AR	sí	2	62	63	no
16	54/M	7	41	156	IRR	Expectorción, Anorexia	A. perniciosa	sí	2	75	55	sí
17	51/M	38	46	48	IRR, DR	Expectorción, DR	no	sí	2	78	51	sí
18	38/M	14	27	134	IRR, DR	Malabsorción	no	sí	1	72	71	sí
<b>media</b>	<b>31/38M</b>	<b>13.2</b>	<b>26.6</b>	<b>89.9</b>						<b>77.4</b>	<b>77.1</b>	
<b>Grupo BM1</b>												
19	19/V	4	9	123	IRR	Expectorción	no	sí	2	91	95	no
20	21/M	9	13	87	DR	Nada	no	no	0	81	84	no
21	25/V	17	19	74	IRR, DR	Malabsorción	no	no	1	88	97	sí
22	20/V	8	16	25	IRR	Nada	no	no	0	94	105	no
23	45/M	34	39	64	IRR, DR	Malabsorción	A. perniciosa	sí	1	88	88	no
24	56/V	4	25	27	IRR	Nada	no	no	1	91	88	no
25	33/M	22	33	3	IRR	Expectorción	no	no	2	nd	nd	no
26	63/M	40	59	45	IRR	Nada	PTI, Leucopenia	no	1	63	66	no
27	61/V	30	54	84	IRR, DR	Nada	no	no	1	142	112	no
28	44/V	16	34	88	IRR, DR	Malabsorción	A. perniciosa	sí	1	76	70	sí
29	58/V	30	54	36	PTI	Nada	PTI	no	0	95	102	sí
30	33/V	12	23	120	IRR, DR	Nada	no	no	1	97	112	no
31	44/M	25	41	27	IRR	Nada	AHAI, Psoriasis	no	1	106	107	no
32	38/M	13	37	5	IRR	Nada	no	sí	0	95	94	no
33	64/V	33	43	240	IRR	Expectorción	no	sí	2	97	94	sí
34	25/M	9	10	192	HAI, Vitiligo	Nada	HAI, Vitiligo	no	0	87	87	no
<b>media</b>	<b>42/40M</b>	<b>19.1</b>	<b>31.8</b>	<b>77.5</b>						<b>92.7</b>	<b>93.4</b>	
<b>Grupo BM2</b>												
35	14/V	5	7	80	IRR, DR	IRR	no	no	0	nd	nd	no
36	18/V	5	6	120	IRR	Nada	no	no	0	115	134	no
37	53/V	46	51	24	Alop. areata	Nada	Alop. areata	no	0	100	115	sí
38	30/M	11	21	108	IRR, DR	Nada	no	no	0	115	125	no
39	50/M	48	49	12	IRR, DR	Nada	no	no	0	nd	nd	no
40	34/V	4	33	9	IRR	Nada	no	sí	0	100	106	no
41	28/V	4	6	252	IRR	Nada	no	no	0	nd	nd	no
<b>media</b>	<b>29/40M</b>	<b>17.6</b>	<b>24.7</b>	<b>86.4</b>						<b>107.5</b>	<b>120.0</b>	
<b>Todos</b>	<b>25V/34M</b>	<b>16</b>	<b>28.7</b>	<b>82.4</b>								

\*\*\* Bronquiectasias: 0 = sin evidencia de bronquiectasias en TAC; 1 = presente en TAC pero clínicamente silentes; 2 = presentes en TAC y expectorción habitual

\$ Los valores de CVF y VEMS se expresaron como porcentaje de los predictivos establecidos por Roca et al (ref. 92). CVF: Capacidad Vital Forzada, VEMS: volumen espiratorio máximo en l

# Historia Familiar: Se indica la patología encontrada en los familiares de primer grado de los pacientes estudiados. Sp: casos esporádicos, nd: datos no disponibles.

Nota: Se indican los datos clínicos más relevantes, asociados a la IDVC, para cada paciente. Abreviaturas: IRR: Infecciones Respiratorias Recurrentes, DR: Diarreas recidivantes, Diga: Déficit de IgA, HipoT: Hipotiroidismo, PTI: Púrpura Trombocitopenica idiopática, AHAI: Anemia Hemolítica Autoinmune, NL: Nódulos linfáticos, EAI: Enfermedad Autoinmune.

En 35 del total de 41 pacientes con IDVC se estudiaron los familiares de primer grado. Destacó el hecho de que en 7 casos (20%) se halló otra IDP en uno o varios familiares, en forma de IDVC (6 casos) y déficit de IgA con déficit de IgG2 (un caso). En 5 (14%) de los pacientes había antecedentes familiares de enfermedad autoinmune. En la **tabla 21** se muestra la distribución de los casos con historia familiar positiva, dentro de la clasificación BM. El 71,4% (5/7) de pacientes con historia familiar positiva para la IDP, pertenecieron al grupo BM0. Sin embargo, el riesgo relativo (RR) de transmisión de la enfermedad a los familiares de los pacientes en este grupo, no alcanzó el grado de la significación estadística (RR = 2,06; (el intervalo de confianza (IC) del 95% fue de 0,47 a 9,04; p=0,2).

<i>Historia familiar</i>	<i>BM0</i>	<i>BM1</i>	<i>BM2</i>	<i>Total</i>
<b>IDP</b>	5	1	1	7
<b>EAI</b>	3	2	0	5
<b>Casos esporádicos</b>	9	11	3	23
<b>Total</b>	17	14	4	35

**Tabla 21.** Distribución de pacientes con antecedentes familiares estudiados, según el grupo BM y la patología encontrada. IDP: Inmunodeficiencia primaria, EAI: Enfermedad autoinmune

***Las diferencias en la frecuencia de otras IDP entre los familiares de los pacientes con IDVC entre los grupos BM0, BM1 y BM2 no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, es de destacar el hecho de que 5 de los 7 casos familiares se hallaron en el grupo BM0.***

#### **4.2.3.2. Caracterización clínica de los pacientes con IDVC clasificada en grupos BM**

En las **tablas 7.1.** y **20** se resumen los datos clínicos analizados de los 41 pacientes con IDVC incluidos en el estudio. Las infecciones respiratorias fueron las más frecuentes, siendo las manifestaciones clínicas iniciales en el 87,8% (36/41) de los pacientes, **tabla 7.1.** El 46,3% (19/41) de pacientes presentó

neumonía, el 24,4% (10/41) bronquitis y el 17,1% (7/41) infecciones de vías altas. El resto de los pacientes (5/41, 12,2%) debutó con enfermedad autoinmune. El 17% (7/41) de los pacientes presentó, además, síntomas digestivos.

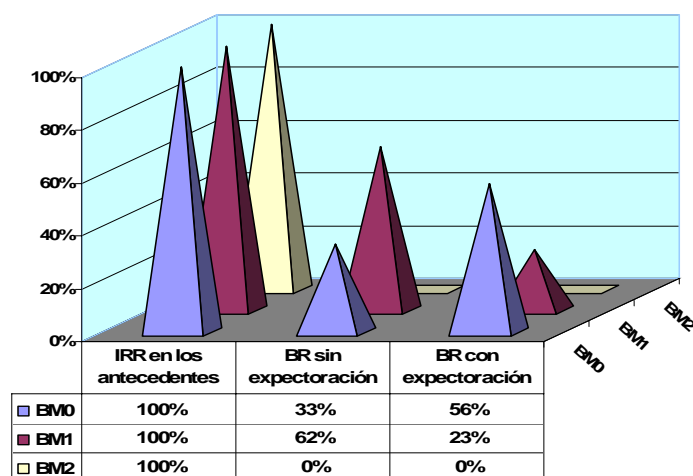
Entre las manifestaciones clínicas que llevaron al diagnóstico, también destacó la presencia de infecciones respiratorias, **tabla 7.1. o 20**. Éstas afectaron al 90% (37/41) de los pacientes. El 10% (4/41) restante padeció enfermedad autoinmune (3 casos) o patología digestiva aislada (1 caso). El 46% (19/41) de los pacientes presentaron en el momento del diagnóstico junto con las infecciones respiratorias recurrentes las diarreas recidivantes.

### **A) Manifestaciones Respiratorias**

Las infecciones respiratorias recurrentes fueron el motivo del diagnóstico en 37 del total de 41 pacientes. A lo largo del seguimiento clínico se objetivaron bronquiectasias, mediante el TAC de tórax de alta resolución, en 27 de 41 pacientes, 16 pertenecieron al grupo BM0 y 11 al grupo BM1. Ningún paciente del grupo BM2 presentó bronquiectasias. Trece de estos 27 pacientes con bronquiectasias presentaban tos productiva, con expectoración matutina habitual: 10 pertenecieron al grupo BM0 y 3 al BM1. En 14 pacientes se hallaron bronquiectasias sin expectoración: 6 pertenecieron al grupo BM0 y 8 al grupo BM1.

En la **figura 23** se muestra la distribución de pacientes con infecciones respiratorias recurrentes (IRR) en el momento del diagnóstico que desarrollaron, a lo largo del seguimiento clínico, bronquiectasias (BR), con o sin expectoración, en los tres grupos BM de pacientes. Del total de pacientes con antecedentes de IRR en el grupo BM0, el 56% (10/18) desarrollaron bronquiectasias con expectoración, frente al 23% (3/13) del grupo BM1 y el 0% (0/6) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

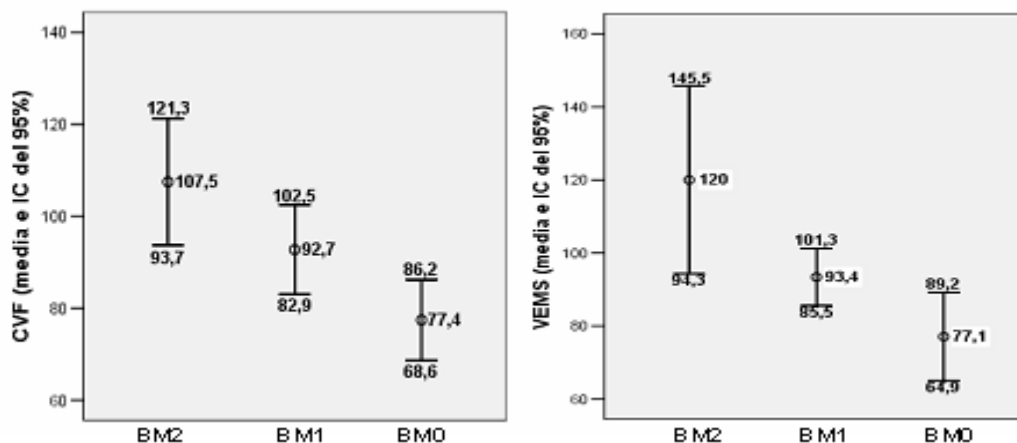
## DESARROLLO DE LAS BRONQUIECTASIAS EN PACIENTES CON IDVC POR GRUPOS BM



**Figura 23:** Desarrollo de bronquiectasias (BR), con o sin expectoración, en pacientes con antecedentes de Infecciones Respiratorias Recurrentes (IRR). El total de pacientes con IRR (100%) en cada grupo BM fueron: 18 pacientes en el grupo BM0, 13 en el BM1 y 6 en el BM2. El 56% (10/18) de pacientes del grupo BM0 desarrollaron bronquiectasias con expectoración, frente al 23% (3/13) de pacientes del grupo BM1 y 0% (0/6) del grupo BM2, **p<0,05**.

El riesgo relativo de desarrollar bronquiectasias con expectoración fue 3,52 veces mayor (IC del 95% = 1,15 – 10,76,  $p<0,05$ ) en los pacientes pertenecientes al grupo BM0. No encontramos diferencias significativas entre grupos de pacientes con o sin bronquiectasias, y grupos con o sin expectoración, en cuanto a edad actual, edad de inicio de síntomas, retraso en el diagnóstico o meses en tratamiento.

Se analizaron los resultados de las pruebas de función respiratoria (PFR), la capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (VEMS) en 17 de 18 pacientes del grupo BM0, en 15 de 16 pacientes del BM1 y en 4 de 7 del grupo BM2, **tabla 20**. En la **figura 24** se muestran los valores de la media (IC del 95%) de CVF y VEMS obtenidas en cada grupo BM.



**Figura 24:** Valores de las pruebas de función respiratoria (PFR) en pacientes con IDVC por grupos BM. Tanto la capacidad vital forzada (CVF) como el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (VEMS) eran significativamente más bajos en el grupo BM0 que en el grupo BM1 y BM2,  $p < 0,005$ .

Tanto la CVF como la VEMS fueron significativamente inferiores en el grupo de pacientes BM0, comparado con el grupo BM1 y éstos a su vez inferiores en respecto al grupo BM2. La CVF fue del  $77\% \pm 17\%$  en el grupo BM0 vs.  $92\% \pm 17\%$  en el grupo BM1 y  $104\% \pm 8\%$  en el grupo BM2,  $p < 0,005$ . La VEMS fue del  $77\% \pm 23\%$  en el grupo BM0 vs.  $93\% \pm 14\%$  en el grupo BM1 y  $110\% \pm 16\%$  en el grupo BM2,  $p < 0,001$ .

Tanto la CVF como la VEMS fueron significativamente inferiores en el grupo de pacientes con bronquiectasias, comparado con los pacientes sin bronquiectasias. La CVF fue del  $83\% \pm 20\%$  en los pacientes con bronquiectasias vs.  $97\% \pm 10\%$  en los pacientes sin bronquiectasias,  $p < 0,05$ . La VEMS fue del  $83\% \pm 23\%$  en los pacientes con bronquiectasias vs.  $101\% \pm 15\%$  en los pacientes sin bronquiectasias,  $p < 0,03$ . La VEMS más disminuida ( $77\% \pm 17\%$ ) fue observada en los pacientes con bronquiectasias con expectoración.

La enfermedad pulmonar crónica (EPC), definida como la disminución de la CVF y/o la VEMS por debajo del 80% del valor teórico establecido por Roca y colaboradores<sup>130</sup> en los pacientes con bronquiectasias, se evidenció en 11



pacientes, 9 del grupo BM0 y 2 del grupo BM1,  $p < 0,05$ . Cabe destacar, a modo descriptivo, que 4 de los pacientes del grupo BM0 y ninguno del grupo BM1 presentaron PFR inferiores al 60%, lo que se considera, según Roca y col<sup>130</sup>, una EPC grave. No encontramos diferencias significativas entre grupos de pacientes con o sin enfermedad crónica pulmonar, en cuanto a edad actual, edad de inicio de síntomas, retraso en el diagnóstico o meses en tratamiento.

