



**Programa de Investigación Biomédica  
Escuela de Graduados, Facultad de Medicina  
Universidad de la República**

## **TESIS DE MAESTRIA**

**Análisis de diferentes factores de transcripción implicados en el desarrollo del linfocito B  
en la enfermedad de Inmunodeficiencia Común Variable**

**Dra. Virginia Patiño**

**ORIENTADORES CLINICOS: Dr. Matías Oleastro, Prof. Dr. Gustavo Giachetto.  
ORIENTADOR BASICO: Dr. Pablo Oppezzo.**

Ejecución del proyecto: Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, CABA.  
Hospital de Pediatría del Centro Hospitalario Pereira Rossell.  
Unidad de Proteínas Recombinantes. Instituto Pasteur de Montevideo



**El anteproyecto de maestría fue aprobado por el Programa de Investigación Biomédica (Pro.in.bio) en el año 2010.**

**Esta tesis de postgrado contó con una beca de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) para su realización**

### **Agradecimientos**

A mi hija por enseñarme que se puede si se quiere  
A mi mamá por darme la vida y enseñarme a ser libre  
A mis hermanas por salvarme una y otra vez  
A mis maestros y tutores por el desafío  
A mis compañeros de laboratorio del IPMont por enseñarme a pipetear  
A mi amiga Paula por impregnarme de tanto amor hacia las ciencias biológicas  
A todos los que me ayudaron a sanar y escribir  
A mis vecinos de la coope por la mano de siempre en todo

## INDICE

RESUMEN.....	3
--------------	---

### CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.0 INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE.....	4
1.1 Generalidades.....	4
1.2 Critrios diagnósticos.....	4
1.3 Defectos genéticos.....	5
1.4 Patogenia.....	8
1.5 Manifestaciones clínicas.....	11
1.5.1 <i>Infecciones</i> .....	11
1.5.2 <i>Manifestaciones no infecciosas</i> .....	12
1.6 Tratamiento.....	15
1.6.1 <i>Prevención de las infecciones</i> .....	15
1.6.2 <i>Inmunizaciones</i> .....	16
1.6.3 <i>Tratamiento de las complicaciones</i> .....	16
1.7 Pronóstico.....	18
2.0 DESARROLLO DEL LINFOCITO B.....	19
2.1 Maduración temprana o central.....	19
2.2 Desarrollo del linfocito B en periferia.....	21
3.0 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	26
3.1 Factores implicados en etapas tempranas de la diferenciación B.....	28
3.2 Factores implicados en etapas tardías de la diferenciación B.....	30

HIPÓTESIS.....	33
----------------	----

OBJETIVOS.....	33
----------------	----

### CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental.....	34
2.2 Aspectos éticos.....	34
2.3 Aspectos clínicos y perfil inmunológico.....	34
2.4 Aspectos moleculares.....	35
2.4.1 <i>Obtención y procesamiento de las muestras</i> .....	35
2.4.2 <i>Purificación de células mononucleares</i> .....	35
2.4.3 <i>Purificación de linfocitos B</i> .....	36
2.4.4 <i>Extracción de ARN de linfocitos B y no B</i> .....	36
2.4.5 <i>Optimización de la técnica de extracción de ARN para las células B</i> .....	37
2.4.6 <i>Síntesis de ADNc (Retro Transcripción)</i> .....	37
2.4.7 <i>Diseño y selección de primers para los factores de transcripción(FT)</i> .....	38
2.4.8 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	39
2.4.9 <i>Cuantificación de la PCR y análisis de los datos</i> .....	39

2.4.10 <i>Activación in-vitro de células B del paciente IDCV1</i> .....	40
2.4.11 <i>Clonado y secuenciado del producto de PCR del FT XBP-1</i> .....	41

### **CAPÍTULO 3: RESULTADOS**

<b>3.1</b> Caracterización clínico-inmunológica de los pacientes con IDCV.....	42
3.1.1 <i>Hospital de Pediatría “Prof. Dr Juan P. Garrahan”</i> .....	42
3.1.2 <i>Hospital de Pediatría, Centro Hospitalario Pereira Rossell (HP-CHPR)</i> ....	46
<b>3.2</b> Análisis de la expresión molecular de los FT en células B de niños con IDCV del HP-CHPR.....	49
3.2.1 <i>Purificación de LB a partir de PBMC y evaluación de la pureza</i> .....	49
3.2.2 <i>Puesta a punto de la amplificación de los distintos FT</i> .....	51
3.2.3 <i>Expresión de los FT E2A y PAX-5</i> .....	52
3.2.4 <i>Expresión de los FT IRF-4 y XBP-1</i> .....	53
3.2.5 <i>Expresión de los FT ID-2 y STAT-6</i> .....	55
3.2.6 <i>Expresión de E2A y PAX-5 en IDCV1, luego de la activación in vitro de las células B</i> .....	56
<b>3.3</b> Perfil clínico y molecular en los pacientes con IDCV asistidos en HP-CHPR....	58
<b>DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>Conclusiones y perspectivas</b> .....	73
<b>Contribuciones</b> .....	74
<b>Bibliografía</b> .....	75
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	86
<b>Anexo I</b> .....	88

## RESUMEN

La inmunodeficiencia común variable (IDCV) es la inmunodeficiencia primaria sintomática más frecuente en la infancia y la edad adulta. Se trata de un grupo heterogéneo de condiciones clínicas, caracterizado por la falla en la producción de anticuerpos frente a patógenos. La pérdida de función de los linfocitos B (LB) constituye el defecto inmune principal. De acuerdo a reportes internacionales, la mayoría de los casos de IDCV ocurren de forma esporádica y en más del 90 % no se conoce el defecto genético. La hipogammaglobulinemia, característica de esta enfermedad, ocurre en algunos casos por alteraciones en las etapas tempranas de diferenciación de la célula B y con mayor frecuencia por falla o bloqueo de la diferenciación durante los eventos tardíos. La maduración del LB es regulada por distintos factores de transcripción (FT) que se activan o reprimen de forma coordinada. La expresión de los FT E2A y PAX-5 ocurre durante los estadios tempranos y se continúa en LB maduros; mientras que la expresión de BLIMP-1, XBP-1 e IRF-4 se activa durante la diferenciación a plasmocitos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, esta tesis se propuso evaluar si posibles diferencias en el perfil de expresión de FT, implicados en el desarrollo del linaje B, podrían explicar la hipogammaglobulinemia de la IDCV en niños. Esta enfermedad tiene un espectro de presentación clínica muy variado, desde casos que solo se presentan con infecciones a situaciones donde las manifestaciones por desregulación predominan, afectando severamente la calidad de vida y el pronóstico de esos pacientes. En este sentido nos interesó describir el fenotipo clínico prevalente en la edad pediátrica; y establecer posibles asociaciones con un perfil de expresión diferencial para los FT. Nuestro objetivo principal fue contribuir al conocimiento sobre aspectos clínico-básicos de la IDCV en la edad pediátrica. Los objetivos específicos fueron: 1) caracterizar el fenotipo clínico e inmunológico de niños con IDCV asistidos en el HP-CHPR y del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"; 2) analizar el perfil de expresión de FT implicados en la diferenciación del LB en niños con IDCV asistidos en el HP-CHPR; y 3) caracterizar el perfil clínico y molecular en niños con IDCV del HP-CHPR. Para describir el fenotipo inmunológico y clínico realizamos la revisión retrospectiva y prospectiva de las historias clínicas. Para estudiar la expresión de FT analizamos muestras de sangre por PCR- semicuantitativa de los siguientes genes *E2A*, *PAX-5*, *ID-2*, *STAT-6*, *IRF-4* y *XBP-1* en niños del HP-CHPR y las comparamos con controles sanos. Describimos el perfil clínico e inmunológico en niños con IDCV de Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" y por primera vez en el HP-CHPR. El fenotipo clínico prevalente está caracterizado por manifestaciones no infecciosas, además de las infecciones recurrentes y especialmente respiratorias observadas en el HP-CHPR. En relación al fenotipo inmunológico todos presentaron hipogammaglobulinemia y disminución de la LB con cambio de isotipo.

Por primera vez en Uruguay realizamos la puesta a punto de técnicas de biología molecular, PCR-semicuantitativa, para identificar seis genes de FT en niños con IDCV. Nuestros resultados mostraron diferencias en el perfil de expresión génica de los FT en las células B de pacientes con IDCV del HP-CHPR cuando se los comparó con donantes sanos. Dos de estos FT están vinculados con etapas tempranas del desarrollo B como son E2A y PAX-5; el tercer factor XBP-1 está vinculado con etapas tardías y la capacidad de la célula B de secretar anticuerpos.

Los hallazgos moleculares aportan evidencia a favor de la hipótesis de un posible defecto en la expresión génica de FT como causa de las alteraciones durante la maduración del LB en la IDCV. Estos datos podrían ser utilizados para generar un panel de FT que estando implicados en esta enfermedad, sea útil cuantificar. Para ello, nuevos juegos de primers y la puesta a punto en PCR cuantitativa podría ser instaurada luego de haber confirmado estos datos en una cohorte mayor de pacientes.

# CAPITULO 1: INTRODUCCION

## 1.0- INMUNODEFICIENCIA COMUN VARIABLE

### 1.1 Generalidades

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un grupo de enfermedades genéticas, producidas por un defecto intrínseco del sistema inmune (linfocitos T, B y NK, células fagocíticas polimorfonucleares y mononucleares o a las proteínas del complemento), el cual puede ser cuantitativo y/o cualitativo (1). En los últimos 10 años se han realizado grandes avances en la identificación de las causas moleculares de muchas de ellas, permitiendo así un diagnóstico más preciso del tipo de IDP y estimando su incidencia en 1 de cada 10000 nacidos vivos (2).

Se clasifican en 8 grupos en base al defecto inmunológico principal: **I)** inmunodeficiencias combinadas (células T y B); **II)**, otros síndromes con inmunodeficiencias bien definidos; **III)** deficiencias predominantemente de anticuerpos; **IV)** enfermedades con desregulación; **V)** defectos congénitos de los fagocitos en el número, la función o ambos; **VI)** defectos de la inmunidad innata; **VII)** síndromes autoinflamatorios; **VIII)** deficiencias del complemento (3, 4).