***Pertenecer al grupo BM0 se podría asociar con el riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar crónica y bronquiectasias con expectoración ( $p < 0,05$ ). Este riesgo parece no depender de la edad del inicio de síntomas, del retraso en el diagnóstico ni del tiempo de evolución.***

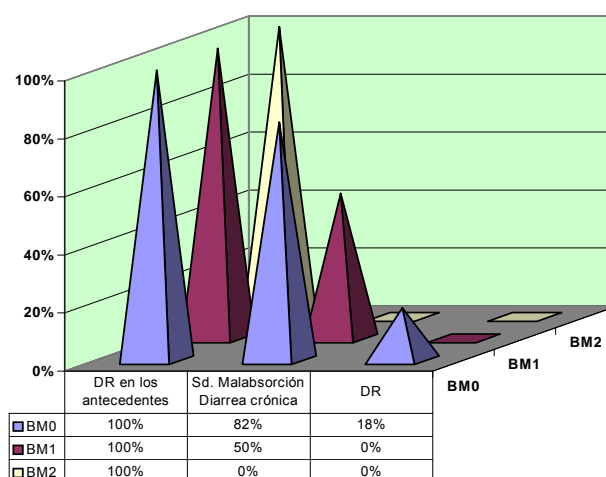
## **B) Manifestaciones Digestivas**

En el momento del diagnóstico el 49% (20/41) de los pacientes presentaron diarreas recidivantes (DR), **tabla 20**. El patógeno detectado con mayor frecuencia en estos pacientes fue la *Giardia lamblia* (datos no mostrados). A lo largo del seguimiento clínico se objetivó un síndrome de malabsorción o diarrea crónica, con clara repercusión en el estado general con bajo peso, astenia y malnutrición (datos no mostrados) en doce pacientes: 9 pertenecieron al grupo BM0 y 3 al grupo BM1. Ningún paciente del grupo BM2 desarrolló un síndrome de malabsorción o diarrea crónica. En la **figura 25** se muestra la evolución de las DR a un síndrome de malabsorción y/o diarreas crónicas en los pacientes por grupos BM.

Del total de pacientes con los antecedentes de DR en el grupo BM0, el 82% (9/11) desarrolló, a lo largo del seguimiento clínico, un síndrome de malabsorción o diarrea crónica con repercusión importante en el estado general, frente al 50% (3/6) de pacientes con DR en los antecedentes del grupo BM1 y 0% (0/6) en el grupo BM2,  $p < 0,005$ . En dos de los pacientes del BM0 con los antecedentes de DR, éstas persistieron a lo largo del seguimiento

clínico, sin una clara repercusión en el estado general. No se encontraron diferencias significativas entre grupos de pacientes con o sin síndrome de malabsorción o diarrea crónica en cuanto a la edad actual, edad del comienzo de síntomas, retraso en el diagnóstico o meses en tratamiento.

#### EVOLUCIÓN DE LAS DIARREAS RECIDIVANTES (DR) EN PACIENTES CON IDVC POR GRUPOS BM



**Figura 25:** Evolución de las diarreas recidivantes (DR) a síndrome de malabsorción y/o diarrea crónica en los tres grupos de pacientes. El total de pacientes con DR (100%) en cada grupo BM fueron: 11 pacientes en el grupo BM0, 6 en el BM1 y 3 en el BM2. El 82% de pacientes (9/11) del grupo BM0 desarrollaron síndrome de malabsorción o diarrea crónica, frente al 50% (3/6) del grupo BM1 y 0% del grupo BM2,  $p < 0,05$ . Las DR persistieron en el 18% de pacientes (2/11) del grupo BM0.

**Los pacientes del grupo BM0 desarrollaron síndrome de malabsorción o diarrea crónica con repercusión importante en el estado general más frecuentemente que los pacientes del grupo BM1 y BM2, ( $p < 0,05$ ). El desarrollo de esta sintomatología intestinal grave se dio en los pacientes independientemente de la edad del inicio de síntomas, del retraso en el diagnóstico y del tiempo de evolución.**

#### C) Manifestaciones Linfoproliferativas

En 16 de 41 pacientes (39%) se detectó esplenomegalia en el TAC toraco-abdominal, **tabla 20**. De éstos, 11 pacientes pertenecieron al grupo BM0, 4 al

grupo BM1, y 1 al grupo MB2, ( $p < 0,05$ ). Es decir, la esplenomegalia se detectó en el 61% (11/18) de pacientes del grupo BM0, en el 25% (4/16) del grupo BM1 y en el 14% (1/7) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

Se objetivaron linfadenopatías en el TAC toraco-abdominal en 15 de 41 pacientes (37%), **tabla 20**. De éstos, 11 pacientes pertenecieron al grupo BM0 y 4 al grupo BM1, ( $p < 0,01$ ). Es decir, la presencia de linfadenopatías se detectó en el 61% (11/18) de pacientes del grupo BM0, en el 25% (4/16) del grupo BM1 y en el 0% (0/7) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

Las manifestaciones linfoproliferativas (esplenomegalia y/o aumento de ganglios linfáticos) se evidenciaron en el 78% (14/18) de pacientes del grupo BM0, en el 31% (5/16) del grupo BM1 y en el 14% (1/7) del grupo BM2,  $p < 0,005$ .

***Los pacientes del grupo BM0 presentaron manifestaciones linfoproliferativas con una mayor frecuencia ( $p < 0,005$ ).***

#### **D) Manifestaciones Autoinmunes**

Al momento del diagnóstico y/o a lo largo del seguimiento clínico, 17 (41%) pacientes presentaron patología autoinmune, **tabla 20**. De éstos, 10 pacientes pertenecieron al grupo BM0, 6 al grupo BM1, y 1 al grupo MB2. La patología autoinmune se diagnosticó en el 55% (10/18) de pacientes del grupo BM0, en el 38% (6/16) del grupo BM1 y en el 14% (1/7) del grupo BM2, ( $p = 0,1$ ).

Las manifestaciones más frecuentes fueron citopenias, afectando a 8 pacientes; 5 del grupo BM0 y 3 del grupo BM1. (Nota: La anemia perniciosa no fue incluida en este recuento, ya que esta citopenia no es consecuencia de anticuerpos dirigidos frente a autoantígenos de las células hematológicas.) En

el momento del estudio, los pacientes estaban en remisión clínica y ningún paciente recibía tratamiento inmunosupresor.

***Las diferencias de frecuencia de los procesos autoinmunes en el grupo BM0, BM1 y BM2 no fueron estadísticamente significativas, ( $p=0,1$ ).***

#### **4.2.3.3. Datos inmunológicos de pacientes con IDVC**

En la **tabla 22** se resumen los datos inmunológicos analizados en 41 pacientes con IDVC incluidos en el estudio. Entre los datos más relevantes destaca la presencia de niveles indetectables de la IgA y/o IgM en 29 (71%) de pacientes, 14 del grupo BM0 (14/18, 77%), 14 del grupo BM1 (14/16, 88%) y uno del grupo BM2 (1/7, 14%), ( $p<0,001$ ).

El porcentaje y/o número absoluto de linfocitos CD3+ estaba disminuido en 7 pacientes, el de CD4+ en 11, el de CD19+ en 8 y el de NK en 11. El porcentaje y/o número absoluto de linfocitos T CD8+ estaba aumentado en 8 pacientes. Hubo inversión de cociente CD4+/CD8+ en 5 pacientes. Al menos una de estas alteraciones linfocitarias descritas estuvo presente en el 72% (13/18), 44% (7/16) y 29% (2/7) de pacientes del grupo BM0, BM1 y BM2, respectivamente, sin diferencias significativas ( $p=0,1$ ).

La función linfocitaria valorada mediante la cuantificación de los linfocitos T que expresaron el CD69 tras la estimulación con anti-CD3 se realizó en 16 de 18 pacientes del grupo BM0, en 14 de 16 pacientes del BM1 y en 5 de 7 del grupo BM2. El 69% (11/16) de pacientes del grupo BM0, el 50% (7/14) del grupo BM1 y el 60% (3/5) del grupo BM2 presentaron una baja respuesta a estimulación de las células T CD4+ con anti-CD3. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores medios de células T activadas, CD4+HLA-DR+ y CD8+HLA-DR+, entre los grupos BM de pacientes, **tabla 22**.

Diez pacientes presentaron linfopenia, 6 leucocitosis y 5 plaquetopenia, **tabla 22**. En 18 pacientes se encontraron valores de hemoglobina por debajo de los límites normales, que junto con el volumen corpuscular medio de eritrocitos disminuido, indica la presencia de una anemia microcítica ferropénica (datos no mostrados) que se encuentra en los cuadros inflamatorios crónicos. El 50% de los pacientes del grupo BM0 y del BM1 pero ninguno del grupo BM2 presentaron estos rasgos de anemia microcítica. El 72% (13/18) de pacientes del grupo BM0, el 50% (8/16) del grupo BM1 y el 43% (3/7) del grupo BM2 presentó algunas de las alteraciones en el hemograma descritas.

***Las alteraciones linfocitarias analizadas fueron más frecuentes en los pacientes del grupo BM0 y BM1 pero sin diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo BM2 ( $p < 0,1$ ). Valores indetectables de IgA, IgM, leucocitosis, linfopenia y rasgos de anemia microcítica se limitaron, a excepción de un caso, a los grupos BM0 y BM1.***

Tabla 22. Datos inmunológicos de pacientes con IDVC

Paciente	Edad actual / Sexo (años)	Linfocitos mm3	CD3 mm3	CD3 (%)	CD4 mm3	CD4 (%)	CD8 mm3	CD8 (%)	Index CD4/CD8	CD19 mm3	CD19 (%)	NK mm3	NK (%)	CD4 HLA-DR	CD8 HLA-DR	CD3CD69 (%)	CD4CD69 (%)	CD8CD69 (%)	IgG (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgM (mg/dL)	Leucocitos mm3	Plaquetas mm3	Hemoglobina g/dL	UIt Ig G 1	UIt Ig G 2	UIt Ig G 3	Ig G 1 al diagnost (mg/dL)	Ig G 2 al diagnost (mg/dL)	Ig G 3 al diagnost (mg/dL)	
<b>Grupo BM0</b>																															
1	44/V	3100	2170	70	1023	33	868	28	1.2	527	17	341	11	19	43	79	54	34	538	<7	77	7500	231	12.8				560	116	90	
2	40/V	1000	660	66	450	45	190	19	2.4	120	12	200	20	10	25	91	35	20	846	<7	10	5500	209	13.5	541	214	21	513	33	162	
3	18/V	1400	1064	76	700	50	322	23	2.2	210	15	84	6	6	25	90	65	50	776	308	33	8300	323	12.3	nh	nh	nh	247	5	88	
4	44/M	2600	2340	90	598	23	1768	68	0.3	182	7	52	2	32	67	77	36	48	663	<7	<5	6200	315	11.5	340	313	6	88	23	<5	
5	42/M	4100	2501	61	861	21	1599	39	0.5	123	3	1353	33	45	71	78	48	66	443	<7	11	11200	547	8.3	430	172	20	200	60	8	
6	53/M	900	639	71	270	30	342	38	0.8	135	15	117	13	16	32	nd	nd	nd	972	23	35	4700	260	13	775	216	15	252	37	8	
7	15/M	3300	2706	82	2112	64	594	18	3.6	462	14	99	3	17	11	61	31	32	660	14	59	11400	327	14.3	466	178	43	288	52	95	
8	28/V	2000	1580	79	860	43	620	31	1.4	240	12	180	9	10	9	89	61	48	683	<7	46	6600	193	13.9	287	214	5	88	23	<5	
9	34/V	1600	1424	89	768	48	592	37	1.3	64	4	80	5	3	9	nd	nd	nd	687	<7	<10	7700	208	14.5	353	187	33	ND	ND	ND	
10	23/M	800	536	67	240	30	264	33	0.9	48	6	208	26	9	29	87	31	42	797	<7	<10	6200	214	13.4	613	205	16	ND	ND	ND	
11	24/M	3300	2376	72	957	29	1386	42	0.7	594	18	297	9	45	27	87	56	61	688	<7	16	12800	226	15.8	272	185	23	122	5	9	
12	16/M	1200	960	80	576	48	348	29	1.7	108	9	108	9	12	22	69	36	33	725	<7	<10	5000	146	13.3	262	241	7	ND	ND	ND	
13	25/V	3500	2905	83	665	19	2030	58	0.3	385	11	140	4	46	41	86	45	43	729	<7	<10	9000	265	14.3	413	206	13	103	5	49	
14	21/V	2600	2158	83	1274	49	598	23	2.1	312	12	130	5	6	8	91	40	42	415	<7	<10	11400	249	15.4	nh	nh	nh	177	170	7	
15	61/M	900	666	74	495	55	171	19	2.9	171	19	54	6	7	17	88	20	31	894	77	90	5100	181	12	nh	nh	nh	419	59	21	
16	54/M	1242	1018	82	435	35	559	45	0.8	87	7	124	10	36	81	76	32	24	591	23	<10	3270	103	13	396	181	10	ND	ND	ND	
17	51/M	800	640	80	440	55	184	23	2.4	96	12	64	8	17	28	86	43	36	600	23	<10	5100	201	11.9	277	281	5	170	46	11	
18	38/M	1700	1241	73	884	52	306	18	2.9	272	16	153	9	16	9	92	34	33	721	<7	21	5600	262	12.7	376	178	17	ND	ND	ND	
media		31V/38	2002	1532	77	756	41	708	33	1.6	230	12	210	10	20	31	74	37	36	690			7365	248	13.1						
<b>Grupo BM1</b>																															
19	19/V	1000	710	71	430	43	200	20	2.2	180	18	90	9	6	9	95	35	31	537	<7	<10	5300	224	16.2	165	136	10	80	39	14	
20	21/M	2100	1659	79	1197	57	441	21	2.7	315	15	105	5	5	9	85	51	40	497	<7	16	11700	292	12.4	240	114	12	244	44	39	
21	25/V	1000	730	73	400	40	490	49	0.8	80	8	130	13	nd	nd	79	47	38	550	<7	<10	6600	149	13	268	144	9	185	67	23	
22	20/V	2400	1632	68	1104	46	456	19	2.4	408	17	288	12	6	13	85	61	57	449	17	12	8000	202	14.4	342	86	5	352	5	<5	
23	45/M	2000	1520	76	880	44	580	29	1.5	220	11	200	10	4	6	44	68	76	413	<7	46	9100	509	8.9	194	191	5	151	96	<5	
24	56/V	2100	1449	69	399	19	987	47	0.4	273	13	336	16	19	30	68	26	39	695	<7	<10	10000	243	12.3	611	210	28	ND	ND	ND	
25	33/M	1500	1125	75	495	33	585	39	0.8	180	12	135	9	14	49	80	56	56	334	<7	30	4900	232	8.7	181	104	6	130	5	9	
26	63/M	800	560	70	296	37	224	28	1.3	168	21	64	8	20	28	nd	nd	nd	992	<7	<10	3300	77	12.4	531	242	28	209	23	<5	
27	61/V	2400	1512	63	624	26	744	31	0.8	216	9	600	25	nd	nd	51	32	27	669	<7	45	9730	252	13.1	468	187	74	146	73	27	
28	44/V	1500	1275	85	645	43	570	38	1.1	75	5	135	9	20	51	91	53	42	863	<7	10	5800	199	14.3	630	179	26	168	11	<5	
29	58/V	1510	1208	80	725	48	483	32	1.5	121	8	181	12	37	52	88	30	37	542	<7	48	5650	186	15	nh	nh	nh	ND	ND	ND	
30	33/V	1600	1152	72	672	42	416	26	1.6	176	11	256	16	nd	nd	nd	nd	nd	508	<7	<10	7900	193	14.1	210	208	27	ND	ND	ND	
31	44/M	1600	1136	71	688	43	384	24	1.8	176	11	256	16	3	5	86	68	56	903	277	138	8400	292	12.3	662	243	31	381	10	22	
32	38/M	2000	1520	76	740	37	800	40	0.9	220	11	240	12	7	28	95	43	52	696	<7	<10	5400	184	13.2	291	261	5	75	40	<5	
33	64/V	700	637	91	315	45	294	42	1.1	42	6	14	2	38	45	78	28	31	499	<7	<10	2200	87	12.2	200	248	<5	200	248	<5	
34	25/M	2900	2320	80	1131	39	1102	38	1.0	435	15	116	4	12	14	92	45	40	610	<7	52	9300	186	13.2	289	203	<5	348	5	12	
media		42V/40	1694	1259	75	671	40	547	33	1.4	205	12	197	11	12	21	70	40	39	610			7080	219	12.9						
<b>Grupo BM2</b>																															
35	14/V	2900	2204	76	1450	50	696	24	2.1	406	14	232	8	4	8	95	65	59	689	21	55	6000	234	13.8	376	198	16	309	45	21	
36	18/V	2200	1826	83	1166	53	506	23	2.3	154	7	176	8	6	11	97	65	58	611	24	20	5900	186	14.6	204	100	9	290	60	34	
37	53/V	1210	871	72	593	49	290	24	2.0	169	14	85	7	21	33	86	44	42	687	35	40	4120	145	15	nh	nh	nh	281	83	5	
38	30/M	2210	1790	81	1260	57	508	23	2.5	243	11	133	6	nd	nd	76	42	33	635	85	98	6680	139	13.6	301	153	15	275	128	44	
39	50/M	1370	1123	82	452	33	534	39	0.8	55	4	178	13	18	37	nd	nd	nd	621	<7	16	5910	180	12.9	424	218	9	ND	ND	ND	
40	34/V	1600	1216	76	800	50	352	22	2.3	208	13	96	6	nd	nd	85	39	39	667	59	38	5200	264	15.8	416	257	13	75	16	8	
41	28/V	1800	1134	63	666	37	414	23	1.6	378	21	234	13	7	14	87	58	43	566	81	16	6300	173	15.1	334	190	29	280	34	32	
media		29V/40	1899	1452	76	912	47	472	25	1.9	230	12	162	9	8	15	75	45	39	639			5730	189	14.4						
<b>Todos</b>																															
media		25/34M	1700		76		43		29		12		9	13	26	86	44	41	663			6975	227	13.2							

Nota: Datos inmunológicos, en el momento del estudio, de los pacientes con IDVC. Los valores escritos en rojo y en violeta indican valor por debajo y encima, respectivamente, del rango de la normalidad para la edad, nd: datos no disponibles.

#### **4.2.3.4. Caracterización clínica e inmunológica de los pacientes con IDVC clasificados en grupos BM- RESUMEN.**

El grupo de pacientes con ausencia de LB de memoria, grupo BM0, presentó la patología clínica más grave. El 89% de estos pacientes presentaron bronquiectasias, acompañadas de expectoración habitual en más de la mitad de los casos (56%). En el 50% (9/18) de los pacientes se evidenció la enfermedad pulmonar crónica (EPC), definida como una disminución de la CVF y/o la VEMS por debajo del 80% del valor teórico establecido por Roca y colaboradores<sup>131</sup> en presencia de bronquiectasias. El 61% presentaron clínica digestiva en el momento del diagnóstico y el 50% desarrollaron síndrome de malabsorción o diarrea crónica con repercusión importante en el estado general. La patología autoinmune se diagnosticó en el 55% y las manifestaciones linfoproliferativas se objetivaron en el 78% de los pacientes de este grupo.

En cuanto al fenotipo inmunológico, en el 77% de pacientes del grupo BM0 se detectó déficit de IgA y/o déficit de IgM. El 72% de pacientes presentaron alguna alteración celular estudiada: la disminución del porcentaje y/o número absoluto de los linfocitos CD3+ se encontró en 5 pacientes, de los CD4+ en 6, de los CD19+ en 4, de las NK en 7 y un aumento del porcentaje y/o número absoluto de los CD8+ en 5 de los 18 pacientes de este grupo. Además, en el 72% (13/18) de pacientes de este grupo se hallaron alteraciones en el hemograma (linfopenia, leucocitosis, plaquetopenia, anemia ferropénica).

El siguiente grupo más afecto fue el grupo BM1. Este grupo tenía células B de memoria pero éstas no efectuaron el cambio de isotipo. El 69% (11/16) de estos pacientes presentó bronquiectasias, acompañadas de expectoración en el 19% de los pacientes. En el 13% de los pacientes se evidenció la enfermedad pulmonar crónica (EPC). El 37% de los pacientes presentó clínica digestiva en el momento del diagnóstico y el 19% desarrolló un síndrome de malabsorción. Los procesos autoinmunes afectaron al 37% y las manifestaciones linfoproliferativas al 31% de pacientes de este grupo.

El 75% de pacientes del grupo BM1 cursó con déficit de IgA y/o déficit de IgM. El 44% de los pacientes presentaron alguna alteración celular estudiada: disminución del porcentaje y/o número absoluto de los linfocitos CD3+ se encontró en 2 pacientes, de los CD4+ en 5, de los CD19+ en 3, de las NK en 3 y un aumento del porcentaje y/o número absoluto de los CD8+ en 3 de los 16 pacientes de este grupo. Además, en el 50% (8/16) de pacientes de este grupo se hallaron alteraciones en el hemograma (linfopenia, leucocitosis, plaquetopenia, anemia ferropénica).

Los pacientes con el fenotipo de LB de memoria menos alterado formaron el tercer grupo. La proporción de los LB de memoria totales y los con cambio de isotipo en el **grupo BM2** fue similar a la del grupo control. El fenotipo clínico fue también más leve. Los pacientes de este grupo no presentaron bronquiectasias ni desarrollaron síndrome de malabsorción. Se detectó enfermedad autoinmune y esplenomegalia en un sólo paciente de este grupo, otro presentó déficit de IgA, junto con una disminución de los linfocitos CD19+ y disminución de los valores de hemoglobina, otro presentó una disminución de las células NK, leucopenia y plaquetopenia. Plaquetopenia se evidenció también en un otro paciente de este grupo, **tabla 22**.

#### **4.3. Resultados de ICOS**

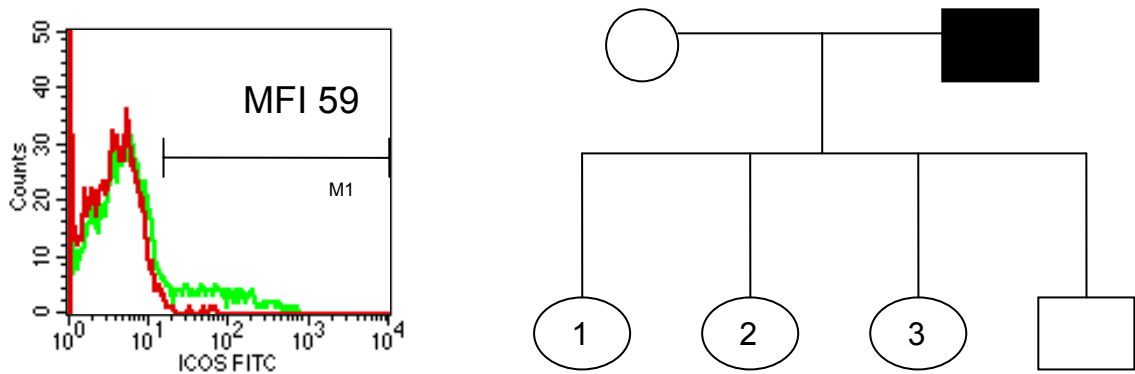
Al revisar los pacientes con diagnóstico de IDVC encontramos que algunos de ellos tenían familiares en primer grado con otras inmunodeficiencias y/o enfermedades autoinmunes, por lo cual decidimos estudiar en ellos la expresión de la molécula ICOS, debido a que se menciona que el 20-25% de los casos son casos familiares<sup>26,100</sup>, presentando una forma de herencia autosómica dominante y recesiva<sup>76</sup>.

Se eligieron 3 familias en las cuales tenían uno o más personas con diagnóstico de IDVC o deficiencia de IgA, otros presentaban dentro de la misma familia, alguna enfermedad autoinmune, también se estudiaron 4 pacientes las cuales en la etapa inicial de la enfermedad tenían el diagnóstico de DIgA, y posteriormente evolucionaron al diagnóstico de IDCv. Se revisaron

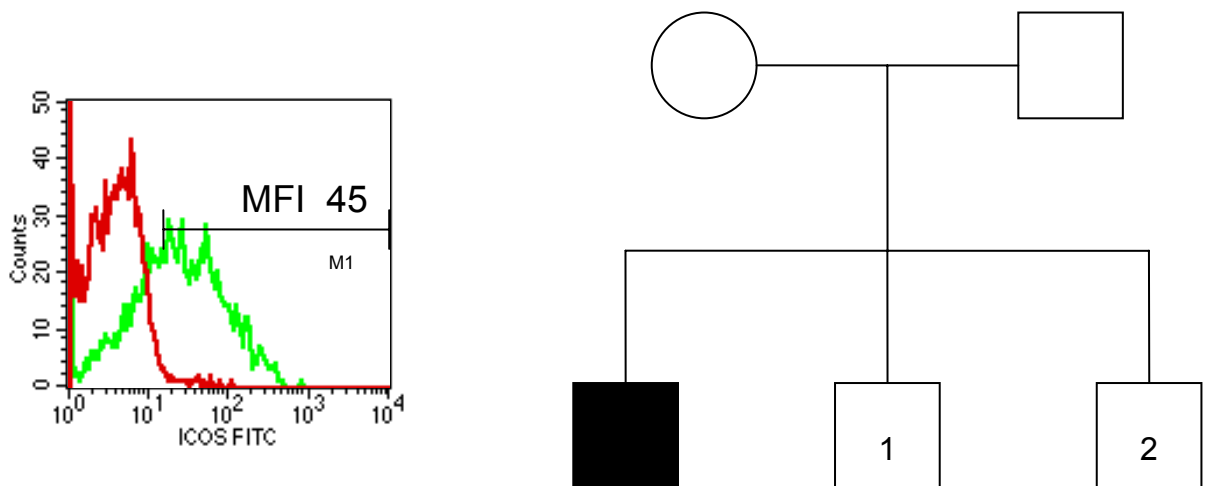


los datos clínicos y de laboratorio (tablas 10, 11, 12 y 13, material y métodos), correlacionando con los datos encontrados en los pacientes deficientes de ICOS, de acuerdo a lo reportado por Grimbacher, et.al<sup>76</sup>. En los cuales realmente no encontramos correlación con lo reportado por este autor, y nuestros casos familiares.

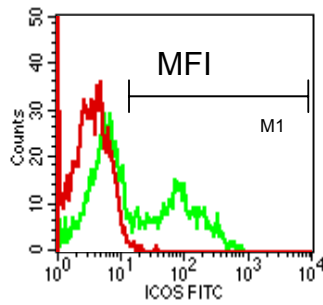
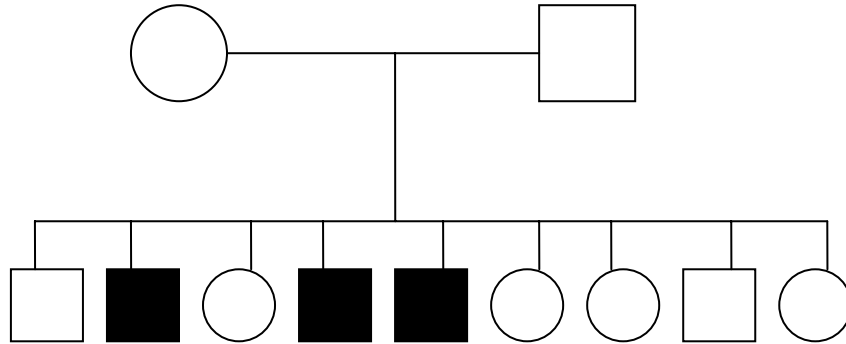
En la **figura 7**, se mostraron las imágenes de la curva de expresión de ICOS a diferentes tiempos de estimulación y en las **figuras 26, 27, 28, 29, 30 y 31**, se muestra el pedegree de cada una de las familias con la imágenes de la expresión de ICOS en los pacientes estudiados y controles.



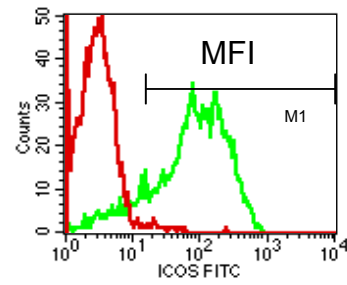
**Figura 26.-** Familia 1 (DC), se muestra el pedigrí de la familia, así como la expresión en ICOS en el caso afectado.



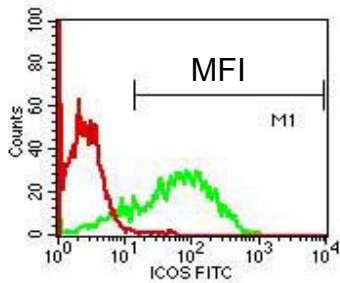
**Figura 27.-** Familia 2 (MC), se muestra el Pedigrí, así como la imagen de la expresión de ICOS en el paciente afectado con IDCV en la familia.