Dentro del grupo III, la **inmunodeficiencia común variable (IDCV)** es la IDP sintomática más frecuente en niños y adultos; su característica principal es la hipogammaglobulinemia asociada a defecto en la producción de anticuerpos e infecciones recurrentes. Fue descrita por primera vez en 1953 y se estima una incidencia entre 1:25000 a 1:60000 nacidos vivos (5).

Se trata de una enfermedad de presentación clínica heterogénea que afecta ambos sexos por igual y se suele manifestar en la infancia tardía o en la edad adulta (6, 7).

### 1.2 Criterios diagnósticos

Para el diagnóstico de IDCV se aplican los criterios definidos por la European Society for Immunodeficiencies (en inglés: ESID) y el Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias (PAGID). Los autores definen como “*probable* IDCV” a toda mujer u hombre con marcado descenso de la IgG en al menos 2 DE por debajo de la media para la edad y marcado descenso de otro isotipo IgA o IgM. Sumado a esto se deben cumplir los siguientes tres criterios: debut de la inmunodeficiencia luego de los 2 años de vida, ausencia de isohemaglutininas y/o pobre respuesta de anticuerpos a las vacunas; y la exclusión de otras causas de hipogammaglobulinemia (8, 9).

Dentro de estas últimas se incluyen las causas secundarias: pérdidas intestinales, renales o grandes quemados; drogas (anticomiales, sulfazalacina, glucocorticoides, azatioprina); enfermedades malignas (timoma, linfomas); anomalías cromosómicas (trisomías o monosomías); infecciones específicas (congénitas por *Citomegalovirus* o *Rubéola*, virus de *Epstein Barr*, HIV) (7,8). Una vez excluidas estas causas se requiere descartar otras IDP con fenotipo clínico-inmunológico similar a la IDCV y defecto genético conocido. Dentro de este grupo diferencial se encuentran defectos en la ontogenia temprana como mutaciones en el gen *BTK*, responsable de la forma más común de agammaglobulinemia pediátrica (XLA), para el caso de los pacientes con linfocitos B (LB)  $\leq$  2%; y defectos en centro germinal (CG) como deficiencias en CD40L, AID y UNG, en pacientes que cursan

con valores de IgM normales o elevados. Los pacientes menores a dos años, pueden presentar una hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia que se caracteriza por una buena funcionalidad de anticuerpos, curso benigno y evolución a valores normales con la edad.

De presentarse un compromiso de la inmunidad mediada por el linfocito T (LT) de cierta magnitud, el cuadro ya correspondería a la categoría Inmunodeficiencias Combinadas. Otras situaciones diferenciales incluyen IDP del grupo IV en pacientes con manifestaciones por desregulación asociada a EBV.

Debido al solapamiento de las manifestaciones clínicas e inmunológicas de la IDCV con otras causas de hipogammaglobulinemia primaria en los primeros años de vida, el diagnóstico de IDCV no puede ser establecido antes del cuarto año de vida aun cuando las manifestaciones estén presentes en forma precoz (8).

### **1.3 Defectos genéticos**

La mayoría de los casos de IDCV se presentan de forma esporádica, solo alrededor de un 10 % de los casos se documentan antecedentes familiares de deficiencia de IgA, de IDCV o de déficit de anticuerpos no clasificado (6, 9).

La IDCV es considerada una enfermedad poligénica; algunas de las variantes genéticas descritas no constituyen la causa de la enfermedad sino un epifenómeno asociado a complicaciones o a un mayor riesgo de desarrollarla. Así mismo, a diferencia de lo que ocurre en otras IDP, más del 90% de los pacientes con IDCV carecen de un defecto molecular identificado (10).

En los últimos 10 años se ha observado un importante avance en la identificación de defectos moleculares por variantes génicas patogénicas que condicionan esta patología, en especial en formas familiares, caracterizándose patrones de herencia autosómica dominante como prevalentes (11).

Además se han identificado variantes génicas de susceptibilidad para desarrollar IDCV o deficiencia de IgA. Ejemplo de ellos son determinados haplotipos de la región HLA (DQ2, DR7, DR3, B8, B44) en los cromosomas 6p, 4q y 16q (12-14).

Los **defectos monogénicos** afectan a unos pocos pacientes, pero permiten identificar los puntos débiles de la diferenciación terminal de los LB, asociados a defectos intrínsecos o de la interacción T-B. Las variantes génicas que condicionan IDCV de herencia autosómica recesiva (AR) identificadas se encuentran en genes relacionados con el desarrollo del LB; y en forma más reciente variantes de herencia autosómica dominante (AD) además de recesiva, implicados en los mecanismos de regulación de la respuesta efectora y la tolerancia periférica.

Los defectos moleculares pueden comprometer tanto el desarrollo de los LB como los mecanismos de regulación de la respuesta efectora y la tolerancia periférica.

#### **Moléculas cuyos defectos comprometen la diferenciación de LB:**

**ICOS** (del inglés, "inducible co-stimulator") se trata de un receptor de los linfocitos T activados vinculado estructural y funcionalmente al LB en la reacción del centro germinal durante la maduración tardía (15, 16). Fue el primer defecto genético descrito en el año 2003, como causa monogénica para la IDCV; pudiendo manifestarse en la edad pediátrica o en la adultez.

Estos pacientes presentaban una delección homocigota en el gen *ICOS* asociada a un fenotipo con hipogammaglobulinemia y una reducción significativa de la población de LB memoria con cambio isotípico (17, 18).

Posteriormente se describieron otras variantes patogénicas en *ICOS*, sin una clara relación genotipo-fenotipo, demostrando una disfunción más amplia en la función del linfocito T con una disminución de los linfocitos T memoria y T reguladores en pacientes con deficiencia humoral asociada a manifestaciones autoinmunes e inflamatorias (19).

**CD19:** forma parte de un complejo de proteínas (CD19, CD21, CD81, CD225) de membrana, asociado al BCR (del inglés, "B cell receptor") del LB maduro. Es responsable de disminuir el umbral de activación por el antígeno y traducir la señal en el citoplasma (20).

El primer reporte referido a defectos homocigotos en el gen *CD19* asociado a IDCV fue en el 2006, cuando van Zelm y col. describen cuatro pacientes con historia de infecciones recurrentes, hipogammaglobulinemia, disminución de LB memoria y ausencia de expresión de *CD19*. Tres de ellos eran adultos, no relacionados, con una delección en el dominio intracelular de *CD19*. El cuarto caso, se trataba de un niño de Turquía, hijo de una pareja consanguínea, con una mutación diferente (inserción) en el gen *CD19* pero fenotipo clínico-inmunológicos similar (21).

Un año más tarde se describe otro caso en Japón con similares características, pero mutación heterocigota compuesta en *CD19*. (22) En el año 2011, uno de los pacientes descritos presentaba de forma particular una deficiencia selectiva de IgG1, conservación de la respuesta de anticuerpos contra antígenos proteicos y nefropatía por IgA (23).

De forma posterior fueron descritas mutaciones recesivas en otros genes implicados en el desarrollo del LB como es el caso de las moléculas de superficie *CD20*, *CD81* y *CD21*. Estos defectos moleculares comparten las características fenotípicas clínicas e inmunológicas descritas para la deficiencia de *CD19* (21, 24).

*TNFRSF13C*: codifica para la proteína **BAFF-R** (del inglés, "B-cell Activating Factor receptor") es miembro de la superfamilia de receptores de TNF, se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 y se expresa principalmente en células B y células dendríticas. La proteína BAFF también conocida como BlyS es ligando de BAFF-R, su interacción tiene implicancias en la supervivencia de los LB una vez que estos emergen de la médula ósea (25).

En el año 2009, Wartnaz y col. identifican una delección homocigota en el gen *TNFRSF13C* con ausencia de expresión de la proteína BAFF-R en dos hermanos adultos con deficiencia humoral. Estos pacientes presentaban de forma característica un freno madurativo en la etapa transicional, LB descendidos y mala respuesta de anticuerpos frente antígenos T-independientes. Sin embargo los autores concluyen, que estos defectos no siempre se corresponderían con una inmunodeficiencia clínicamente evidente como la IDCV (26, 27).

**TACI** (del inglés, "transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor"). Esta proteína es codificada por el gen *TNFRSF13B*, se expresa en los LB maduros y se une a sus ligandos BAFF y APRIL (del inglés, "a proliferation-inducing ligand").

Salzer U y col. en el año 2005, analizan 13 individuos con IDCV y describen homocigosidad para las variantes C104R, A181E y S144X de la proteína TACI; algunas de las cuales presentaban de forma adicional heterocigosidad (C104R, A181E, S194X y R202H). Castigli describe similares hallazgos en otra cohorte de pacientes y sus familias, sugiriendo una relación causal o correlación entre los defectos heterocigotos, la IDCV y la deficiencia de IgA (DSIgA) (28, 29).

Los autores sostienen que existe una proporción significativa de portadores heterocigotos sanos con mutación en *TNFRS13B*. Por tanto, estos defectos no se asociarían con alteraciones inmunológicas en todos los casos, podrían considerarse un factor de riesgo para desarrollar IDCV o DSIGa (30).

En los pacientes con mutaciones en el dominio extracelular (C104R) y transmembrana (A181E), las más frecuentes, la consecuencia funcional se expresa en un defecto de la unión a sus ligandos y la traducción de la señal; lo cual tiene implicancias en los procesos de regulación de la maduración, proliferación y supervivencia de los LB. Algunas de estas alteraciones funcionales se asocian con defectos en la inducción de la enzima AID (del inglés, "activation-induced cytidine deaminase") vía agonista de TACI. Almejún y col. describen una falla en el reclutamiento de molécula MyD88 asociado a alteraciones en el proceso CI T-independiente, en la IDCV con mutación en el dominio intracitoplasmático (S231R) de la proteína TACI (31).

Las mutaciones antes analizadas predisponen significativamente a complicaciones como autoinmunidad e hiperplasia linfocítica (30, 32).

### **Moléculas cuyo defecto compromete los mecanismos de regulación de la respuesta efectora y la tolerancia periférica:**

Los defectos moleculares más relevantes en los mecanismos de regulación de la respuesta efectora y la tolerancia periférica, son los relacionados con las moléculas CTLA4, LRBA y PIK3CD.

En el año 2012, se describen mutaciones homocigotas en el **gen LRBA** (del inglés, "lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein") en pacientes con IDCV que debutan en la infancia, con infecciones recurrentes o manifestaciones autoinmunes; y presentan como hallazgo característico granulomas en el sistema nervioso central (SNC) además de neumonía intersticial linfocítica (NIL). Estos pacientes presentan defectos en los procesos de diferenciación de los LB, con una menor activación, proliferación y supervivencia de los LB. López-Herrera y col. describen una mayor susceptibilidad a la apoptosis de las células B con mutación en LRBA y una alteración en los mecanismos de citoprotección por autofagia dentro de los lisosomas (33, 34). Los defectos en la respuesta proliferativa se asociaron a una reducción significativa en el número de plasmoblastos. Sin bien el porcentaje de LB en sangre periférica fue normal en la mayoría de los casos se observó que todos los pacientes presentaban disminución de la subpoblación de LB memoria a expensas de la subpoblación con *switch* isotópico (smBcells, según el *EUROclass*) menor al 2%. También se observó linfopenia T en 1 de 5 casos descritos (33).

**CTLA-4** (del inglés, "cytotoxic T lymphocyte antigen-4") se expresa en los T reguladores (Treg), participa en los mecanismos supresores durante los procesos de tolerancia periférica e inmunovigilancia. Modelos "in vivo" en ratones, sugieren que actuaría de forma extrínseca removiendo sus ligandos CD80 y CD86 de las APC (del inglés: "antigen presenting cells"). Estos ligandos son compartidos con la molécula CD28 presente en los linfocitos T; y su co-estimulación es requerida para la función efectora de los LT, la producción de citoquinas, la diferenciación a LT memoria y la CI (35).

En el año 2014, se describe el defecto molecular en el gen *CTLA-4*, en 6 familias analizadas con individuos que presentaban hipogammaglobulinemia y manifestaciones clínicas por disregulación. En esta serie, 19 casos presentaron algún tipo de variante en heterocigosis en el gen *CTLA-4*. Siete cumplían criterios diagnósticos para IDCV, 8 eran portadores sanos y otros presentaron DSIGa. Este tipo de defecto sugiere una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable (36). Las características clínicas más frecuentemente encontradas fueron: la enteropatía (78%), NIL con granulomas (66%), infecciones respiratorias recurrentes (57%), esplenomegalia (50%) e infiltración linfocitaria de múltiples parénquimas (50%) en intestino, médula

ósea, hígado, SNC, riñones o linfadenopatías crónicas. La hipogammaglobulinemia se presentó en el 76% de los casos afectados con la mutación.

El análisis en sangre periférica, en relación al fenotipo linfocitario se observa tanto en portadores sanos como pacientes, un aumento de los linfocitos T con perfil de activación y disminución de los LT *naive* (CD4CD45RA). En el caso particular de los afectados se observa, además, linfopenia absoluta y disminución progresiva de linfocitos B (36). Las mutaciones en los genes *CTLA-4* y *LRBA* han sido segregadas de la clasificación IDCV por la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología, de los que no tienen un defecto conocido. Se clasifican como entidades distintas sobre la base de la presentación clínica o de laboratorio no frecuentes en la IDCV, asociada a defectos genéticos bien definidos (4). Defectos en moléculas que participan en la señalización interna del BCR, han sido descritas en pacientes con fenotipo simil IDCV. Los defectos son referidos a moléculas de señalización intracelular del LB: PLC $\gamma$ 2; PI3K (p110 $\delta$ , p85 $\alpha$ ); NF- $\kappa$ 2; NF- $\kappa$ 1. Recientemente se han descrito variantes patogénicas en los factores de transcripción (FT) IKZF1 e IRF2BP2 implicados en la diferenciación, supervivencia y función del LB (11).

El incremento en la identificación de genes relacionados a la IDCV, identifican esta IDP como un diagnóstico “paraguas”, del cual surgen o se identifican diferentes entidades patológicas con superposición del fenotipo clínico-inmunológico

#### 1.4 Patogenia

Tanto la variabilidad genética encontrada en esta inmunodeficiencia, como la heterogeneidad en la presentación clínica y el fenotipo inmunológico de los pacientes con IDCV, sugieren que diferentes mecanismos o vías de señalización estarían implicados en el desarrollo de esta enfermedad (6).

Es así que, en las últimas décadas, numerosos investigadores han profundizado en la descripción de una variedad de alteraciones a nivel de la inmunidad innata y adaptativa. La mayoría de estos estudios fueron realizados en adultos, con lo cual es difícil extrapolar estos resultados a pacientes que debutan en la edad pediátrica. De hecho algunos autores consideran a esta forma de IDCV como una enfermedad diferente a la del adulto (37, 38).

A nivel de la inmunidad innata se han descrito anormalidades o disturbios en la activación, diferenciación y función de las células dendríticas derivadas de monocitos; como una menor expresión de moléculas de co-estimulación y liberación de la citoquina IL-12. Esto afecta de forma directa la proliferación de células T, la cooperación con el LB en CG, disminuyendo la secreción de anticuerpos frente antígenos T-dependientes (39, 40).

Fuera de CG las células dendríticas plasmocitoides inician el proceso de conmutación isotípica (CI) y la diferenciación de las células B, de forma independiente a los linfocitos T (LT). Esto lo logran a través de la vía de los TLRs (del inglés; “Toll like receptors”) y las citoquinas agonistas de BAFF-R y TACI. Estas dos vías están vinculadas y afectadas funcionalmente en la IDCV, y si bien no se han identificados defectos genéticos en la vía TLR para esta enfermedad; la expresión y respuesta de los receptores TLR7 y TLR9 está reducida frente al agonista CpG (41, 42).

Los autores concluyen que la interacción ineficiente entre la vía innata y adaptativa; explicaría en gran parte, la incapacidad de los pacientes con IDCV para erradicar patógenos y tolerar antígenos propios (37).

Dado que el mayor avance de los últimos años ha sido en la caracterización y correlación de los distintos fenotipos clínicos con las **alteraciones de las células B y T**; nos dedicaremos a profundizar este aspecto.

La mayoría de los pacientes con IDCV (80-90%) presentan un número normal de linfocitos B totales en periferia, a pesar de lo cual no producen cantidades apropiadas de anticuerpos *in vivo*, siendo la hipogammaglobulinemia el “sello” característico de la enfermedad (7,8).

Aquellos pacientes que presentan un recuento linfocitario B en sangre periférica igual o menor al 1 % se corresponden con la **clasificación B-** de IDCV ( $\leq 1\%$  de LB), según la clasificación del *EUROclass*. Este subgrupo se asocia con una progresión más rápida y severa de la enfermedad (43).

A nivel del compartimento de células B, diversas publicaciones señalan la presencia de un defecto en la diferenciación terminal a células memoria y plasmocitos (44, 45). Se observa una depleción de las células plasmáticas a nivel del tejido linfoide asociado al intestino, ganglios linfáticos y médula ósea, en pacientes con IDCV (9).

Los LB presentan un fenotipo inmaduro con defectos en la activación y proliferación asociado a una menor expresión de moléculas de co-estimulación como CD86 y alteraciones en los mecanismos de señalización del BCR que sugieren un defecto intrínseco de estas células. Presentan una menor supervivencia, una tendencia mayor a la apoptosis debido a una expresión reducida de la molécula CD38 y un aumento de la expresión de Fas (CD95). Esto justificaría en parte, su incapacidad para completar los procesos de maduración del LB (46).

El disturbio en la formación de células B memoria evidencia un defecto en la reacción en CG; lo cual se sustenta por la disminución de la tasa de hipermutación somática (HS) y la CI en la población de LB memoria de los pacientes con IDCV; observando una reducción de las smBcells en el 80-90% de los pacientes (43-45, 47, 48).

Sin embargo existiría otro grupo de pacientes con un número normal de smBcells, reacción normal a nivel del CG pero con defecto en la recirculación y/o la supervivencia de las células plasmáticas.. Taubenheim y col., demostraron en tres pacientes con IDCV un desarrollo intacto en los estadios de centroblasto y centrocito, incluyendo la expresión de los factores de transcripción (FT) “b cell lymphoma 6” (BCL-6) y “B lymphocyte-induced maturation protein 1” (Blimp-1). Los autores concluyen que el defecto sería posterior a la etapa de plasmablastos y células plasmáticas; y plantean como hipótesis a confirmar posibles defectos en los FT río abajo de Blimp-1 ((49).

El descenso en la población de LB con CI (CD19+CD27+ IgMIgD-) está presente en un porcentaje cercano al 80-90% de los casos; diferentes autores se basan en esta alteración para crear una clasificación que relaciona el perfil de LB de los pacientes con los diferentes fenotipos clínicos en la IDCV.

En el año **2002**, Warnatz y col.; proponen la **clasificación de Freiburg**, en la cual se distinguen tres grupos en base al porcentaje de LB memoria con CI (CD19+CD27+ IgD-) ; y la expansión de LB inmaduros (CD19+ CD21<sup>low</sup>) (44).

**El Grupo I** se corresponde con los pacientes que presentan disminución de smBcells, con valores  $< 0.4\%$  del total de linfocitos en sangre periférica (en inglés, PBL: peripheral blood lymphocytes). Dentro del grupo I se encuentran pacientes con expansión de los LB inmaduros CD19+CD21<sup>low</sup> (**Grupo Ia**,  $\geq 20\%$ ) y aquellos que no la presentan (**Grupo Ib**  $<20\%$ ).