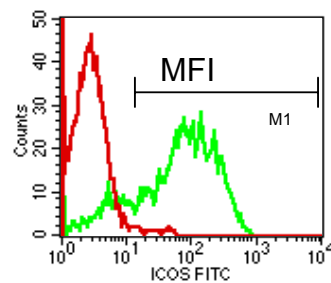
Madre



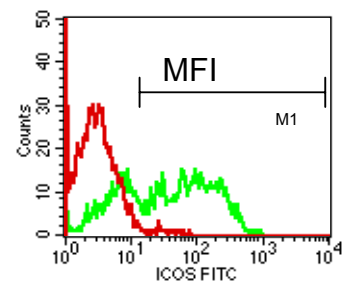
Hermano



1

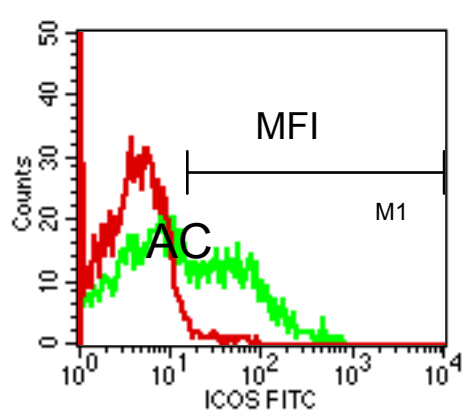


2

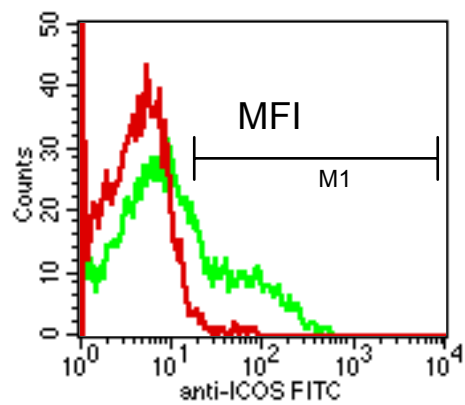


3

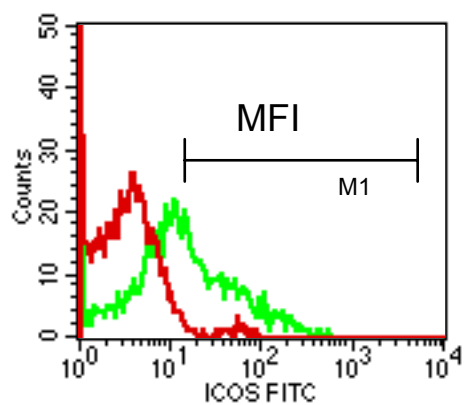
**Figura 28.-** Familia 3 (CU), se muestra el pedigrí de la familia, así como las imágenes de la expresión de ICOS en 2 personas sanas de la misma familia y en 3 afectados de IDCV



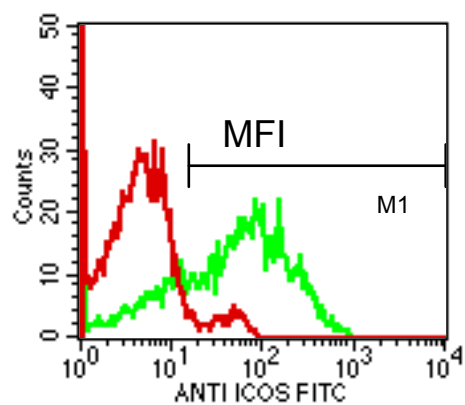
S



V

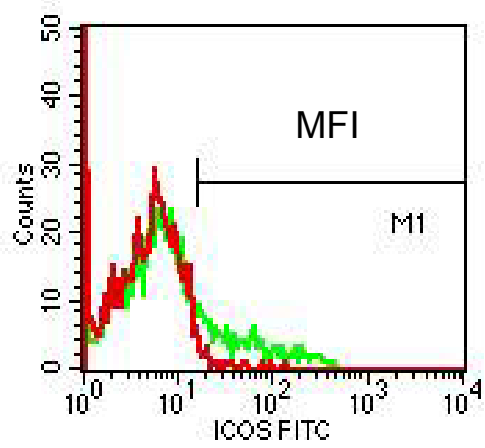


A



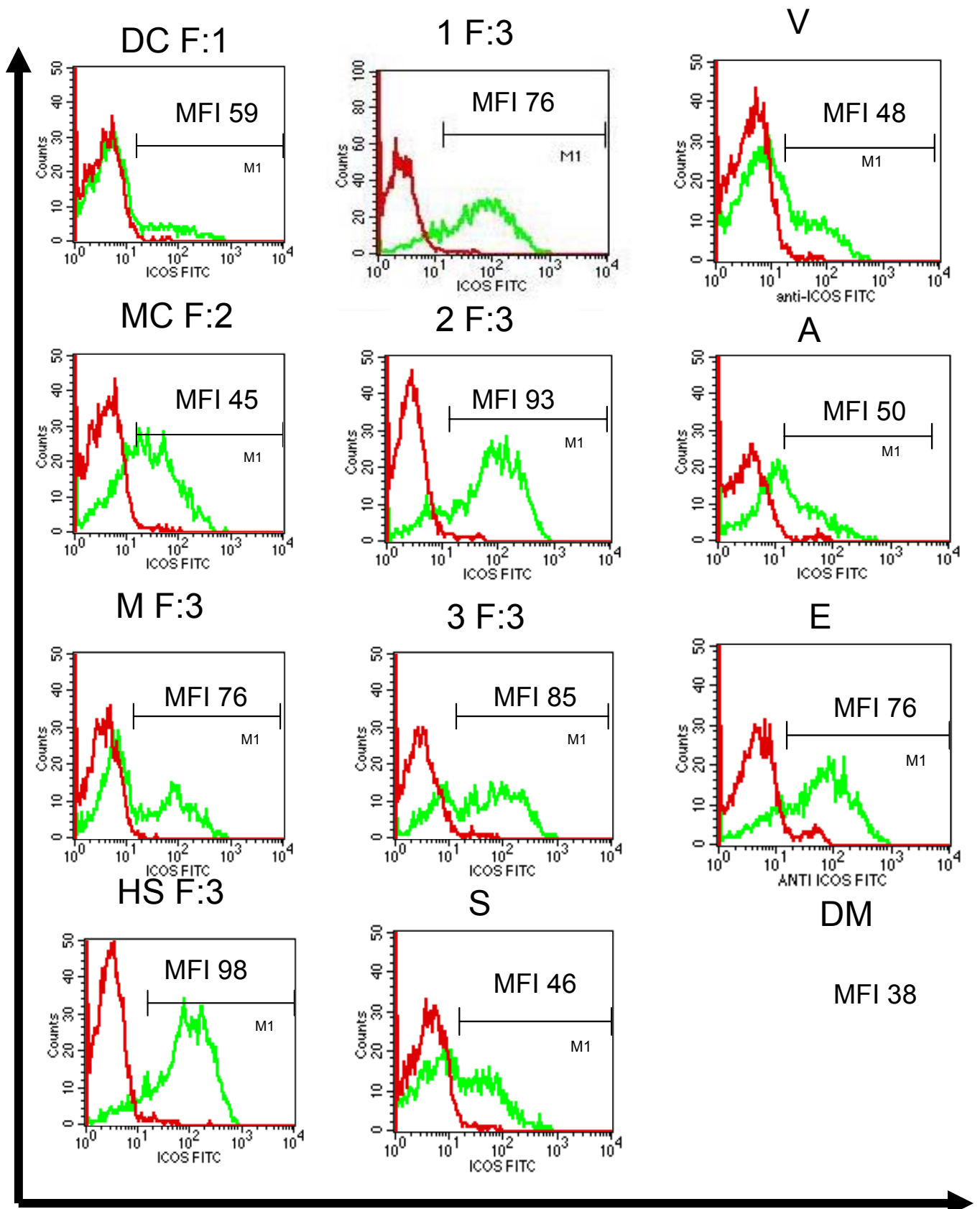
E

**Figura 29.-** Imágenes de la expresión de ICOS en pacientes con enfermedades autoinmunes y deficiencia de IgA como diagnóstico inicial.



DM

**Figura 30.-** Imagen de la expresión de ICOS, en un paciente con IDCV, el cuál tiene familiares en primer grado que han fallecido por infecciones severas (con diagnóstico de ALX).



### Anti- ICOS

**Figura 31.-** Imágenes de la expresión de ICOS en los que se realizo esta técnica. Controles sanos y pacientes.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

La característica principal de la IDVC es la heterogeneidad (edad de presentación de los primeros síntomas, manifestaciones clínicas, alteraciones inmunológicas, etc). Frente a este hecho nosotros postulamos que una fuente de la heterogeneidad fenotípica presente en los pacientes con IDVC podría ser debida al error diagnóstico.

Actualmente, el diagnóstico de la Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC) se hace en base a la presencia de un fenotipo clínico (pacientes con infecciones sinopulmonares y gastrointestinales recurrentes, infecciones bacterianas graves por gérmenes capsulados, enfermedades autoinmunes, etc) y a un fenotipo inmunológico (descenso significativo de los niveles séricos de IgG e IgA asociados a niveles bajos o normales de IgM y una respuesta nula de anticuerpos)<sup>1,2</sup>, en donde se excluyen otros defectos primarios (síndrome de Hiper-IgM, agammaglobulinemia ligada al X o autosómica recesiva, etc) o secundarios de anticuerpos (síndrome nefrótico, enteropatías con pérdidas de proteínas, enfermedad linfoproliferativa, infecciones virales, algunos fármacos, etc)<sup>3</sup>. Esta sistemática de trabajo tiene sus puntos débiles, ya que tras este diagnóstico diferencial se obtiene un “cajón de sastre” de pacientes con hipogammaglobulinemia donde es posible y probable una catalogación errónea. Algunas de las fuentes de este error podrían ser las siguientes:

a) La existencia de casos atípicos<sup>4-8</sup> en otras inmunodeficiencias primarias (IDP) que podrían producir sobrelapamientos fenotípicos con la IDVC, b) la ausencia de pruebas diagnósticas de laboratorio específicas para la IDVC, c) el desconocimiento de la etiología de la enfermedad en la mayoría de los casos, d) la heterogeneidad en las manifestaciones clínicas al debut de la enfermedad, e) la presencia de casos en donde se ha evolucionado de un déficit selectivo de IgA (DIgA) a IDVC, y f) la variabilidad en la gravedad y en la evolución de la enfermedad entre los pacientes.

La existencia de estos errores en el diagnóstico, podría conllevar a una serie de consecuencias graves, ya que el tratamiento, el pronóstico y el consejo

genético familiar podrían variar entre las IDPs que tienen un fenotipo similar pero una etiología distinta.

En respuesta al primer punto, la existencia de casos atípicos en otras inmunodeficiencias primarias (IDP) que producen solapamientos fenotípicos con la IDVC, nosotros propusimos diseñar un método de cribaje que sirviese para excluir a los pacientes diagnosticados de IDVC pero que en realidad padecían otra IDP de origen molecular conocido. Este "screening" debería cumplir una serie de características: que fuese capaz de estudiar la expresión de proteínas asociadas a IDP con fenotipo similar a la IDVC, y que este estudio se hiciese mediante un método accesible y reproducible en cualquier laboratorio clínico de inmunología. Las proteínas elegidas fueron la *btk* (ALX), *SAP* (XLP) y *p56lck* (Déficit de lck)<sup>116,119,124</sup>. No incluimos en el perfil el estudio del CD40 y su ligando (CD154), porque ya lo habíamos estudiado en anteriores trabajos<sup>135</sup>.

Los métodos aconsejados eran la citometría de flujo o el western blot. Aunque la citometría de flujo suele tener ciertas ventajas frente al western blot, elegimos esta última técnica por la falta de disponibilidad de anticuerpos aplicables a la citometría frente a estas moléculas. En base a la experiencia que teníamos sobre la metodología de estudio de la expresión de la *btk*<sup>136</sup>, decidimos elegir un sistema comercial de geles/membranas y tampones (NuPAGE de Novex), ya que suponíamos que reduciríamos la variabilidad de los resultados inter e intra análisis (habilidad técnica, etc). Otro punto fundamental era la elección de los anticuerpos primarios. Las prioridades fueron la fuente comercial y si eran monoclonales mejor para evitar ruido de fondo y su posible aplicación en un futuro a la citometría de flujo. La utilización del anticuerpo monoclonal anti-Btk (Transduction Laboratories) tuvo un resultado semejante al obtenido por el policlonal anti-Btk (donado por la Dra. Kinnon del ICH)<sup>115</sup>, pero decidimos utilizar el primero por ser comercial. El anticuerpo monoclonal anti-lck (Transduction Laboratories) también proporcionó buenos resultados. Con el anticuerpo que tuvimos más problemas fue con los anticuerpos frente a la molécula SAP, ya que el policlonal (donado por la Dra. Nichols<sup>137</sup>, daba "background", y el comercial de Santa Cruz no funcionaba. Para conseguir un test más rápido probamos un sistema comercial



“Unblot” (Pierce), en el cuál se eliminaba la transferencia pero no funcionó en los ensayos.

Del total de los pacientes estudiados sólo en un paciente (A5) la expresión de la banda Btk fue negativa. Este hecho fue confirmado mediante el estudio de la btk intracelular en los monocitos de los pacientes por citometría de flujo y por análisis genético reportándose una mutación en el exón 18 de C1790T, a nivel proteico P597L (realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Paz de Madrid, Dra. MC García). En el caso de la expresión de la proteína Lck, no se encontraron casos con expresión negativa, y la expresión de SAP fue normal también en todos los pacientes.

La presencia de casos dudosos como el paciente con XLA (C2) en donde existía una débil expresión de la proteína Btk debida a una mutación que producía un defecto funcional de la proteína (actividad cinasa) <sup>129</sup> nos hizo reflexionar que el estudio de la expresión de proteínas no es suficiente para el diagnóstico, sino que en ciertos casos hay que complementar con estudios de valoración de la función de las proteínas <sup>116,129</sup>. De este modo el método para el estudio de las proteínas asociadas a IDP se debería componer de: expresión, función y análisis mutacional.

Aunque en este grupo de pacientes sólo hayamos rediagnosticado a un paciente, esto no quiere decir que no haya errores en otras series más amplias; como lo demuestran recientemente los trabajos del “french national study on adults with PID and hypogammaglobulinemia” (DEFI) (VII Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID, Octubre 2006) donde presentaron 2 comunicaciones “SAP deficiency may be diagnosed by systematic screening of a cohort of adults with primary hypogammaglobulinemia” y “Bruton’s Tyrosine gene defects are frequent and highly informative in the DEFI cohort” que dan argumentos para el uso rutinario de estos tests en pacientes con hipogammaglobulinemia, ya que encontraron 2/84 pacientes diagnosticados de IDVC con mutaciones en el SH2D1A (SAP)(199+3A>G y E67G) y 6 pacientes diagnosticados de IDVC con mutaciones en el gen BTK de un total de 62 varones. Además, la utilización de estas pruebas de laboratorio para el soporte al diagnóstico de IDVC han sido

incluidas en la sistemática de trabajo de grupos especializados en IDPs como la Clínica Mayo<sup>138</sup>, hecho que respalda la utilidad de nuestra propuesta<sup>139</sup>.

Este sistema de cribaje de la expresión de estas proteínas en pacientes con IDVC nos puede servir de plataforma de un modelo más completo que incluya el estudio de otras futuras proteínas asociadas a IDP con fenotipo de IDVC (ICOS, CD19, TACI, BAFFR, etc). Un sistema alternativo o complementario es estudiar estas proteínas por citometría de flujo, intracelularmente<sup>140</sup> y SAP<sup>141</sup>, o en lisados celulares mediante un nuevo sistema diseñado por Becton Dickinson Biosciences.

La ausencia de pruebas diagnósticas de laboratorio específicas de IDVC dificulta la catalogación de los pacientes, por lo tanto nos pareció muy útil encontrar algún parámetro inmunológico asociado con la gravedad clínica y el pronóstico de los pacientes. Uno de los posibles candidatos<sup>142,143,144</sup> era el estudio inmunofenotípico de los linfocitos B de memoria, ya que las células B de memoria son un elemento clave en el proceso de producción de anticuerpos y en la literatura se había descrito su disminución en pacientes con IDVC<sup>86,87</sup>. Todo ello nos indujo a estudiar la caracterización clínico-inmunológica de los pacientes con IDVC clasificada según el fenotipo de los linfocitos B. Los linfocitos B de memoria (CD19+CD27+) son las células responsables de una producción de anticuerpos rápida y eficaz frente a un antígeno específico.