**El Grupo II** comprende los pacientes con valores normales de smBcells ( $\geq 0.4\%$  del total de PBL).

En esta clasificación se asocia, por primera vez, la disminución de las smBcells (Grupo I) con un mayor riesgo de presentar complicaciones no infecciosas, dentro de las cuales se encuentran la esplenomegalia y las citopenias hemáticas (47).

Posteriormente, Piqueras y col. proponen un nuevo sistema de clasificación basado en el porcentaje de LB memoria totales vs smBcells. Establecen tres grupos: MB0, presentan reducción marcada de los LB memoria (< 11% de los LB), MB1 con valores normales, pero disminución selectiva de las smBcells con un punto de corte menor al 8% sobre el total de LB en sangre periférica; y MB2 no presenta alteraciones en el perfil B analizado. En este estudio encuentran una asociación significativa de esplenomegalia, proliferación linfoide y granulomas con perfil MB0. Mientras que la autoinmunidad fue encontrada en igual prevalencia en los tres grupos (45).

En el año 2008, el ensayo multicéntrico Europeo (en inglés, **EURO class trial**) analiza 303 pacientes con IDCV, con el objetivo de unificar ambas clasificaciones e incorporar la marcación de los LB transicionales (CD19+ CD38+ IgM<sup>high</sup>) junto con los LB memoria (CD19+CD27+) y los LB inmaduros (CD19+CD21<sup>low</sup>) (43, 50). Los pacientes con más del 1% de LB circulantes (B+) se corresponden con más del 90% de los pacientes y se distinguen de aquellos con valores de LB ≤ 1% (B-). El grupo B+ se divide, según el porcentaje de LB memoria con CI, en smBcells+ >2% y smBcells- ≤2% del total de LB en sangre periférica. Cada uno de estos subgrupos son luego subclasificados según la presencia o no, de una expansión ≥ al 10% de LB inmaduros o de LB transicionales ≥ 9%.

El EUROclass trial confirma la asociación clínica entre la reducción de las smBcells y la expansión de CD21<sup>low</sup> (LB inmaduros), con la presencia de granulomas y esplenomegalia; y revela por primera vez la expansión de células B transicionales en pacientes con linfadenopatías (43).

Con respecto a las alteraciones a nivel de las células T, durante los últimos 10 años, han sido descritas numerosas alteraciones a nivel de los linfocitos T, que ponen de manifiesto el rol de este compartimento en la patogenia de la enfermedad y subrayan la importancia de considerar este aspecto para clasificar la enfermedad (51). Es así que en un número significativo de pacientes se observa una disminución de los LT vírgenes (CD4+CD45RA+); causada por un posible defecto en el *output* tímico e incremento en la apoptosis celular (52, 53).

En el año 2007, Giovannetti y col. definen grupos clínicamente relevantes en base a esta reducción, el subgrupo I con una reducción severa de los LT vírgenes, disrupción del repertorio CD4 y CD8 además de un perfil de activación y proliferación masiva de los linfocitos T. Este fenotipo se correlacionó con un curso más severo de la enfermedad en relación a los pacientes sin estas alteraciones en el perfil de linfocitos T (54).

A diferencia de lo que ocurre con los linfocitos CD4+, los CD8+ se encuentran expandidos numéricamente; lo cual explicaría la inversión de la relación de LT CD4/CD8 frecuentemente observada en los pacientes con IDCV. Estas alteraciones a nivel de los CD8 han sido asociadas a infección crónica o recurrente por Citomegalovirus. Sin embargo, de forma particular su incremento podría ser considerado un elemento protector para el riesgo de presentar autoinmunidad según un estudio multicéntrico significativo (55).

La población de linfocitos T reguladores CD25+FoxP3+-CD4+; también se encuentra disminuida en un subgrupo de pacientes con IDCV e incremento de manifestaciones autoinmunes, esplenomegalia, granulomas y expansión de los LB CD21<sup>low</sup> (56-58).

Los pacientes con IDCV muestran características en el perfil funcional de los LT; como son la activación crónica y expansión de las células efectoras CCR7 (-), así como defectos en la señalización del TCR con disminución de respuesta proliferativa frente a mitógenos y antígenos proteicos. Sin

embargo, los autores observan, que no siempre estas alteraciones se traducían clínicamente; lo cual seguramente se base en el origen poligénico de esta enfermedad y en el grado de compromiso T que presente cada paciente ((53), (59).

Posteriormente, el grupo de estudio DEFI Francés delineó un subgrupo de IDCV con insuficiencia de células T clínicamente relevante y acuñó el término “Inicio tardío de inmunodeficiencia combinada” (en inglés, LOCID: Late Onset combined Immunodeficiency) para estos pacientes (60). Este grupo de pacientes se caracteriza por presentar un recuento de células T CD4+ inferiores a 200 células/ $\mu$ l y/o evidencia de infección oportunista; asocian frecuentemente antecedentes de consanguinidad y un fenotipo clínico más severo. Tienen una mayor prevalencia de manifestaciones inflamatorias como granulomas similares sarcoidosis, complicaciones gastrointestinales, esplenomegalia o linfoma en comparación a los pacientes con IDCV clásica. Así mismo los autores observaron en el subgrupo LOCID, un descenso significativo de las células B.

***Estas clasificaciones en base a los fenotipos B y T permiten identificar subgrupos de pacientes con diferente riesgo de presentar complicaciones (autoinmunidad, granulomas, linfoproliferación), proporcionan una base para comprender mejor los mecanismos patogénicos de la IDCV y plantear hipótesis sobre posibles blancos terapéuticos.***

## **1.5- Manifestaciones clínicas**

Los síntomas de la IDCV pueden aparecer en cualquier momento de la vida, pero existen dos picos de incidencia para el debut. El primero, en la infancia, entre los 5 y 10 años de edad, y el segundo en adultos jóvenes, entre los 20 y 30 años de vida. Según la última casuística, el 33.7% de los pacientes con IDCV se presenta en la edad pediátrica (61).

A pesar del esfuerzo para aumentar la sospecha de las IDP, existe un retraso diagnóstico de al menos 4 años entre el comienzo de los síntomas y el diagnóstico clínico de IDCV (62). Esto es debido, en parte, a la heterogeneidad clínica de este desorden. En muchos casos, no son las infecciones las manifestaciones iniciales que alertan el diagnóstico, sino las complicaciones no infecciosas, como la autoinmunidad u otras alteraciones por desregulación inmune.

La mayoría de las casuísticas reportadas son de población adulta, con una media de edad al diagnóstico de 35.3 años y un retraso diagnóstico de 6 a 7 años (7, 63).

Las manifestaciones clínicas de IDCV se pueden dividir en infecciones y complicaciones no infecciosas. En este grupo se incluyen manifestaciones autoinmunes, infiltración linfocitaria policlonal y malignidad. Diferentes autores describen que las infecciones recurrentes constituyen la principal manifestación de la IDCV; en el 32% representan la única manifestación clínica y en el 70% se presenta asociadas a una o más complicaciones no infecciosas (7, 64) .

### **1.5.1 Infecciones**

Las infecciones sinopulmonares bacterianas son las más frecuentes, afectando el tracto respiratorio superior en la mayoría de los casos (90-95%): otitis media, bronquitis recurrente o sinusitis crónica. Un 40-49% de los pacientes presentan al menos un episodio de neumonía previo al diagnóstico de IDCV (62, 63). Los principales agentes causales reportados son los mismos que en pacientes sin IDP: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Infecciones inusuales u oportunistas por *Pneumocystis jiroveci* y/o *Mycobacterium avium*, también han sido descriptas. Sin

embargo, la infección por estos microorganismos oportunistas deben alertar al clínico de posibles diagnósticos diferenciales con compromiso de las células T (60).

La recidiva de las infecciones pulmonares es responsable de secuelas como bronquiectasias, fibrosis pulmonar y/o deterioro funcional progresivo (62{Quinti, 2007 #81, 63). La enfermedad pulmonar crónica, es la principal complicación en la IDCV, está presente al diagnóstico en el 34.2% de los casos y afecta de forma significativa la sobrevivencia de estos pacientes. Esta afectación asciende al 46.4% en la evolución, a pesar de un correcto tratamiento, según la cohorte analizada por Quinti y col. (6, 63).

En la cohorte de pacientes adultos, analizada por Oksenhendler y col., se reportan infecciones bacterianas invasivas como sepsis además de meningitis en el 13 y 8% de los casos respectivamente. El principal agente causal de meningitis fue el *Streptococcus pneumoniae*, seguido de *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus Influenzae*. La sepsis por *Pseudomonas sp* de la comunidad es otro signo de alarma para la sospecha de deficiencias humorales como la IDCV (68).

El segundo sistema afectado en frecuencia es el gastrointestinal, luego del aparato respiratorio. Las infecciones son frecuentes y en algunos pacientes la diarrea crónica o recurrente constituye la principal manifestación de la enfermedad al diagnóstico. Los principales agentes aislados son *Giardia lamblia* y *Campylobacter sp*. Otros patógenos responsables son el *Citomegalovirus*, *Cryptococcus*, *Clostridium difficile*, *Salmonella sp* y/o *Yersinia*.

La IDCV no es especialmente susceptible a las infecciones virales, con excepción de posibles infecciones recurrentes por herpes virus tipo 1; y meningoencefalomielitis subaguda o crónica por la familia de enterovirus en especial Echovirus. (65). Otra particularidad la constituyen las infecciones articulares por *Mycoplasma sp* (66, 67).

### 1.5.2 Manifestaciones no infecciosas

**Autoinmunidad.** La asociación entre la IDCV y autoinmunidad (AI) es ampliamente conocida. En las principales series de Europa y Estados Unidos ocurre en el 20-30% de los pacientes y con una mayor prevalencia en el sexo femenino (7, 61, 63, 64). Algunas de las alteraciones inmunológicas subyacentes a la AI son defectos en la función de los LT reguladores, incremento en la producción de citoquinas inflamatorias, la apoptosis de las células T y de clones de LB auto-reactivos (68). Quinti y col describieron la AI como la primera manifestación clínica en un 17% de 224 pacientes. Las citopenias hemáticas fueron la condición más frecuente, en primer lugar, la trombocitopenia inmune (14%) seguida de la anemia hemolítica (7%). Estas pueden presentarse de forma aislada o formando parte de un Síndrome de Evans. La neutropenia inmune ocurre con menor frecuencia (menor al 1%) (63, 69).