Warnatz *et al*<sup>86</sup> de Freiburg, Alemania, en el año 2002, propusieron la primera clasificación de los pacientes con IDVC basada en el número y tipo de los LB de memoria (Clasificación de Freiburg). Según esta clasificación, los pacientes del grupo 1 presentan una disminución del porcentaje de células B de memoria (CD27+IgM-IgD-), mientras que el grupo 2 tiene un porcentaje de estas células similar al presente en los individuos sanos. A su vez, el grupo 1 se subdivide en 1a (pacientes con una proporción incrementada de linfocitos B inmaduros (CD21-) y en 1b (pacientes con un porcentaje normal de linfocitos B CD21-). Sin embargo, la imagen citométrica de los LB CD21- es muy dispersa, con límites de positividad o negatividad difícil de definir. Por todo ello, la valoración de las imágenes citométricas y por consiguiente la clasificación de los

pacientes podría no ser unívoca. Poco después, en el año 2003, Piqueras *et al*<sup>87</sup> de París, Francia, simplificaron esta clasificación, basándose sólo en la expresión de CD27 e IgD (Clasificación de París). Estos dos marcadores proporcionan unas imágenes citométricas más claras y reproducibles. Por dichos motivos, para clasificar a los pacientes con IDVC hemos utilizado la Clasificación de París<sup>87</sup>.

Los linfocitos B (LB) de memoria son células clave en el proceso de formación de los anticuerpos y desde que se describió la molécula CD27 como su marcador<sup>145</sup>, la disminución de estas células en los pacientes con IDVC ha sido documentada<sup>86,87,63,146,147</sup>. La molécula CD27<sup>86-148</sup> es una glicoproteína transmembrana de la familia del receptor de TNF y la interacción con su ligando CD70, en las células T activadas, juega un papel crucial en la diferenciación de la célula B a célula plasmática<sup>63</sup>. Por tanto, no es de extrañar que los defectos de LB CD27+ (memoria) sean útiles para clasificar a los pacientes con IDVC<sup>86,87</sup>.

Bryant y col<sup>149</sup>, describieron en 1990 un método de clasificación funcional de los enfermos con IDCV en base a la capacidad de sus células B de producir inmunoglobulinas (Igs) *in vitro*. Según esta clasificación, los pacientes del grupo A no producen ningún isotipo de Igs, los del grupo B secretan IgM y los pertenecientes al grupo C son capaces de producir tanto IgM como IgG. Diversos estudios describieron una buena correlación entre las clasificaciones basadas en la expresión de CD27 y las basadas en la producción de Igs *in vitro*<sup>86,63,147</sup>, ya que la secreción de IgG depende de la presencia de LB de memoria con cambio de isotipo. Por lo tanto, el grupo A de la clasificación de Bryant se corresponde al grupo BM0 de la clasificación de París, el grupo B al grupo BM1 y el C al BM2<sup>87</sup>. La producción de Igs *in vitro* es una técnica laboriosa cuyos resultados son difícilmente extrapolables y comparables entre laboratorios. Las ventajas de utilizar la citometría de flujo son su accesibilidad, su estandarización relativamente fácil y la buena reproducibilidad de los resultados.

Utilizando la citometría de flujo y basándonos en la expresión de IgD y CD27, identificamos tres subpoblaciones de LB (CD19+) en la sangre de donantes sanos: los LB *naive*-vírgenes, CD27-IgD+ ( $57 \pm 14\%$ ), las células CD27+IgD+ ( $17 \pm 7\%$ ), que representan los LB de memoria sin cambio de isotipo, y la

subpoblación CD27+IgD- ( $22 \pm 10\%$ ) que define a los LB de memoria con cambio de isotipo. El porcentaje de LB de memoria total fue del  $39 \pm 13\%$ . Estos valores no difieren de los publicados por los autores de Freiburg<sup>86</sup> y París<sup>87</sup> en controles sanos.

En los pacientes con IDVC estudiados por nosotros, la distribución de las subpoblaciones de LB fue muy diferente a la hallada en los controles. Se observó una profunda disminución de los LB de memoria ( $p < 0.0001$ ), al igual que han descrito otros grupos de trabajo<sup>86,87,63,145</sup>.

Para la clasificación de los pacientes con IDVC en grupos, según la cuantificación de las subpoblaciones de LB de memoria, se ha utilizado como punto de corte la media menos dos desviaciones estándar de las determinaciones de estas subpoblaciones en los controles. Así, el punto de corte para los LB de memoria total fue 13% y para los LB de memoria con cambio de isotipo fue 6% del total de los LB de sangre periférica. Dichos valores fueron los que mejor diferenciaban a los pacientes de los controles y que a su vez permitieron diferenciar los tres grupos de pacientes. Estos valores son similares a los establecidos por Piqueras *et al.*<sup>87</sup>, del 11% para los LB de memoria totales y el 8% para los LB de memoria con cambio de isotipo. De los 57 pacientes estudiados en el mencionado trabajo<sup>87</sup>, el 47% de los pacientes pertenecieron al grupo BM0, el 33% al grupo BM1 y el 19% restante al grupo BM2. La distribución por grupos de los 41 pacientes estudiados en nuestro trabajo (44%, 39% y 17% respectivamente) fue muy parecida, por lo que se podría considerar que nuestra muestra de pacientes, aunque más pequeña, es igualmente representativa de los pacientes con IDVC.

La ausencia en la literatura de estudios clínicos exhaustivos sobre la asociación entre los LB de memoria y el fenotipo clínico de los pacientes, nos motivó a realizar el presente trabajo. Observamos una correlación positiva entre los defectos de LB de memoria y la gravedad fenotípica clínica de los pacientes. Comparando la edad de inicio de los síntomas, retraso diagnóstico, el tiempo en tratamiento o la edad actual, no hubo diferencias entre los tres grupos de pacientes. Por lo tanto, se podría pensar que la distinta gravedad clínica de los pacientes estudiados es debida al defecto primario de base, diferente en cada uno de los grupos de pacientes.

El grupo BM2 incluyó pacientes cuyos LB expresaban el fenotipo más parecido a los controles sanos, con presencia de ambos tipos de LB de memoria estudiados. A este fenotipo inmunológico le correspondieron unas manifestaciones clínicas más leves: ningún paciente de este grupo desarrolló complicaciones respiratorias o gastrointestinales graves, un enfermo sufrió alopecia areata, vasculitis con manifestaciones únicas a nivel del sistema nervioso central, esplenomegalia, leuco y plaquetopenia (paciente 37), un paciente presentó déficit de IgA y anemia ferropénica y otro plaquetopenia. Piqueras *et al.*<sup>87</sup> estudiaron marcadores de activación de LB y LT en los pacientes con IDVC, clasificados en grupos BM. Encontraron que los pacientes del grupo BM2 presentaron patrones de expresión de marcadores de activación muy similares a los hallados en los controles sanos. Tanto el fenotipo inmunológico como clínico (Piqueras *et al.*<sup>87</sup> y nuestras observaciones) diferenciaron claramente a los pacientes del grupo BM2 de los otros dos grupos. Estas observaciones, junto con el hecho de que los LB, bajo las condiciones experimentales *in vitro*, son capaces de producir IgG e IgM<sup>149</sup>, sugieren que una característica principal de los pacientes en el grupo BM2 podría ser un defecto en la fase final de la producción de inmunoglobulinas<sup>150</sup>.

Al grupo BM1, caracterizado por un fallo en el desarrollo de los LB de memoria con cambio de isotipo, le correspondió el fenotipo clínico intermedio, entre los pacientes con sintomatología mínima del grupo BM2 y los pacientes del grupo BM0 con la sintomatología más grave. Agematsu *et al.*<sup>147</sup> estudiaron la frecuencia de hipermutación somática de la región variable de los genes de las inmunoglobulinas expresados en los LB de pacientes con mayoría de LB sin cambio de isotipo (LB CD27+IgD+) en sangre periférica. En los pacientes estudiados encontraron una frecuencia de hipermutación somática muy inferior a la frecuencia encontrada en los controles sanos, indicando que la mayoría de los LB de estos pacientes son fenotípica y funcionalmente *naïve* y que los LB CD27+IgD+ de pacientes con IDVC no son LB de memoria funcionales. Los LB en estos pacientes no pueden responder a la señal proporcionada por los LT o no la reciben debido a un defecto intrínseco del LT<sup>151-153</sup>. Como resultado, los LB CD27+IgD+ no progresan a LB de memoria con cambio de isotipo. Los pacientes del grupo BM1 serían candidatos al estudio de las alteraciones de

moléculas co-estimuladoras de los LT activados (p.ej. CD40L<sup>50,56</sup>, ICOSL<sup>81</sup>, etc.).

Al grupo BM0, caracterizado por una reducción importante de todos los LB de memoria le correspondieron manifestaciones clínicas más graves. El desarrollo de los LB de memoria está fuertemente ligado a la formación de los centros germinales en los órganos linfoides secundarios<sup>151-153</sup>. El hallazgo de una reducción significativa de los LB de memoria en el grupo BM0 apoya fuertemente la hipótesis de que existan alteraciones en los centros germinales de los pacientes de este grupo. Se han descrito varias posibles causas de alteración de las interacciones en los centros germinales: mutaciones en el gen del ligando de CD40<sup>154</sup>, defectos en la familia del TNF $\alpha$  y su receptor<sup>155</sup> y fallo en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86)<sup>156</sup> o quimiocinas (quimioatrayente de los LB)<sup>157</sup>. Todas estas moléculas son necesarias para la formación de los centros germinales y una interacción bien coordinada entre las células T y B.

Los estudios clínicos publicados hasta la actualidad no valoraron la asociación entre la patología respiratoria o digestiva y los defectos de LB de memoria<sup>86,87</sup>. Piqueras y col.<sup>87</sup>, autores de la clasificación utilizada en este trabajo, encontraron una distribución similar de manifestaciones autoinmunes entre los tres grupos: BM0, BM1 y BM2, mayor incidencia de enfermedad granulomatosa y proliferación linfoide secundaria en los pacientes del grupo BM0 y finalmente, esplenomegalia en el 59% de los pacientes del grupo BM0 y en el 50% de los pacientes del grupo BM1. Dichos autores<sup>87</sup> no valoraron la presencia de bronquiectasias, enfermedad pulmonar crónica o síndrome de malabsorción. Por otra parte, valoraron la presencia de infecciones piógenas, víricas o causadas por patógenos intestinales, no encontrando diferencias en la incidencia de las mismas entre los diferentes grupos de enfermos. Dichos investigadores describieron episodios infecciosos sufridos por los pacientes en algún momento de la vida, pero no valoraron la presencia de éstas al inicio de la enfermedad, al diagnóstico y una vez establecido el tratamiento sustitutivo. Por otro lado, la falta de relación entre subgrupos de células B y episodios de infección no es sorprendente, ya que el estudio fue realizado en pacientes sometidos a tratamiento sustitutivo con gammaglobulinas y este tratamiento ha

demostrado ser muy eficaz en la prevención de procesos infecciosos agudos<sup>158</sup>.

Casi todos los pacientes incluidos en nuestro estudio presentaron también infecciones respiratorias y/o intestinales a lo largo de su vida, pero sólo en algunos provocaron daños estructurales irreversibles. Lo importante a destacar de nuestros resultados es la observación de esta evolución clínica, diferente entre pacientes, según el grupo al que pertenecen. Las bronquiectasias se limitaron a los grupos de enfermos BM0 y BM1, mientras que en los pacientes del grupo BM2 las infecciones respiratorias no han ocasionado estas lesiones. Es más, las bronquiectasias con expectoración (sobreinfecciones de repetición que requieren tratamiento antibiótico continuado en la mayoría de los casos, datos no mostrados), la evolución a enfermedad pulmonar crónica y el síndrome de malabsorción se hallaron con mayor frecuencia en los pacientes del grupo BM0.

La infección no sólo debe valorarse como incidencia de episodios agudos graves, sino también como procesos de infección-inflamación crónica. En el caso del aparato respiratorio, éstos son los procesos responsables de la aparición de patología supurativa crónica, como bronquiectasias, que son la causa principal del deterioro progresivo de la función pulmonar y de muerte en la evolución natural de esta enfermedad<sup>19,158,159</sup>.

Kainulainen *et al*<sup>159</sup>, en un estudio prospectivo de 14 pacientes con hipogammaglobulinemia primaria, demostró la progresión de las bronquiectasias en 5 pacientes, a pesar de que todos ellos recibían tratamiento sustitutivo regular, con niveles preinfusionales de IgG de más de 500 mg/dl (Nota: niveles de acuerdo con los actuales criterios de tratamiento<sup>31</sup>) y no presentaron ninguna infección respiratoria aguda.

No conocemos el número de pacientes que ya tenían bronquiectasias en el momento del diagnóstico, pero comparando la edad de inicio de los síntomas, retraso diagnóstico, el tiempo en tratamiento o edad actual, todos ellos factores descritos previamente, que potencian el desarrollo del daño pulmonar irreversible<sup>18,35,96</sup>, no hubo diferencias entre el grupo de pacientes con y sin bronquiectasias y con y sin enfermedad pulmonar crónica. Por eso, creemos

que la evolución clínica de los pacientes estudiados es debida al defecto primario de base y/o a otros factores inmunomoduladores de la respuesta inflamatoria<sup>160</sup>.

Los autores<sup>87</sup> que han investigado el fenotipo de los LB y LT en los pacientes con IDVC más detalladamente, han encontrado alteraciones en la expresión de algunos de los marcadores de activación (CD25, CD21, CD80 y CD86) en las células B y una hiperexpresión de marcadores de activación crónica (HLA-DR, CD95, CD57) en las células T CD4+ y CD8+, en los pacientes de los grupos BM0 y BM1. Este resultado va en línea con nuestra observación de una afectación clínica e inmunológica importante en estos dos grupos de pacientes. En nuestro estudio, la mayor diferencia hallada al comparar los tres grupos de pacientes entre sí, fue la clínica más grave en el grupo BM0. Las alteraciones del fenotipo inmunológico encontradas en los pacientes del grupo BM0 concordaron con una actividad inflamatoria aumentada en éstos (aumento de CD8, leucocitosis, rasgos de anemia ferropénica).

El tratamiento actual de los pacientes inmunocompetentes con bronquiectasias incluye antibioticoterapia profiláctica continuada<sup>161</sup>, glucocorticoides inhalados y antiinflamatorios no esteroideos<sup>162</sup>, dirigidos a disminuir la actividad inflamatoria en los bronquios. Aunque actualmente el empleo de agentes inmunosupresores/antiinflamatorios en los pacientes con IDP está reservado a las complicaciones autoinmunes<sup>163</sup>, creemos que al menos en los pacientes del grupo BM0 debería ser considerado como un tratamiento adicional a una sustitución adecuada con gammaglobulina intravenosa<sup>159</sup>.

En lo que se refiere a las manifestaciones gastrointestinales, éstas estuvieron presentes en el 49% de nuestros pacientes en el momento del diagnóstico y el 60% de ellos desarrollaron un síndrome de malabsorción y/o diarrea crónica con clara repercusión del estado general. La mayoría de estos pacientes pertenecieron al grupo BM0. Comparando el tiempo del retraso diagnóstico, edad de inicio de síntomas o edad actual de los pacientes, no hubo diferencias entre pacientes con y sin desarrollo de esta patología intestinal. Por eso, creemos que la diferencia de la evolución clínica de los pacientes estudiados es debida al defecto primario de base. La actividad inflamatoria, probablemente



aumentada en el grupo de pacientes BM0, debería ser considerada y consecuentemente tratada.