Dentro de las manifestaciones órgano-específicas se encuentran la diabetes mellitus, alopecia, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, psoriasis, vitíligo, etc. La anemia perniciosa se observó en el 9% de los pacientes reportados por la serie europea (7, 62, 64).

Lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y vasculitis han sido descritas como manifestación de autoinmunidad sistémica en pacientes con IDCV.

**Manifestaciones gastrointestinales.** El 20-30% de los pacientes con IDCV presentan síntomas gastrointestinales sin una causa infecciosa que lo justifique; lo cual responde a una patología inflamatoria o autoinmune que afecta el tubo digestivo (70).

La enteropatía similar Enfermedad Celíaca (EC), se presenta en el 31% de los casos con diarrea, malabsorción, fallo nutricional y/o anemia. Histológicamente presentan alteraciones ya descritas para EC, pero con algunas particularidades como la ausencia o disminución marcada de plasmocitos en la lámina propia, infiltración de neutrófilos e hiperplasia nodular linfocitaria difusa. Algunos autores

sostienen que la ausencia de variantes en el haplotipo HLA-DQ2 y DQ8 permite diferenciar la EC de la enteropatía autoinmune (EAI) por disregulación. Esta última no presenta una buena respuesta a la exclusión de gluten y en muchos casos requieren de corticoides orales no absorbibles como el budesonide (71, 72).

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) simil Chron, colitis ulcerosa o proctitis; ha sido descrita en el 4% de los pacientes. Presenta algunas particularidades en la histología y una mayor dificultad para controlar la respuesta inflamatoria. Por lo que si bien el manejo de la EII asociada a IDCV suele ser el mismo que otros pacientes “inmunocompetentes”, en algunos casos puede presentar un curso más severo con refractariedad al tratamiento estándar (73).

Dentro de las manifestaciones gastrointestinales se incluyen las **enfermedades hepáticas**, afectando el 9% de los pacientes con IDCV, según el reporte de Resnick y col. en el 2015.

En primer lugar, en aquellos pacientes con aumento persistente de las enzimas hepáticas, se deben descartar infecciones por virus de hepatitis C, B, EBV y CMV. De todos modos la alteración más frecuente es la hiperplasia nodular regenerativa (HNR); seguido de complicaciones como cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa seronegativa y hepatitis autoinmune han sido descritas. En el caso de presentar estas complicaciones debemos valorar elementos de hipertensión portal por ecografía doppler color en todos los casos (74).

**Infiltración linfocitaria policlonal.** La hiperplasia linfoide a nivel cervical, mediastinal, abdominal y/o esplenomegalia es un hallazgo frecuente en los pacientes con IDCV, cercano al 20% (7, 75). En una cohorte Europea reciente, la esplenomegalia se observó en el 26% de los pacientes (61). Esta complicación suele ser de causa multifactorial y en la mayoría de los casos presenta un curso benigno. Sin embargo en un 8.2% el hiperesplenismo asociado a citopenias no controladas determinó la esplenectomía (64). Esta conducta ha disminuido en los últimos años, debido al diagnóstico oportuno de IDCV, el conocimiento de sus bases fisiopatológicas y la utilización de otras terapéuticas como inmunosupresores y/o biológicos para tratar complicaciones (76). Las anomalías histológicas descritas a nivel del bazo muestran hiperplasia folicular, ausencia de CG y/o infiltración por granulomas. A nivel ganglionar se superponen los hallazgos y se observa una arquitectura distorsionada con ausencia de células plasmáticas, CG mal definidos, hiperplasia linfoide atípica o granulomas. El análisis de estos tejidos, en caso de biopsia, requiere del citogenético, inmunotipificación por citometría y técnicas de biología molecular para descartar malignidad. La presencia de clonalidad no es sinónimo de linfoma, ya que suele asociarse a la hiperplasia linfocitaria de la IDCV. En caso de infiltración tisular por células B, se sugiere descartar infección por el virus *Epstein Barr* (8).

Esta infiltración puede presentarse en otros tejidos y asociar la presencia de granulomas no caseosos en la histología “simil sarcoidosis”. Se observa en un 8 a 22% de los pacientes; afecta principalmente el parénquima pulmonar, ganglios, piel, bazo, hígado, riñones y/o médula ósea (77, 78). Al igual que la autoinmunidad, esta complicación inflamatoria, puede preceder a la hipogammaglobulinemia o aparecer en la evolución.

En algunos pacientes, a nivel pulmonar, los granulomas se acompañan de una infiltración linfocitaria intensa, y recibe el nombre de “granulomatous lymphocytic interstitial lung disease” (GLILD). Se trata de una enfermedad pulmonar intersticial característica de los pacientes con IDCV, cuyo patrón histológico puede corresponder a una NIL, bronquitis/ bronquiolitis folicular o hiperplasia linfoide (10). Se considera una complicación sub-diagnosticada y esto se debe a que se presenta inicialmente de forma “indolente” o asintomática, pero con una declinación progresiva de la función pulmonar. Sin embargo, el deterioro funcional no siempre se traduce clínicamente; una vez que se expresa la

enfermedad, el síntoma principal es la disnea y rara vez tos, en caso de asociar alteraciones obstructivas de la vía aérea. Funcionalmente se caracteriza por un patrón restrictivo con disminución de los volúmenes pulmonares y disminución del test de difusión con monóxido de carbono. La presencia de una radiología de tórax normal no excluye el diagnóstico de GLILD. Sin embargo en la TAC de alta resolución se observan alteraciones compatibles como imágenes en vidrio deslustrado, nódulos dispersos, infiltración reticular, adenopatías hiliares y/o mediastinales (79).

Es importante señalar que ninguno de estos hallazgos por sí solos o combinados, sustituyen la certeza diagnóstica de la biopsia pulmonar. La cual además de caracterizar el tipo de compromiso intersticial, el fenotipo linfocitario (CD3, CD4, CD8, CD20), descarta linfomas e infecciones por gérmenes inespecíficos o específicos. La presencia de GLILD se asocia a un peor pronóstico, observando una disminución de la media de supervivencia de 13.7 vs 28.8 años en relación a los pacientes con IDCV que no presentan esta complicación pulmonar (80).

En relación a la patogénesis de esta complicación con granulomas no está clara la causa, si bien los expertos plantean una posible relación entre la infección por Herpes virus tipo 8, polimorfismos en genes de citoquinas inflamatorias con aumento de los niveles de TNF- $\alpha$ ; además del defecto o disminución de las células T reguladoras. Así mismo se ha descrito una mayor prevalencia de esta complicación en pacientes con disminución de la población smBcells y asociación con citopenias inmunes en el 54% de los casos (81).

**Malignidad.** Los pacientes con IDCV presentan mayor riesgo de contraer cáncer que la población general, observándose una prevalencia del 6-9% en las series reportadas (7, 8). Los linfomas son la forma más común de malignidad, seguido del cáncer gástrico; es así que un 35-50% de los tumores sólidos son linfomas del tipo no-Hodgkin (LNH), tipo B, extra nodal y negativos para el virus *Epstein Barr*. En relación a posibles topografías, se destaca el reporte de Quinti y col. con un 8% de pacientes con IDCV y LNH a nivel del intestino delgado (63).

Estos suelen ocurrir a edades más tardías, mayores de 40 años, con un mayor riesgo en pacientes con infiltración linfocitaria policlonal y valores de IgM en ascenso. En relación a este parámetro se observa una probabilidad del 31% de desarrollar linfomas por cada 1g/L de IgM en sangre periférica (7).

El segundo tumor más frecuente en la IDCV, es el cáncer gástrico, describiéndose un riesgo 10 veces mayor que la población general. Se trata de adenocarcinomas pobremente diferenciados y suele presentarse a edades más tempranas que la población general. Estos pacientes suelen presentar como antecedente gastritis crónica con atrofia severa además de una infección crónica por *Helicobacter pylori*. La autoinmunidad con déficit de vitamina B12 y anemia perniciosa puede ser otra peculiaridad fenotípica asociada (82).

En el año 2008, se diferencian 5 fenotipos clínicos de la IDCV en niños y adultos en la manifestación predominante: 1) Infecciones como única manifestación, 2) autoinmunidad (AI) con citopenias o de tipo órgano específica, 3) linfoproliferación policlonal que incluye NIL, linfadenopatías, persistentes, esplenomegalia, granulomas, 4) enteropatía, y 5) malignidad. A pesar de ello, existe superposición de manifestaciones en todos los subgrupos identificados, ya que algunos pacientes pueden presentar más de un tipo de complicación no infecciosa (7).

La diferente prevalencia de complicaciones no infecciosas, entre las cohortes publicadas, traduce diferencias del *background* genético. Sin embargo, todas coinciden en una reducción franca de la curva de supervivencia de al menos 15 años. En la cohorte de 334 casos, descrita por Chapel H y col. se observaron complicaciones en el 74% y una mayor mortalidad en los fenotipos con enteropatía, infiltración linfocitaria policlonal o malignidad.

## 1.6 Tratamiento

Los pilares del tratamiento consisten en la terapia sustitutiva con gammaglobulina; la profilaxis y tratamiento de las infecciones con antimicrobianos, además de tratar las complicaciones no infecciosas en aquellos pacientes que si las presenten y luego de caracterizarlas correctamente.