En cuanto a la incidencia de manifestaciones autoinmunes, cerca del 41% de los pacientes las presentaron en algún momento de su vida. Los porcentajes descritos en la literatura varían entre el 19% (18/95)<sup>18</sup>, 35% (20/57)<sup>87</sup> y 50% (15/30)<sup>86</sup>. En la IDVC han sido asociadas sobre todo las citopenias autoinmunes presentes en el 4%<sup>18</sup>, 17%<sup>87</sup> y 23%<sup>86</sup> de los pacientes con IDCV estudiados en los trabajos arriba mencionados, respectivamente. En nuestro trabajo hemos observado la presencia de citopenias autoinmunes en el 19% de los pacientes. Piqueras *et al.*<sup>87</sup> encontraron manifestaciones autoinmunes en los tres grupos de pacientes, BM2 (27%), BM1 (39%) y BM0 (37%). En nuestro estudio, las diferencias de frecuencia de procesos autoinmunes en el grupo BM0 (55%), BM1 (38%) y BM2 (14%) tampoco fueron estadísticamente significativas, aunque mostraron una cierta tendencia a ser más frecuentes en el grupo BM0.

La etiología de los procesos autoinmunes es un tema de discusión actual y es más complejo entre los pacientes con IDVC<sup>163,164</sup>, ya que son conocidos tanto los casos en los que los fenómenos autoinmunes desaparecen una vez establecida y tratada la IDVC (casos de debut clínico con enfermedad autoinmune), como los casos en los que la enfermedad autoinmune aparece como una complicación a lo largo de la evolución clínica de la IDVC. En los pacientes con una actividad inflamatoria elevada, como en el caso del grupo BM0, los fenómenos autoinmunes se podrían considerar secundarios a una disregulación inmunológica en pacientes con defectos en la capacidad de respuesta anti-infecciosa<sup>160</sup>. La desaparición de los fenómenos autoinmunes una vez controladas las infecciones, hace sospechar un desencadenante infeccioso de éstos. Por otro lado, la ausencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes del grupo BM2 (con la excepción de un único paciente), indicaría la posible menor afectación de dicha capacidad de respuesta anti-infecciosa en los pacientes de este grupo.

Los pacientes del grupo BM1 con enfermedad autoinmune podrían ser los candidatos para estudio de la función de un conjunto de moléculas, descritas recientemente, implicadas en el mecanismo del cambio de isotipo de los

linfocitos B<sup>165</sup>. Nos referimos a las moléculas TACI, BAFFR y sus respectivos ligandos (BAFF y APRIL)<sup>82,83</sup>. En los trabajos que describieron los primeros pacientes con IDCV con mutación en el gen de alguna de estas moléculas, éstos presentaron disminución de los LB de memoria con cambio de isotipo (el fenotipo de LB compatible con el grupo BM1) y el fenotipo clínico de estos pacientes incluía manifestaciones autoinmunes<sup>80,82,83,165</sup>.

En los pacientes del grupo BM0 se ha hallado una diferencia importante, que es la presencia de otros familiares afectados de IDVC y/o DIgA. La herencia familiar entre pacientes con IDVC y/o DIgA es conocida, y varía entre 20%<sup>35</sup> y 25%<sup>18</sup>, pero según nuestro conocimiento, la asociación entre herencia familiar y cierto fenotipo inmunológico no ha sido observada.

Pertenecer al grupo BM0 podría ser un factor de riesgo de transmisión familiar del defecto inmunológico. Para confirmar este hallazgo, sería necesario realizar un estudio con un mayor número de pacientes. La confirmación tendría repercusión en el consejo genético y en la estrategia empleada hasta ahora, para el control de los familiares de estos enfermos. El seguimiento de los parientes de primer grado sigue siendo una práctica poco habitual. Una preselección de las familias a seguir, según el grupo de la clasificación BM, sería de una ayuda considerable para los clínicos y especialistas dedicados al seguimiento de estos pacientes.

Podemos concluir que al fenotipo inmunológico más deficiente (ausencia de LB de memoria) en nuestro estudio, le correspondió la clínica más grave. Nuestros resultados invitan a realizar estudios confirmatorios multicéntricos. Una vez confirmados los resultados, creemos que el tratamiento inmunosupresor/antiinflamatorio podría ser considerado en los pacientes del grupo BM0. Además, dichos estudios darían paso a la investigación de las posibles causas de los defectos presentes en cada grupo de enfermos, dividiendo el síndrome de IDVC en entidades diferentes<sup>35,82,80,86,87,63</sup>, con todas las consecuencias que ello conllevaría (cambios en la estrategia terapéutica, pronóstico, diagnóstico prenatal, etc.).

En un futuro será necesario realizar estudios prospectivos que evalúen la posible evolución de MB2 a MB1 y de MB1 a MB0 en un mismo paciente a lo

largo de los años. Este proyecto junto al estudio de las células B de memoria en la edad pediátrica servirán para aportar luz sobre la historia natural del síndrome.

En el 2002 no se conocía la etiología de la IDVC<sup>6,26,35,171</sup>, hecho que dificultaba la catalogación de los pacientes al no existir pruebas diagnósticas de laboratorio específicas de la enfermedad. El diagnóstico de IDVC se realizaba por exclusión de otras inmunodeficiencias primarias (IDP) con origen genético conocido. La heterogeneidad clínica e inmunológica presente entre los pacientes podría ser consecuencia de la existencia de diferentes orígenes genéticos del síndrome. Nosotros postulamos que una de las posibles etiologías de la hipogammaglobulinemia, podría ser un defecto en la colaboración T-B, ya que los linfocitos B de un grupo de pacientes con IDVC eran capaces de producir y secretar todas las clases de inmunoglobulinas tras el estímulo apropiado en modelos "in vitro" o "in vivo"<sup>149</sup>. Un modelo de anergia/tolerancia reversible de los linfocitos B producida por la falta de un coestímulo apropiado podría explicar la producción defectuosa de anticuerpos, así como la aparición de la enfermedad en la edad adulta y el paso de déficit selectivo de IgA a IDVC descrito en algunos pacientes. Quizás una de las claves que desembocaría en una progresiva hipogammaglobulinemia sería una estimulación antigénica inadecuada, a lo largo de los años, por un defecto de la coestimulación que condujese a una anergia progresiva de las distintas clonas antígeno-específicas en lugar de una respuesta inmunitaria correcta. El defecto de coestimulación podría consistir en una disfunción de la vía del eje coestimulador ICOS-ICOSL, ya que el fenotipo de los modelos animales con defecto de ICOS<sup>78,81,166,167</sup>, (producción defectuosa de anticuerpos antígenos T-dependientes y mayor susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes) era equiparable al observado en los pacientes con IDVC. Las mutaciones en el gen de ICOS o en el de ICOSL, así como en genes de proteínas involucradas en la transducción de señales por esta vía, podrían causar un coestímulo inadecuado. La expresión defectuosa de otras moléculas reguladas directa o indirectamente por el contacto ICOS-ICOSL (CD40L, CD86 y diversas citocinas) también podría explicarse mediante esta hipótesis.

Por estas razones, decidimos estudiar la expresión de ICOS en células de pacientes con IDVC. Lo primero era elegir una población seleccionada en donde realizar el estudio, y los criterios de inclusión fueron: pacientes con historia familiar de inmunodeficiencias primarias y/o enfermedades autoinmunes, y además pacientes que debutaron con manifestaciones autoinmunes, este último criterio lo cumplían la mayoría de los pacientes que inicialmente se diagnosticaron de DlgA pero posteriormente evolucionaron a IDVC<sup>10</sup>.

El diseño técnico debía tener en cuenta que ICOS se expresa en los linfocitos T activados<sup>76</sup> y que en más de un 50% de pacientes con IDVC hay una respuesta T defectuosa in Vitro<sup>19,20</sup>. Por lo cuál, teníamos que utilizar un sistema de activación que fuese eficaz; por esta razón, usamos ésteres de forbol más ionomicina. La visualización de la expresión en membrana mediante citometría de flujo, se obtuvo gracias al anticuerpo monoclonal de hamster armenio C398.4A, donado por el Dr. J.M. Rojo del CSIC, Madrid<sup>81,168</sup>, ya que los anticuerpos comerciales no funcionaron, ni por western blot ni por citometría de flujo.

Nosotros no encontramos ninguna alteración en la expresión de esta molécula en los pacientes estudiados. Este hecho es explicable, ya que en 2003 se describió el primer caso de déficit de ICOS en Alemania<sup>76</sup>, fue un hecho esperanzador ya que era la primer defecto genético asociado a la IDVC, pero posteriormente, tras la detección de otros casos, se vio, que los nueve casos descritos tenían un origen genético común, ya que eran familias de la región de la Selva Negra y todos presentaban la misma mutación<sup>170</sup>. Actualmente, se sabe que menos de un 1% de los pacientes con IDVC presentan mutaciones en el gen que codifica ICOS<sup>79</sup>.

Recientemente se han descrito otros defectos monogénicos que están relacionados con la etiología de la IDVC (ICOS, TACI, BAFFR y CD19)<sup>76,82,83,85</sup>, pero se estima que la frecuencia de la presencia de estos defectos en la población de pacientes no representa más de un 10 por ciento del total de individuos diagnosticados de IDVC. La hipótesis de un origen multifactorial (poligénico más ambiente) del síndrome ha llevado a especular sobre el papel modulador de los polimorfismos de distintos genes sobre el fenotipo clínico, y

entre los candidatos están algunas de las proteínas de la respuesta innata (MBL, TLR9, etc)<sup>87, 169</sup> y genes situados en los cromosomas 16p, 4q.<sup>86,107</sup>

En el futuro se deberán seguir buscando posibles candidatos que estén asociados al origen genético de la IDVC, pero también se debe seguir estudiando los patrones de herencia, penetrancia y correlación fenotipo-genotipo en los defectos moleculares ya descritos. Estos estudios se deberían ampliar a otros defectos primarios de anticuerpos, como el DIgA y el déficit de producción de anticuerpos sin hipogammaglobulinemia, ya que podrían ser distintas expresiones fenotípicas de la IDVC.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. Existe un pequeño porcentaje de errores diagnóstico en los pacientes catalogados de IDVC.
2. El estudio de proteínas asociadas a IDPs, con defecto molecular conocido (*btk*, *lck* y *SAP*), debería incluirse en el algoritmo de pruebas de soporte al diagnóstico de IDVC, para evitar errores en la catalogación de IDP con fenotipo similar a la IDVC.
3. La cuantificación de las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria podría ser un método útil para distinguir entre los diferentes fenotipos clínicos de los pacientes con IDVC.
4. Se encontró una asociación entre la alteración inmunofenotípica B (BM0, BM1, BM2) y la gravedad fenotípica clínica. Al fenotipo inmunológico más deficiente (ausencia de LB de memoria) le correspondió la presentación clínica más grave, observando un mayor número de casos con enfermedad pulmonar crónica, bronquiectasias con expectoración, síndrome de malabsorción y manifestaciones linfoproliferativas.
5. Creemos que nuestros resultados justifican la inclusión de la determinación de los LB de memoria en el estudio inmunológico rutinario de los pacientes con IDVC.
6. El defecto de ICOS en pacientes con IDVC es muy infrecuente.
7. A pesar de la baja frecuencia del defecto ICOS en la población diagnosticada de IDVC, creemos que es aconsejable incluir en el algoritmo de pruebas de soporte al diagnóstico de IDVC, el estudio de la expresión de ICOS en la membrana de los linfocitos T activados.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A., Lichtman A., Pober J. *Inmunología Celular y Molecular*. Cuarta edición. McGraw-Hill- Interamericana 2002. pp.3-15.
2. Roitt I., Brostoff J., Male D. *Inmunología*. Cuarta edición. Harcourt-Brace 1998. pp.1.1-1.12.
3. Ochs H., Smith C.I., Puck J., *Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach*. Oxford 1999. pp. 3-11.
4. Notarangelo L, Casanova J-L, Conley ME. *Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005*. Journal Allergy Clinical Immunol 2006; 117:883-96.
5. European Society Immunodeficiency Primary Registry. Internet: [www.esid.com](http://www.esid.com).
6. REPORT OF A WHO SCIENTIFIC GROUP: *Primary immunodeficiency diseases*. Clinical and Experimental Immunology 1999,118 (Suppl 1) 1:34.
7. C.I. Eduard Smith. *Disease models for every field. Workshop on the molecular basis of human congenital lymphocyte disorders*. EMBO reports 2002, vol.3, No.6, pp 516-520.
8. Scott H Sicherer, Winkelstein JA. *Primary immunodeficiency diseases in adults*. Jama 1998, Jan 7, vol. 279, No.1. 58-61.
9. Stewart DM. *A case of X-linked agammaglobulinemia diagnosed in adulthood*. Clinical immunology 2001; 99(1):94-99.
10. Español T., Catala M., Hernandez M., Caracol I., Bertran JM. *Development of a common variable immunodeficiency in IgA –deficient patients*. Clinical immunology and immunopathology 1996; 80 (3): 333-335.
11. Charlotte Cunningham-Rundles, MD, PhD. *Clinical and immunologic studies of common variable immunodeficiency*. Current Opinion in Paediatrics 1994, 6:676-681.
12. Español T, García-Arumi R, García Sanz JA, et. al. *Inmunodeficiencias Primarias en Cataluña*. Inmunología 1985, 2:76-78.
13. Spickett GP, Webster ADB, Farrant J: *Cellular Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency*. Immunodef Rev 1990, 2:199-219.
14. De Gracia J, Morrell F, Español T, Orriols R, Riba A, Guarner ML, Rodrigo MJ: *Inmunodeficiencia Común Variable: Estudio Clínico de 16 Casos*. Med Clin (Barc) 1988, 91:332-337.
15. Clarie A. Bethune and Spickett GP. *Common Variable immunodeficiency. An Update on Therapeutic Approaches*. BioDrugs 2000 Apr;13 (4):243-253.
16. Cunningham-Rundles C. *Clinical and Immunologic Analyses of 103 Patients with Common Variable Immunodeficiency*. J Clin Immunol 1989, 9:22-33.
17. Thickett KM, Kumararatne DS, Banerjee AK, et.al. *Common variable immune deficiency: respiratory manifestations, pulmonary function and high-resolution CT scan findings*. QJMed 2002; 95:655-662.
18. Kainulainen L., Nikoskelainen J., Ruuskanen O. *Diagnostic Findings in 95 Finnish patients with Common Variable Immunodeficiency*. Journal of Clinical Immunology 2001, 21:145-149.

19. Cunningham-Rundles C., Bodian C. *Common Variable Immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 Patients*. *Clinical Immunology* 1999, 92:34-48.
20. Strober W., Chua K. *Common variable immunodeficiency*. *Clinical Reviews in allergy and immunology*, 2000, vol. 19, 157-181.
21. Kainulainen L. Nikoskelainen J. et. al. *Viruses and bacteria in bronchial samples from patients with primary hypogammaglobulinaemia*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159: 1199-1204.
22. Lane P. *Common variable immunodeficiency: Does life begin at 40?* *Clin Exp Immunol* 1994, 95:201-203.
23. Cadranel J. et. al. *Respiratory manifestations of common variable immunodeficiency in adults*. *Rev Mal Respir*. 2003 Feb, 20 (1 pt 1): 126-33.
24. Martínez García MA, y cols. *Respiratory disorders in common variable immunodeficiency*. *Respiratory Medicine* 2001; 95:191-195.
25. Hausser,CH., Virelizier JL., Buriot D., et. al. *Variable Hypogammaglobulinaemia in Children*. *Am J Dis Child* 1983, 137: 833-37.
26. Hammarström y Vorechovsky I. Webster D. *Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID)*. *Clin Exp Immunol* 2000, 120:225-231.
27. Rudge P., Webster ADB., Revesz T. et.al. *Encephalomyelitis in primary hypogammaglobulinaemia*. *Brain* 1996; 119:1-15.
28. Larner AJ., Webster ADB., Thomas DJ. *Peripheral neuropathy associated with common variable immunodeficiency*. *European Journal of neurology* 2000; 7:573-575.
29. Hermaszewski RA, Webster ADB: *Primary Hypogammaglobulinemia: a Survey of Clinical Manifestations and Complications*. *Quarterly J Med* 1992, 86:31-42.
30. Conley ME, Park CL, Douglas SD. *Childhood common variable immunodeficiency with autoimmune disease*. *J. Pediatr* 1986, 108:915-922.
31. Cunningham-Rundles. *Hematologic complications of primary immune deficiencies*. *Blood Reviews* 2002, 16:61-64.
32. Christopher WH, Juniper MC, Gray W., et.al. *Lymphoid interstitial pneumonitis associated with common variable hypogammaglobulinemia treated with cyclosporine A*. *Thorax* 2000, 55:88-90.
33. Mechanic, LJ. *Granulomatous disease in common variable immunodeficiency*. *Annals of Internal Medicine* 1997; 127 (8):613-617.
34. Filipovich AH, Shapiro RS. *Tumors in Patients with Common Variable Immunodeficiency*. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1991 11:43-46.
35. Spickett GP. *Current perspectives on common variable immunodeficiency (CVID)*. Review. *Clinical and Experimental Allergy* 2001, 31:536-542.
36. Johnson ML., Keeton LG., Zhu ZB., et.al. *Age- related changes in serum immunoglobulins in patients with familial IgA deficiency and common variable immunodeficiency (CVID)*. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:477-483.
37. Oertel SH and Riess H. *Immunosurveillance, immunodeficiency and lymphoproliferations*. *Recent Results in Cancer Research* 2002; 159: 1-8.
38. Cunningham- Rundles C., Cooper DL., Duffy TP., et.al. *Lymphomas of mucosal-associated lymphoid tissue in common variable immunodeficiency*. *American Journal of hematology* 2002; 69:171-178.

39. Mellekjær L., Hammarström L., Andersen V., et al. *Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study.* Clin Exp Immunol 2002; 130:495-500.
40. Muscaritoli M., Fanfarillo F., Luzi G., et al. *Impaired nutritional status in common variable immunodeficiency patients correlates with reduced levels of serum IgA and of circulating CD4+ T lymphocytes.* European journal of Clinical Investigation (2001) 31, 544-549.
41. Preud'homme JL, Griscelli C, Seligmann M. *Immunoglobulins on the Surface of Lymphocytes in Fifty Patients with Primary Immunodeficiency Disease.* Clin Immunol Immunopathol 1973, 1:241-256.
42. De La Concha EG, Oldham G, Webster ADB, et al. *Quantitative Measurements of T- and B-cell Function in "Variable" Primary Hypogammaglobulinemia: Evidence for a Consistent B-cell Defect.* Clin Exper Immunol 1977, 27:208-215.
43. Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, et al. *Three Distinct Stages of B-cell Defects in Common Varied Immunodeficiency.* Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:6008-6012.
44. Waldmann TA, Broder S, Blaese RM, et al. *Role of Suppressor T Cells in Pathogenesis of Common Variable Hypogammaglobulinemia.* Lancet 1974, 11:609-613.
45. Siegal FP, Siegal M, Good RA. *Suppression of B-cell Differentiation by Leukocytes from Hypogammaglobulinemic patients.* J Clin Invest 1976, 58:109-122.
46. Reinherz EL, Cooper MD, Schlossman SF. *Abnormalities of T Cell Maturation and Regulation in Human beings with immunodeficiency disorders.* J Clin Invest 1981, 68:699-705.
47. Kruger G, Welte K, Ciobanu N, Cunningham-Rundles C, et al. *Interleukin-2 Correction of Defective in vitro T-cell Mitogenesis in Patients with Common Varied Immunodeficiency.* J Clin Immunol 1984, 4:295-303.
48. Mayer L, Fu Sm, Cunningham-Rundles C, et al. *Polyclonal Immunoglobulin Secretion in Patients with Common Variable Immunodeficiency Using Monoclonal B Cell Differentiation Factors.* J Clin Invest 1984, 74:2115-2120.
49. Sneller MC, Strober W. *Abnormalities of Lymphokine Gene Expression in Patients with Common Variable Immunodeficiency.* J Immunol 1990, 144:3762-3769.
50. Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, et al. *CD40 Ligand Expression is Defective in a subset of Patients with Common Variable Immunodeficiency.* Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91:1099-1103.
51. Saxon A, Macy E, Denis K, Tary-Lehmann M, et al. *Limited B cell Repertoire in Severe Combined Immunodeficient Mice Engrafted with Peripheral Blood Mononuclear Cells Derived from Immunodeficient or Normal Humans.* J Clin Invest 1991, 87:658-665.
52. Simpson E, Farrant J, Chandler P. *Phenotypic and Functional studies of Human Peripheral Blood Lymphocytes Engrafted in SCID Mice.* Immunol Rev 1991, 124:97-111.
53. Smith CIE, Abedi MR, Islam KB, Johansson MEB, Christensson B, Hammarström L: *Humoral Immunity in SCID Mice Reconstituted with Cells*

- from *Immunoglobulin-deficient or Normal Humans*. *Immunol Rev* 1991, 124:113-138.
54. Nonoyama S, Farrington M, Ishida H, Ochs HD: *Activated B Cells from Patients with Common Variable Immunodeficiency Proliferate and Synthesize Immunoglobulin*. *J Clin Invest* 1993, 92:1282-1287.
  55. Briere F, Bridon JM, Chevet B, Souillet G, et.al. *Interleukin 10 Induces B Lymphocytes from IgA-deficient Patients to Secrete IgA*. *J Clin Invest* 1994, 94:97-104.
  56. Eisenstein EM, Chua K, Strober W. *B Cell Differentiation Defects in Common Variable Immunodeficiency are Ameliorated after Stimulation with Anti-CD40 Antibody and IL-10*. *J Immunol* 1994, 152:5957-5968.
  57. Eibl MM, Mannhalter JW, Zielinski CC, et. al. Ahmad R: *Defective Macrophage-T-cell Interaction in Common Varied Immunodeficiency*. *Clin Immunol Immunopathol* 1982, 22:316-322.
  58. Mannhalter JW, Ahmad R, Eibl MM. *Deficient Antigen Presentation in a Patient with Common Variable Immunodeficiency*. *Immunol Polska* 1986, 11:173-183.
  59. Farrant J, Bryant A, Lever AML, et. al. *Defective Low-density Cells of Dendritic Morphology from the Blood of Patients with Common Variable Hypogammaglobulinaemia: low Immunoglobulin production on Stimulation of Normal B Cells*. *Clin Exper Immunol* 1985, 61:189-194.
  60. Rozynska KE, Spickett GP, Millrain M, et.al. *Accessory and T Cell Defects in Acquired and Inherited Hypogammaglobulinaemia*. *Clin Exper Immunol* 1989, 78:1-6.
  61. Webster ADB, Dalgleish AG, Malkovsky M, et.al. *Isolation of Retroviruses from Two Patients with "Common Variable" Hypogammaglobulinaemia*. *Lancet* 1986, 1:581-583.
  62. Thon V., Eggenbauer H., Wolf HM., et. al *Antigen presentation by common variable immunodeficiency (CVID) B cells and monocytes is unimpaired*. *Clin Exp immunol* 1997; 108:1-8.
  63. Groth G., Drager R., Warnatz K., et. al. *Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID)*. *Clin Exp Immunol* 2002; 129:133-139.
  64. Kruezman S., et. al. *Human Immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae are generated in the spleen*. *J. Exp. Med*, vol. 197, No. 7, april 2003, 939-945.
  65. Gray D. Matzinger P. *T-cell memory is short-lived in the absence of antigen*. *J. Exp. Med* 1991, 174:969 – 974
  66. Carrock Sewell WA., Buckland MS., Jolles SRA. *Therapeutic strategies in common variable immunodeficiency*. *Drugs* 2003; 63 (13) 1356-1371.
  67. Sneller, MC., Strober W. *Abnormalities of lymphokine gene expression in patients with common variable immunodeficiency*. *The Journal of Immunology*. Vol. 144. 3762-3769. No. 10, May 15 1990.
  68. Fischer M.B., Wolf HM., et. al. *Activation via the antigen receptor is impaired in T cells, but not in B cells from patients with common variable immunodeficiency*. *Eur. J. Immunol*. 1996.26:231-237.
  69. Rienzo MD., Serrano D., Zhou Z. *Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/ fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS*. *Clin Exp immunol* 2001; 125:117-122.

70. Zhuo Zhuo, Rouqing Huang, and Charlotte Cunningham-Rundles. *IL-10 production in common variable immunodeficiency. Clinical Immunology and Immunopathology*, Vol. 86, No.3, March, pp 298-304, 1998.
71. Pozzi N. Gaetaniello L., Martire B., et.al. *Defective surface expression of attractin on T cells in patients with common variable immunodeficiency (CVID)*. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:99-104.
72. Aukrust P, Lien E, Krisoffersen AK, et.al. *Persistent activation of the Tumor Necrosis Factor System in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency – possible immunologic and clinical consequences*. *Blood*, vol. 87, No.2 ( january 15), 1996: pp 674-681.
73. Reichenbach J., Schubert R., Schwan C., et.al. *Antioxidative capacity in Patients with common variable immunodeficiency*. *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 20. No.3, 2000, 221-226.
74. Van Der Ven AJAM & Borres GHJ. *Oxidative stress in immunodeficiency (Commentary)*. *European Journal of Clinical Investigation* (1997) 27, 731-732.
75. Aukrust P., Berge RK., Müller F., et.al. *Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency- a marker of enhanced oxidative stress*. *European Journal of Clinical Investigation* (1997) 27, 723-730.
76. Grimbacher B., Hutloff A., Schlesier M., et al. *Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency*, *Nature Immunology* 2003; 4: 261-268.
77. Linsley P. T-cell activation: you can't get good help. *Nature immunology*, vol.2, no.2, feb,2001, 139-142
78. Frauwirth K, Thompson C. *Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation*. *J Clin Invest* 2002, 109: 295-299.
79. Ulrich Salzer and Bodo Grimbacher. *TACItly changing tunes: farewell to a yin and yang of BAFF receptor and TACI in humoral immunity? New genetic defects in common variable immunodeficiency*. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005, 5:496-503.
80. Castigli E., Wilson SA., Garibyan L., Rachid, et.al. *TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency*. *Nature Genetics* Vol. 37, No.8, August 2005.
81. Rojo JM, Portolés P, Yagi J, Dianzani U. *H4/ICOS: a costimulatory protein in the right place at the right time?* *Inmunología* 2001, 20: 196-206.
82. Salzer U., Chapel H. M., Webster A. D., Grimbacher B., et.al. *Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans*. *Nat Genet* 2005; 37(8): 820-828.
83. Salzer U., Gutenberger S., Bossaller L., et.al. *Finally found: Human BAFF-R deficiency caused CVID*. Poster communication at XIth Meeting for the European Society for Immunodeficiencies, Versailles, France, 2004.
84. Menno C. van Zelm, M.Sc, et.al. *An Antibody-Deficiency Syndrome Due to Mutations in the CD19 Gene*. *N. Engl J Med* 2006; 354:1901-12.
85. Franco L. et al. *CVID due a homozygous mutation in the CD19 gene*. Poster communication at XIth Meeting for the European Society for Immunodeficiencies, Versailles, France, 2004
86. Warnatz K, Dena A., Dräger R. et. al. *Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common*

- variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease.* Blood 2002; 99:1544-1551.
87. Piqueras B., Lavenu-Bombled C., Galicier L., et. Al. *Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects.* J Clin Immunol 2003; 23(5): 385- 400.
  88. Maurer D., Holter W., Majdic O., et. al. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. Eur J Immunol 1990; 20(12): 2679- 2684.
  89. Agematsu K., Nagumo H., Yang F. C., et. al. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+B cells and helper T cells in immunoglobulin production. Eur J Immunol 1997; 27(8): 2073-2079.
  90. Klein U., Rajewsky K., Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med 1998; 188(9): 1679-1689.
  91. Kondratenko J., et. al. Lack of specific antibody in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. Clin Exp Immunol 1997; 108:9-13.
  92. Brynat A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cells secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. Clin immunol Immunopathol 1990; 56:239-248.
  93. Friedman JM, Fialkow PJ, Davis SD, Ochs H, Wedgwood RJ. *Autoimmunity in the Relatives of Patients with Immunodeficiencies Diseases.* Clin Exper Immunol 1977, 28:375-388.
  94. De la Concha EG., Fernandez-Arquero M., Martínez A., et.al. *HLA class II homozygosity confers susceptibility to common variable immunodeficiency (CVID).* Clin Exp Immunol 1999; 116:516-520.
  95. Alain Fischer. *Primary immunodeficiency diseases: an experimental model for molecular medicine.* The lancet, 2001 Jun (9), vol. 357.
  96. Schroder, HW. *Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency.* Clinical reviews in allergy and immunology 2000; 19: 127-139.
  97. Vorechovsky I., et. al. *Fine Mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: Identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 Multiple-case families.* The Journal of immunology 2000; 164: 4408-4416.
  98. Ashman RF, Schaffer FM, Kemp JD, et. al. *Genetic and Immunologic Analysis of a Family Containing Five Patients with Common Variable Immune Deficiency or Selective IgA Deficiency.* J Clin Immunol 1992, 12:406-414.
  99. Mullighan CG, Marshall SE., Bunce M., et. al. *Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency.* Genes and immunity 1999; 1:137-148.
  100. Schaffer AA, Pfannstiel J, Webster AD, et. al. Analysis of families with common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency suggests linkage of CVID to chromosome 16q. Hum Genet.2006 Feb; 118(6):725.9