### 1.6.1 *Prevención de las infecciones*

#### **Suplementación con gamaglobulina humana normal**

La administración se puede realizar por vía intravenosa o subcutánea a una dosis estándar de 400 a 600mg/kg por mes. Inicialmente puede comenzarse con dosis más altas y requerir hasta 1.2g/kg de mantenimiento para alcanzar un buen resultado clínico para cada paciente. El espectro de dosis varía para cada paciente y depende del nivel basal de IgG al diagnóstico, la vida media de la inmunoglobulina en sangre, la presencia de complicaciones como la EPC o enteropatía; además de posibles polimorfismos en el receptor Fc que podrían incrementar el *turnover* del fármaco (83, 84)

Habitualmente se alcanzan niveles estables, en sangre, luego de 6 meses de iniciado el tratamiento; estableciendo como valores deseables de 500 a 600mg/dL. El nivel óptimo o “deseable” no es universal y se ajusta a cada paciente en base a los resultados clínicos. Se sugiere una monitorización bianual de la IgG residual, entendida como aquel valor obtenido al día + 28 post-gammaglobulina (85, 86).

El objetivo del tratamiento es prevenir las infecciones, y la mayoría de los trabajos son satisfactorios en este sentido, observando una disminución franca en el número de infecciones agudas severas, el uso de antibióticos y los días de hospitalización. En el año 2002 Busse y col., describen una disminución significativa en la incidencia de neumonías del 84% al 22%, en pacientes IDCV tratados con gammaglobulina. Sin embargo esto no aplica para otro tipo de infecciones como la sinusitis o gastrointestinales; las cuales suelen evolucionar a la cronicidad (87, 88).

Ambas vías de administración, intravenosa y subcutánea, proveen niveles suficientes en sangre. La principal ventaja de la administración subcutánea son menor riesgo de efectos adversos, niveles más estables en sangre, preservación del capital venoso, fácil preparación y una vez entrenado el paciente o el tutor se realiza en domicilio con mayor confort y no afecta las actividades cotidianas como la escuela o el trabajo. Las limitaciones son el costo y el volumen de infusión limitado en el sitio de punción, no pudiendo exceder los 20cc por vez (83, 89).

Algunos autores recomiendan dosis más altas en pacientes con BQT, con el objetivo de detener o enlentecer la evolución de esta complicación a pesar de lo cual no se ha logrado demostrar resultados clínicos satisfactorios. Si es claro que estos pacientes requieren mayores dosis de gammaglobulina para lograr evitar las infecciones en un pulmón con daño estructural (8, 90, 91).

#### **Profilaxis antimicrobiana**

La segunda línea de prevención son los antibióticos, en especial en pacientes con BQT e infecciones recurrentes (más de tres por año) o severas que motiven internación. Los estudios de microbiología previa como esputos seriados y la sensibilidad de organismos cultivados; determinan la elección del antibiótico. Dentro de los cuales se prefiere utilizar una monoterapia diaria con azitromicina por el efecto antiinflamatorio. Otras recomendaciones sugieren flexibilidad con terapias rotatorias o combinadas de

antibióticos que incluyen, además de macrólidos, otras drogas como amoxicilina, TMP-SMX y cirpofloxacina para aquellos pacientes con antecedentes de *Pseudomona aeruginosa* en los aislamientos.

La evidencia disponible para pacientes con BQT muestra un pequeño beneficio para el uso de antibióticos profilácticos por tiempo prolongado, y se requiere de otros cuidados como la fisioterapia respiratoria sistemática, control de otros factores agravantes como la desnutrición, trastornos deglutorios o patología de la vía área superior como la sinusitis y los pólipos nasales (92).

En relación al seguimiento y la prevención de las infecciones es importante la educación de los pacientes y sus familias para la detección temprana y prevención.

El monitoreo de infecciones virales transmisibles, es recomendado por los autores, a pesar de la legislación referida a la seguridad de la gammaglobulina desde el año 2000, con detección del virus de hepatitis C mediante PCR y el antígeno de superficie para el virus de hepatitis B (8).

### **1.6.2 Inmunizaciones**

La eficacia de las vacunas no ha sido extensamente estudiada en estos pacientes; por lo que se debe valorar los siguientes aspectos al momento de indicarlas: riesgo, eficacia esperada, necesidades individuales y epidemiología local. A excepción del virus Influenza circulante, la gammaglobulina policlonal contiene altos niveles protectores de anticuerpos contra los agentes prevalentes en la infancia. En este sentido, los expertos no recomiendan un *booster* contra tétanos o difteria ni vacunación frente a gérmenes vivos (93).

Debido a que la inmunidad celular no está comprometida en la mayoría de los casos con IDCV y las vacunas inactivas no ponen en riesgo al paciente; los expertos recomiendan la vacunación contra el virus influenza en mayores de 6 meses y convivientes (94). En este mismo sentido, el MSP, recomienda la inmunización con vacunas conjugadas VCN13 y anti-Hib (contenida en la pentavalente), dado el riesgo de enfermedad bacteriana invasiva en este tipo de huésped. Además de la vacuna anti-meningocócica según la epidemiología local y regional.

En relación a la utilización de la vacuna polisacárida VN23 podría ser efectiva en pacientes con valores normales de linfocitos B memoria con switch y buena respuesta funcional frente a polisacáridos (títulos de isohemaglutininas normales). Indicándola en mayores de dos años con un intervalo no menor a 8 semanas luego de la VCN13 (95).

### **1.6.3 Tratamiento de las complicaciones**

En relación a las citopenias inmunes, los corticoides orales a dosis de 1-2mg/kg/peso son la primera opción y suficientes en la mayoría de los casos. Si a pesar de estos, la autoinmunidad persiste, se puede utilizar de manera complementaria dosis elevadas de inmunoglobulina (1gr/kg) semanal por períodos cortos. En aquellos casos con refractariedad o recurrencia de las citopenias se puede optar por la utilización del anticuerpo anti-CD20.

La esplenectomía debe evitarse, dentro de lo posible, en estos pacientes por el incremento en el riesgo de infecciones; aunque recientemente se ha visto que no existe un aumento de la mortalidad de instaurarse una correcta terapia de sustitución con gammaglobulina además de la profilaxis antibiótica (64, 96).

El protocolo de tratamiento para otras complicaciones como la autoinmunidad órgano-específicas y los linfomas suele ser el mismo que el utilizado en pacientes sin IDP asociada.

En relación a las complicaciones inflamatorias con infiltración linfocitaria policlonal, no se recomienda el tratamiento sino la monitorización por el riesgo de malignidad asociado. .

La mayoría de los expertos están de acuerdo en tratar solo aquellos pacientes sintomáticos o con deterioro de la función del órgano comprometido.

El tratamiento de los granulomas es empírico y no existen tratamientos protocolizados; los corticoides orales a bajas dosis constituyen la primera opción pero con una respuesta insatisfactoria. Por lo que en muchas ocasiones se utilizan otras drogas espaciadoras, como la hidroxicloroquina, ciclosporina, azatioprina, micofenolato mofetil, además de biológicos como el anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 o el anti-TNF; las cuales se utilizan según la gravedad del caso y el tipo de complicaciones asociadas. La opción de terapias combinadas, incrementa el riesgo de infecciones, por lo cual requiere de un mayor control y seguimiento por parte del clínico (78, 86).

En lo que refiere al tratamiento de la GLILD, el último consenso internacional, se sugiere tratar a todos aquellos pacientes se presentan sintomáticos o asintomáticos con deterioro de la función pulmonar (79). Previo al inicio de la terapia para GLILD, es necesario optimizar el tratamiento con gammaglobulina, pero no hay acuerdo que se requiera de altas dosis. La droga de elección son los corticoides orales, iniciando el tratamiento con una dosis mínima de prednisona a 10-20mg/día, promedio de 40mg para 70kg y un máximo de 2mg/kg/día. Como terapia de segunda línea de forma combinado o no a los corticoides, se sugiere en este orden según la evidencia, las siguientes drogas: azatioprina, anticuerpo monoclonal anti-CD20 o micofenolato mofetil (79).

La enfermedad gastrointestinal requiere en una primera instancia descartar y tratar posibles causas infecciosas asociadas aunque, como ya fue mencionado, no siempre es posible erradicar microorganismos del tubo digestivo de este tipo de huésped. En el caso de enteropatía con deficiencias específicas nutricionales, es necesario suplementar con nutrientes esenciales como calcio, zinc, vitaminas liposolubles, etc. Para los pacientes con un fenotipo símil EC se recomienda la utilización del ácido-5aminosalicílico (5-ASA) asociado o no a corticoides no absorbibles como el budesonide a bajas dosis (73, 86).

En la EII severa se utilizan de forma escalonada, inmunomoduladores como la azatioprina y 6-mercaptopurina a bajas dosis; seguido de biológicos como el anti-TNF en la enfermedad refractaria (97).

El trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) en la IDCV no constituye una indicación de rutina, y solo en algunos casos con alta morbilidad asociada a complicaciones podría considerarse como la única opción terapéutica curativa. Sin embargo los reportes muestran una alta mortalidad vinculada al TPH (52%) y una alta incidencia de enfermedad de injerto contra huésped (EICH). El mayor desafío para el clínico consiste en la selección de pacientes, y la oportunidad para realizarlo; ya que si bien el objetivo es curar las complicaciones y la hipogammaglobulinemia, muchas veces las condiciones y/o el daño de órganos blanco previo impacta negativamente en el resultado del procedimiento (98).

## 1.7 Pronóstico.

En el año 1999, Cunningham-Rundles y col. describen para los pacientes con IDCV, una sobrevida a los 20 años del diagnóstico, de 64% en hombres y 67% en mujeres, respecto a la sobrevida estimada del 92 y 94% respectivamente, en la población general. Esto se correspondía con una mortalidad del 23 al 27%, con una media de seguimiento de 7 años (62).

A partir del año 2000, luego del uso estandarizado de gammaglobulina supletoria, se logró un impacto favorable en la sobrevida de los pacientes con IDCV en relación a lo referido anteriormente por los autores. Es así que en el año 2008, la serie publicada por *ESID*, estima una mortalidad del 15% con una media de seguimiento de 22.5 años. En esta publicación, refieren un riesgo incrementado en la mortalidad para aquellos pacientes con un fenotipo clínico con complicaciones no infecciosas, mayormente incrementada en pacientes con infiltración linfocitaria policlonal, enteropatía o linfomas (7).