101. Primary Immunodeficiency Diseases. Report of an IUIS Scientific Group. *Clin Exp Immunol* 1999; 118 (Suppl 1): 1-34.
102. Chapel H., Geha R., Rosen F. Primary immunodeficiency diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 9-15.
103. Lovering R. C., Sweatman A, Genet S. A., Middleton-Price H. R., Vetrie D., Vorechovsky I., Bentley D., Fontan G., Espanol T., Morgan G. *Identification of deletions in the btk gene allows unambiguous assessment of carrier status in families with X-linked agammaglobulinaemia.* *Hum Genet.* 1994; 94(1):77-9.
104. Gaspar H., Ferrando M., Caragol I., Hernandez M., Bertran J. M., De Gracia J. *Kinase mutant Btk results in atypical X-linked agammaglobulinaemia phenotype.* *Clin Exp Immunol* 2000; 120:346-350.
105. Lopez-Granados E., Cambroner R., Ferreira A., et. al. *Three novel mutations reflect the variety of defects causing phenotypically diverse X-linked hyper-IgM syndrome.* *Clin Exp Immunol.* 2003; 133(1):123-31.
106. Nistala K., Gilmour K.C., Cranston T., Gaspar H.B., et.al. *X-linked lymphoproliferative disease: three atypical cases.* *Clin Exp Immunol.* 2001; 126(1): 126-130.
107. Uthaisangsook S., Day N. K., Bahna S. L., et al. *Innate immunity and its role against infections.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 253-265.
108. Waleed Al-Herz., et. al. *Antibody response in common variable immunodeficiency.* *Annals of Allergy, asthma and immunology* 2003; 90:244-247.
109. Webster ADB, Farrant J, Hany M, et.al. *Clinical and Cellular Features of "Common Variable" Hypogammaglobulinaemia.* *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1991, 11:32-35.
110. Rump JA, Jahreis A, et. al. *A double blind, placebo-controlled, crossover therapy study with natural human IL-2 (nhuIL-2) in combination with regular intravenous gammaglobulin (IVIg) infusions in 10 patients with common variable immunodeficiency (CVID).* *Clin Exp Immunol* 1997; 110:167-173.
111. Charlotte Cunningham-Rundles., et. al. *Long-Term Low-Dose IL-2 Enhances Immune Function in Common Variable Immunodeficiency.* *Clinical Immunology*, vol.100, no.2, august, pp.181-191, 2001.
112. Aukrust P., Müller F., Ueland T., et. al. *Decreased vitamin A levels in common variable immunodeficiency: vitamin A supplementation in vivo enhances immunoglobulin production and downregulates inflammatory responses.* *European Journal of Clinical Investigation* (2000) 30, 252-259.
113. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood JP: *The Primary Immunodeficiencies.* *New Engl J Med* 1995, 333:431-440.
114. Smith CIE, Vorechovsky I, Hammarstrom L, Islam KB, Vetrie D, Sideras P: *The Molecular Nature of Immunoglobulin Deficiencies.* *The Immunologist* 1993, 1:81-85.
115. Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. *Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA.* *Clin Exp Immunol* 1998, 111(2):334-338.
116. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kishimoto T. *Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked*

- agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection.* Blood 1998, 91:595-602.
117. Nelson DL, Terhorst C. *X-linked lymphoproliferative syndrome.* Clin Exp Immunol 2000, 122:291-295.
  118. H. Kanegane, S. Tsukada, T. Iwata, T. Futatani, K. Nomura, J. Yamamoto, T. Yoshida, K. Agematsu, A. Komiyama y T. Miyawaki. *Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese immunodeficiency registry.* Clin Exp Immunol 2000; 120:512-517.
  119. Morra M, Howie D, Grande MS, et. al. *X-linked lymphoproliferative disease: A progressive immunodeficiency.* Annu. Rev. Immunol 2001, 19:657-682.
  120. Wu CH, Sayos J, Wang N, et. al. *Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease.* Immunogenetics 2000, 51:805-815.
  121. Candotti F., et.al. *Molecular aspects of primary immunodeficiencies: lessons from cytokine and other signalling pathways.* The Journal of Clinical Investigation 2002; 109 (10): 1261-1269.
  122. Castro AG, Hauser TM, Cocks BG, et.al. *Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): Differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells.* The Journal of Immunology 1999, 163:5860-5870.
  123. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family.* EMBO Rep. 2006 Oct; 7 (10): 988-994.
  124. Sawabe T, Horiuchi T, Nakamura M, et.al. *Defect of Ick in a patient with common variable immunodeficiency.* International Journal of Molecular Medicine 2001, 7:609-614.
  125. Goldman FD, Ballas ZK, Schutte BC, et. al. *Defective expression of p56<sup>lck</sup> in infant with severe combined immunodeficiency.* J. Clin Invest. 1998, 102: 421-429.
  126. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, et. al. *The CD4 and CD8 T Cell Surface Antigens Are Associated with the Internal Membrane Tyrosine Protein Kinase p56<sup>lck</sup>.* Cell 1988, 55:301-308.
  127. Arnaiz-Villena A, Timón M, Rodríguez-Gallego C, et. al. *Human T-Cell Activation Deficiencies.* Immunol Today 1992, 13:259-265.
  128. Español T, Ferrando M, Caragol I, Hernández M, Bertrán JM, Gracia X DE, Lester T, Kinnon C, Ashton E, Gaspar HB. *Kinase mutant Btk results in atypical X-linked agammaglobulinaemia phenotype.* Clin. Exp. Immunol. 2000 May; 120 (2):346-350.
  129. Español T, Hernández M, Caragol I, Ferrando M, Bertrán JM. *Diagnóstico de la inmunodeficiencia común variable en niños.* Inmunología 1998; 17: 79-83.
  130. Roca J., Burgos F. Sunyer J., et. al. *Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey.* Eur Respir J. 1998; 11(6): 1354-1362.
  131. Mardiney M. 3rd, Brown M.R., Fleisher T.A. *Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals.* Cytometry 1996; 15;



- 26(4): 305-310. Cox R.A. Methods in enzymology. (Grossmann, L. And Moldave, E., Eds) 1968; Vol 12, Part B: 120 - 129, Academic Press, Orlando, FL.
132. Rodrigo M.J., Codina R., de Gracia J., Morell F., Pascual C. *Normal values of the immunoglobulin G subclasses in an adult population. Importance in a study of their deficiency.* Med Clin (Barc) 1992; 98(5): 166-17.
  133. Rodrigo M. J, Miravittles M., Cruz M. J, De Gracia J, Vendrell M., Pascual C., Morell F., Characterization of specific immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population: proposal for response criteria. Clin Diagn Lab Immunol. 1997; 4(2): 168-172.
  134. Rodrigo M. J, Vendrell M., Cruz M. J, Miravittles M., Morell F., De Gracia J. Utility of the antibody response to a conjugated haemophilus influenzae type B vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. AJRCCM 2000; 162: 1462-1465.
  135. Hernandez M, Caragol I, de Gracia X, Ferrando M, Urbán S, Español T. *Expresión de CD40L en inmunodeficiencias primarias de anticuerpos.* Inmunología 1997; 16: 123-128.
  136. Ferrando M, Caragol I, Hernández M, de Gracia X, Bertrán JM, Español T. *BTK expression in CVID patients with low or absent B cells.* VIII Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Rodas, Octubre 1998
  137. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. Blood. 2004 May 15;103(10):3821-7)
  138. Weiler CR., Bankers-Fulbright, JL. *Common Variable Immunodeficiency: Test Indications and Interpretations.* Mayo Clin Proc. 2005; 80(9): 1187-1200
  139. Zarate C, El Hakeh J, Alvarez A, bertran JM, Vidaller A, Caragol I, de Gracia J, Español T, Hernandez M. *Diagnosis of CVID: protein screening analysis to role out other primary antibody deficiency syndromes.* 10th Meeting ESID, Weimar, octubre 2002).
  140. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kishimoto T. *Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection.* Blood 1998, 91:595-602.
  141. Zhao M. Kanegane H. Futatani T., et.al. *Enhanced expresión of SAP in CD45RO+ CD8+ T cells and NK cells and its deficiency in X-linked lymphoproliferative disease.* VII Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Octubre 2006
  142. Schejbel L., Marquart H., Andersen V., et. al. *Deficiency of somatic hypermutation of immunoglobulin G transcripts is a better predictor of severe respiratory tract infections than lack of memory B cells in common variable immunodeficiency.* J Clin Immunol. 2005; 25(4): 392-403.
  143. Slilini A et al. *Mutation analysis of B-lymphocyte induced maturation protein-1 in patient with CVID.* Poster communication at XIth Meeting for the European Society for Immunodeficiencies, Versailles, France, 2004.
  144. Taubenheim N., von Hornung M., Durandy A., Warnatz K., Corcoran L., Peter H.H., Eibel H. *Defined blocks in terminal plasma cell differentiation*

- of common variable immunodeficiency patients.* J Immunol. 2005; 175(8): 5498-5503.
145. Tangye S. G., Liu Y. J., Aversa G., Phillips J. H., de Vries J. E. *Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27.* J Exp Med 1998; 188(9): 1691-1703.
  146. Brouet J. C., Chedeville A., Femand J. P., Royer B. *Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency.* Eur J Immunol 2000; 30(9): 2516- 2520.
  147. Agematsu K., Futatani T., Ochs H. D. et.al. *Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency.* Clin Immunol 2002; 103(1): 34-42.
  148. Hutloff, A., Dittrich, A., Beier, K., et al., *ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28,* Nature 1999; 397:263-266.
  149. Bryant A., Calver N. C., Toubi E., Webster A. D. B., Farrant J. *Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell section of IgM and IgG in response to anti-IgM and Interleukin-2.* Clin Immunol Immunopathol 1990; 56: 239- 248.
  150. Taubenheim N., von Hornung M., Durandy A., et. al. *Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients.* J Immunol. 2005; 175(8): 5498-5503.
  151. Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., Komiyama A. *CD27: A memory B-cell marker.* Immunol Today 2000; 21: 204- 206.
  152. Agematsu K., Nagumo H., Oguchi Y., Nakazawa T., Fukushima K. et al. *Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction.* Blood 1998; 91(1): 173- 180.
  153. Jacquot S., Kobata T., Iwata S., Morimoto C., Schlossman S.F. *CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling.* J Immunol 1997; 159(6): 2652-2657.
  154. Korthauer U., Graf D., Mages H.W., Briere F., Padayachee M. et al. *Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM.* Nature 1993; 361(6412) :539- 541.
  155. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L. et al. *Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94(17): 9302- 9307.
  156. Han S., Hathcock K., Zheng B., Kepler T.B., Hodes R., Kelsoe G. *Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers.* J Immunol. 1995 Jul 15;155(2):556-67.
  157. Ansel K.M., Ngo V.N., Hyman P.L., Luther S.A., Forster R. et al. *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.* Nature 2000; 406(6793): 309- 314.
  158. De Gracia J., Vendrell M., Álvarez A., Pallisa E., Rodrigo M. J., De la Rosa D., Mata F., Andreu J., Morell F. *Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency.* Int Immunoph 2004 ; 6 :745-753.

159. Kainulainen L., Varpula M., Liippo K., et. al. *Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia*. J Allergy Clin Immunol 1999; 104(5): 1031-1036.
160. Buckley R.H. *Pulmonary complications of primary immunodeficiencies*. Paediatr Respir Rev 2004; 5 Suppl A: S225- 33.
161. Barnes P.J. *Inhaled glucocorticoids for asthma*. N Engl J Med 1995; 332(13): 868- 875.
162. Llewellyn-Jones C.G., Johnson M.M., Mitchell J.L., Pye A., Okafor V.C., Hill S.L., Stockley R.A. *In vivo study of indomethacin in bronchiectasis: effect on neutrophil function and lung secretion*. Eur Respir J 1995; 8(9): 1479- 1487.
163. Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. *Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases*. Blood 2002; 15; 99(8): 2694- 702.
164. Schroeder H.W. Jr. *Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency*. Clin Rev Allergy Immunol 2000; 19(2): 127-140.
165. Castigli E., Wilson S. A., Scott S., Dedeoglu F., Xu S., Lam K. P., Bram R. J., Jabara H., Geha R. S. *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells*. J Exp Med 2005; 201(1): 35-39.
166. Carreno B, Collins M. *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses*. Annu Rev Immunol 2002, 20:29-53
167. Linsley P. *T cell activation: you can't get good help*. Nature Immunology 2001, 2: 139-140
168. Buonfiglio D., Bragardo M., Redoglia V., et.al. *The T cell activation molecule H4 ant the CD28-like molecule ICOS are identical*. Eur. J. Immunol, 2000. 30:3463-67.
169. Cunningham-Rundles C., Radigan L., Knight AK., et.al. *TLR9 activation is defective in common variable immunodeficiency*. J. Immunol,2006 Feb 1; 176 (3):1978-87.
170. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Grimbacher B., et.al. *Human ICOS-deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency*. Blood. 2006 Apr 15; 107 (8):3025-52.

## **8. ANEXOS**

## ABREVIATURAS MÁS FRECUENTEMENTE UTILIZADAS

ID=	Inmunodeficiencias
IDP=	Inmunodeficiencias primarias
IUIS=	International Union of Immunology Societies
ESID =	Sociedad Europea de Inmunodeficiencias
REDIP =	Registro Español de Inmunodeficiencias primarias
DlgA=	Deficiencia de IgA
IDCV =	Inmunodeficiencia común variable
ALX =	Agammaglobulinemia ligada a X
ADA=	Adenosin desaminasa
WAS=	Síndrome de Wiskott Aldrich
EGC=	Enfermedad Granulomatosa Crónica
CMV=	Citomegalovirus
GI=	Gastrointestinal
SNC=	Sistema Nervioso Central
AI=	Autoimmune
AHA=	Anemia Hemolítica Autoimmune
PTI=	Púrpura Trombocitopenia Idiomática
AR=	Artritis Reumatoide
HNL=	Hiperplasia Nodular Linfoide
NLI=	Neumonitis linfoide intersticial
BALT=	Tejido linfoide asociado a mucosas
XLP=	Síndrome linfoproliferativo ligado a X
HIM =	Síndrome de Hiper IgM
VIH=	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VEB=	Virus de Epstein Barr
PHA=	Phytohemaglutinina
CPA=	Célula Presentadora de antígeno
MHC=	Complejo mayor de histocompatibilidad
INF=	Interferon
GGIV=	Gammaglobulina Intravenosa
ICOS=	Inducible costimulator
TACI =	Transmembrane activator and CAML interactor
BAFF =	B-cell activating factor
BAFF-R =	Receptor B-cell activating factor
TNFR =	Receptores del factor de necrosis tumoral
APRIL=	A proliferation-inducing ligand
FACS=	Clasificación fluorescente de células activadas
HLA=	Antígeno leucocitario humano
TCAR= T	Tomografía computarizada de alta resolución
Btk =	Bruton Tirosin kinasa
SLAM=	Molécula señalizadora de activación linfocítica
SAP=	Proteína asociada al SLAM
PFR=	Pruebas de función respiratoria
TAC=	Tomografía axial computarizada
VEMS=	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
CVF=	Capacidad vital forzada
EPC=	Enfermedad Pulmonar crónica

PBMC=	Células mononucleadas de sangre periférica
RR=	Riesgo relativo
IRR=	Infecciones respiratorias recurrentes
AcMo=	Anticuerpos Mononucleares
LT=	Linfocitos T
LB=	Linfocitos B
TCR=	Receptor de células B
TNF=	Factor de Necrosis Tumoral
sTNFRs=	Receptores Solubles de Factor de Necrosis Tumoraes
BM=	Células B de Memoria
VHC=	Virus de Hepatitis C
HUVH=	Hospital Universitario de Vall d Hebron
CMF=	Citometría de flujo