Posteriormente en consonancia con esto, Resnick y col. reportan un incremento en el riesgo de muerte de 11 veces para aquellos casos con IDCV, que presentaron una o más complicaciones no infecciosas. En un total de 411 casos observan el 42% de sobrevida si presentaron complicaciones no infecciosas vs 95% en aquellos pacientes que no las tuvieron 40 años luego del diagnóstico. Las complicaciones no infecciosas que asociaron, en esta serie, una reducción significativa de la sobrevida fueron la enfermedad gastrointestinal (enteropatía, enfermedad inflamatoria intestinal), enfermedades hepáticas, los linfomas, enfermedad pulmonar crónica (excluyen las BQT solas) y la malabsorción intestinal (64).

La mortalidad global fue del 19.6%, con una reducción significativa en la curva de sobrevida, en relación a lo esperado para la población de EEUU, según sexo y edad. La principal causa de muerte fue la falla respiratoria en pacientes con enfermedad pulmonar crónica, seguido de los linfomas y los tumores sólidos.

Los datos estadísticos descritos se corresponden con la población adulta, dada la mayor prevalencia de la enfermedad en la segunda y tercer década de la vida. Por lo que no es posible extrapolar los resultados a la edad pediátrica.

En relación a la edad y el pronóstico, la última publicación refiere una mayor mortalidad con edades más tardías al debut y el diagnóstico. Encontrando un mayor retraso para el diagnóstico en pacientes que debutaron en la edad pediátrica, antes de los 10 años de vida.

En relación a los biomarcadores y el pronóstico, como se describió anteriormente niveles elevados de IgM así como la disminución de la población smBcells y los LT reguladores se correlacionan con la presencia de complicaciones no infecciosas que afectan negativamente el pronóstico de estos pacientes (7) (43, 51).

La presencia de linfopenia T o B debe alertar al clínico por posibles diagnósticos diferenciales con otras IDP bien caracterizadas. Su identificación temprana tiene implicancias en el pronóstico así como en el tipo de tratamiento que puede ofrecerse. Este último aspecto implica una correcta y temprana pesquisa de la familia, para evitar daño y realizar asesoramiento genético (11, 99).

## 2.0- DESARROLLO DEL LINFOCITO B

### 2.1 Maduración temprana o central

El desarrollo de los linfocitos B (LB) se origina en médula ósea (MO), a partir del precursor común, denominado *stem cell* o célula madre pluripotente (CMPH). Esta etapa de maduración temprana o central es independiente del linfocito T así como del encuentro con el antígeno (100).

Durante el proceso de maduración, la célula B desarrolla un programa de activación y modificación génica, expresando proteínas intracelulares o de superficie que la conminan a la producción de anticuerpos (Acs) o inmunoglobulinas (Igs) con una alta especificidad y afinidad por el antígeno.

El primer evento o modificación génica se conoce con el nombre de **Recombinación Génica o somática**, y tiene por objetivo construir el primer repertorio pre-inmune de receptores antigénicos del linfocito B (en inglés, “B cell receptor”: BCR). Este proceso es responsable de generar diversidad en el “reconocimiento antigénico” y consiste en la combinación al azar de los diferentes segmentos génicos de las inmunoglobulinas.

En línea germinal, cada locus de inmunoglobulinas, está constituido por múltiples copias de al menos tres segmentos génicos codificantes para la región variable de las inmunoglobulinas: V (variable), D (diversidad) y J (de unión=joining); además del segmento “C” para la región constante. Estos segmentos se reordenan de la siguiente manera: en primer lugar los segmentos V-D-J de las cadenas pesadas y en segundo lugar se realiza el re-arreglo V-J de las cadenas livianas. La mayor contribución a la diversidad de receptores antigénicos depende de la eliminación o adición de nucleótidos entre los distintos segmentos en el momento del empalme; estos procesos son responsables de la gran diversidad de las uniones VDJ y son mediados por las enzimas endonucleasa y deoxirribonucleotidil transferasa termina (Tdt) respectivamente (101).

El proceso de recombinación somática se inicia mediante el corte doble hebra en la molécula de ADN, iniciado por la activación de las enzimas de recombinación génica: RAG1 y RAG2. La expresión de estas proteínas es regulada por los factores de transcripción (FT) E2A (del inglés, “E-box transcription factor”) y PAX-5 (del inglés, “paired box family 5”) en los órganos linfoides primarios (médula ósea e hígado fetal) (102).

Las roturas doble hebra (en inglés, DSBs) son reparados por un mecanismo de unión de extremos de ADN con poca o ninguna homología entre sí, mecanismo conocido como NHEJ (del inglés: “non homologous end joining”). El cual es llevado a cabo por un complejo enzimático, dentro de las cuales se encuentran las proteínas Atm, Ku70, Ku80, Ligasa IV, Artemis, Cernunos, etc. Alteraciones en su expresión o función son causa de IDP asociadas a fragilidad cromosómica, radiosensibilidad y fenotipo combinado (defecto T y B) (4).

Durante el estadio pro-B se produce el re-arreglo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas ( $\mu$ ) y comienza el ensamblaje del BCR y sus moléculas de señalización. El re-arreglo completo de la cadena pesada y la vinculación con la cadena liviana sustituta en membrana (pre-BCR) marcan el estadio pre-B.

El reemplazo de la cadena liviana sustituta por la cadena liviana kappa o lambda, es el paso limitante para la expresión del primer repertorio de linfocitos B con IgM de membrana. Dicha molécula se

expresará junto con el heterodímero  $Ig\alpha-Ig\beta$  constituyendo el BCR de clase IgM característico del estadio B inmaduro.

Defectos en la etapa de transición pro-pre B son causa de IDP caracterizadas por ausencia o disminución severa de LB en periferia como causa de la hipogammaglobulinemia (agammaglobulinemia). Dentro de los principales defectos descritos se encuentran alteraciones en la función o expresión de la cadena  $\mu$  e  $Ig\alpha$  (componentes del BCR) y la molécula de señalización Btk (del inglés: Bruton's tyrosine kinase); los cuales justifican el 90% de los defectos tempranos en la ontogenia B, en las IDP tipo III (103).

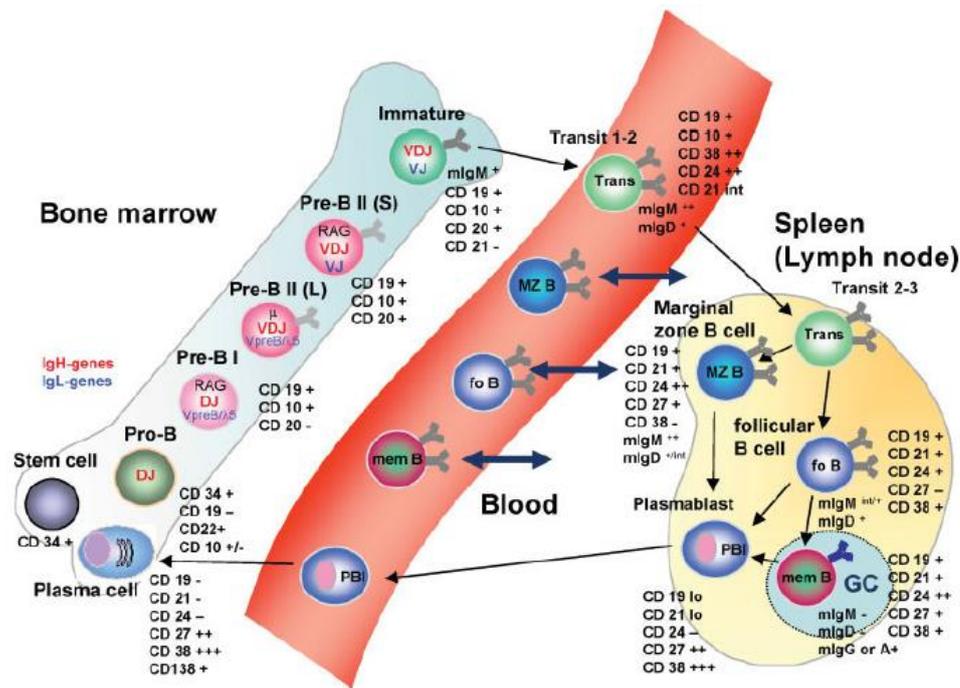
En el año 2013 se identifica el primer defecto genético en el FT E2A como causa de agammaglobulinemia y ausencia de expresión del BCR en membrana (104).

El receptor del LB es evaluado en cuanto a su funcionalidad y correcto ensamblaje, en diferentes etapas o "puntos de control" de la maduración B: estadios pre-BCR y BCR. Siendo responsable de transmitir señales, a los linfocitos en desarrollo, necesarias para su supervivencia, proliferación y maduración.

Es en esta instancia que se desarrollan los mecanismos de tolerancia central en MO; selección positiva y negativa; evaluando la reactividad del BCR frente a los antígenos propios. De manera que aquellos LB auto-reactivos son eliminados por apoptosis o rescatados por re-edición del BCR, lo cual es regulado por el FT E2A.

Una vez finalizada esta etapa, los LB que presenten un correcto ensamblaje y funcionalidad de las cadenas de Igs en superficie, proliferan y comienzan el tránsito desde MO a los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas), para completar su maduración. Son entonces caracterizados como LB en tránsito o transicionales y se caracterizan por una expresión intensa del marcador de superficie CD21 (50).

En la figura 1 se resumen los marcadores de superficie de los distintos estadios de maduración de la célula B.



**Figura 1. Estadios del desarrollo de la célula B.** CD, cluster of differentiation; fo B cell, follicular B cell; GC, germinal center; mem B, memory B cells; MZ B cell, marginal zone B cell; Pbl, plasmablast; Trans or Transit, transitional B cell. Tomado de *Flowcytometric Phenotyping of Common Variable Immunodeficiency* (50)

## 2.2 Desarrollo del linfocito B en periferia

En esta etapa, los LB atraviesan los estadios de diferenciación tardía en los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas o MALT). Estos sitios presentan una especial organización de su estructura, representada por la zona **marginal** o de células T y la **zona folicular** o de células B. Se caracterizan por presentar un alto flujo de antígenos circulantes y células presentadoras.

Los LB transicionales tienen un tiempo limitado para encontrar el antígeno en los folículos primarios para poder completar su maduración; por lo que hasta que este encuentro no se presente debe sobrevivir. Esto sucede gracias al microambiente especial dentro de los folículos, donde además de las señales de supervivencia recibidas a través del BCR; las células dendríticas foliculares liberan otras señales de activación y supervivencia, como la citoquina BAFF (del inglés, "b-cell activating factor receptor"). El receptor de esta molécula BAFF-R se expresa por primera vez en los LB transicionales T2; y como fue mencionado anteriormente los defectos en esta interacción celular se traducen en un bloqueo del estadio transicional B asociado a deficiencia en la síntesis de anticuerpos rasgo característico de la IDCV (26, 105).

Una vez que el LB encuentra su antígeno específico, y se une al mismo vía BCR tienen lugar dos eventos. El primero es la activación del LB a partir de la señal recibida por el BCR y el segundo es la internalización del complejo antígeno-BCR, procesamiento y luego presentación en superficie, de fragmentos peptídicos, asociados a moléculas MHCII. Ambos eventos son importantes ya que los antígenos proteicos, no así los polisacáridos, requieren de una segunda señal de los LT colaboradoras

para una correcta activación de los LB (respuesta T-dependiente). Esto ocurre a través de la interacción celular entre las proteínas CD40L, expresada en LT foliculares (en inglés: T<sub>FH</sub>, «T-follicular helper») activados; y el receptor CD40, expresado constitutivamente en la superficie de las células B. Es así que sobreviven y proliferan aquellas clonas de LB con mayor afinidad por el antígeno; y se eliminan las que presentan auto-reactividad.

Esta íntima interacción de las célula T y B, ocurre en la periferia de la zona marginal y folicular de los órganos linfoides secundarios.

En la zona folicular se presenta la reacción de centro germinal (CG), donde la célula B completa su maduración fenotípica T-dependiente (TD), madurando la afinidad antigénica y diferenciándose a células B memoria y/o plasmocitos.

Los CG constituyen un microambiente especial, donde ocurre una intensa proliferación de LB re-circulantes, y se desarrollan los eventos moleculares de hipermutación somática (HS), selección de células B mutadas y la conmutación isotópica (CI) (106).

En la **zona oscura** del CG se presenta una intensa proliferación de LB con baja expresión de BCR (centroblastos) y se produce el proceso de HS. Estas células pueden diferenciarse a plasmoblastos, LB memoria, o migrar hacia la **zona clara**, donde se seleccionan las células B mutadas y se completa el proceso de CI. Evidencia reciente, define al CG como un sitio dinámico, con un flujo bidireccional de células entre la zona clara y oscura, lo cual permite la selección de aquellos LB con una mayor especificidad antigénica.

La reacción de CG es regulada por distintos factores de transcripción, en sus distintas etapas. En relación al inicio de la intensa respuesta proliferativa de las células B del folículo primario; varios autores subrayan el rol del FT BCL-6 como esencial para conminar al LB al folículo linfoide e iniciar la reacción de CG. De manera que la expresión de BCL-6 aumenta rápidamente, luego de ser activado por el Ag y a través de la interacción con las células T; lo cual sugiere una expresión basal del FT y una posible regulación post-transcripcional. Este factor inhibe las respuestas apoptóticas y de “arresto” del ciclo celular, otorgando así tiempo a la célula B para completar los eventos moleculares asociados a la respuesta inmune del CG (107).

Dentro de los factores que regulan la expresión de BCL-6; la proteína IRF-4 (del inglés; “Interferon-regulatory factor 4”) induce su expresión, una vez que el LB es activado por el antígeno. Esta regulación es crucial en las etapas tempranas de la reacción, previo al momento de entrada al folículo, permitiendo la expansión clonal de LB en la zona marginal, previa entrada al folículo.

Ambos FT permiten la diferenciación de las células T extra-foliculares a L<sub>TH</sub>, responsables de la reacción de CG en estrecha interacción con la célula B en la zona folicular.

Los LB memoria de zona marginal del bazo expresan CD27+ en membrana (Figura 1) y representan el 15 a 20% de los linfocitos B circulantes. En el año 2004 Weller y col, describen un rol protagónico de estas células en la respuesta temprana de anticuerpos frente a antígenos T- independientes (108). Estas células tienen un repertorio de BCRs pre-inmune, mutado y específico para polisacáridos del tipo *Streptococcus pneumoniae* (en inglés: anti-PnPS); los cuales son responsables de la respuesta inmune específica en niños menores de 2 años (109).

En los pacientes con IDCV, la disminución de esta población de LB memoria de zona marginal, se asocia a bajos títulos de anticuerpos IgM anti-PnPS en sangre y mayor riesgo de presentar neumonías bacterianas recurrentes (110).

Los LB maduros foliculares representan la principal población en sangre y órganos linfoides secundarios. La mayoría de sus BCRs reconocen proteínas, participan en la respuesta T-dependiente

de alta especificidad, y son responsables de la formación del centro germinal (CG) en estrecha interacción con los linfocitos  $T_{FH}$  y las células dendríticas (111).

No todas estas células B, activadas por el antígeno, finalmente se introducen en la reacción de GC de los folículos linfoides; ya que un subconjunto de LB proliferantes (centroblastos) luego de su interacción con LT, se mueve a las áreas especializadas en los ganglios linfáticos, conocido como los cordones medulares, donde se diferencian a plasmablastos de vida corta que secretan anticuerpos que tienen una baja afinidad por el patógeno invasor.

Las células B que entran en la vía CG son las que realizan el proceso de HS y por tanto presentan la mayor afinidad por el antígeno.

La **HS** y el **CI** son eventos moleculares que ocurren de manera exclusiva en las células B, una vez que se presenta la activación del BCR por el antígeno. Requieren la cooperación del  $LT_{FH}$  a través de la interacción con CD40L e ICOS; y la liberación de las interleucinas IL-10, IL-4 y IL-21. Estas señales se traducen, "corriente abajo", a través la activación de diferentes enzimas y factores de transcripción implicados en esta del desarrollo del LB, que se detallan a continuación en la sección 3.0 (112).

La HS es responsable de aumentar la afinidad por el Ag mejorando así su reconocimiento (maduración de la afinidad) y la CI es responsable de cambiar la región efectora de las Igs para proceder de esta manera al correcto procesamiento antigénico. Al presente es bien conocido que ambos eventos son originados por la presencia de mutaciones en el ADN causadas por una enzima llamada histidina deaminasa inducida por la activación (AID por "Activation-induced cytidine deaminase") (113).

Durante el proceso de CI se produce el cambio de la región constante de las Igs, sustituyendo  $C_{\mu}$  por  $C_{\gamma}$ ,  $C_{\alpha}$  o  $C_{\epsilon}$ , mediante la generación de roturas en sitios específicos del ADN, que preceden estos exones C, llamadas regiones de cambio (en inglés; "switch regions"). Este proceso es iniciado por acción de la enzima AID, la cual es responsable de editar y modificar el ADN de hebra simple al desaminar la citosina de las regiones S y generar un residuo uracilo (U). El cual es luego glicosilado y escindido por acción de la enzima Uracil-ADN glicosilasa (en inglés, UNG:Uracil-N-glycosylase). Es así que se genera un sitio abásico en el ADN blanco, que es reconocido por enzimas endonucleasas y se produce una rotura de simple hebra. Posteriormente se produce la rotura doble hebra de ADN (en inglés: DSB, "double-strand break") en las regiones de switch, lo cual es un paso limitante y necesario para la CI.

El segmento génico entre las dos regiones S que preceden a las regiones C a cambiar, se elimina con la formación de círculos de escisión. La presencia de los mismos indica que el proceso de CI se presentó efectivamente; o de lo contrario estos círculos están ausentes.

En esta instancia se mantiene el re-arreglo somático del BCR, cambiando solo la región efectora (constante), por lo cual se producen diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, e IgE) pero con la misma región variable (V) y por tanto la misma especificidad antigénica (114).

Las diferentes inmunoglobulinas varían en términos de sus propiedades: la vida media, afinidad por los receptores Fc, la capacidad para activar el sistema de complemento y su ubicación dentro de los tejidos. Ejemplo de esto es la IgA, secretada en las membranas mucosas del aparato respiratorio y digestivo.

La HS y la CI ocurren simultáneamente en centro germinal, pero ninguno es prerrequisito para el otro; es así como la IgM puede estar mutada mientras la IgA e IgG persisten no mutadas.

La CI no es un proceso exclusivo del centro germinal; ya que existen LB1 extrafolículos, capaces de generar una respuesta T-independiente, que no es gatillada por CD40L sino por ligandos de la inmunidad innata. Se trata de LB de la zona marginal del bazo y la lámina propia de la mucosa intestinal; los cuales responden a liberación de APRIL y BAFF por las células dendríticas. Este grupo de LB, presenta además receptores del tipo “Toll-like receptors” (TLR); la doble activación de los TLR y el BCR por patrones asociados a patógenos altamente conservados como LPS (TLR-2/4) y CpG (TLR-9) es responsable del proceso de CI; con la generación de una respuesta rápida de anticuerpos de baja afinidad. A la espera de respuestas más lentas, en los LB de CG pero con una mayor especificidad y afinidad por el antígeno (115).

La HS modifica la afinidad por el antígeno, mediante la introducción de mutaciones sin sentido y ocasionalmente deleciones o inserciones, en la región variable V de las Igs. Estas mutaciones al azar ocurren con una frecuencia elevada de  $10^3$  pares de base por ciclo celular y suelen estar dirigidas contra secuencias conocidas como “hot spot”.

Al igual que en el CI, el proceso de HS requiere de la escisión del ADN, produciendo así roturas de simple y DSB por acción de las enzimas AID, UNG y el complejo de enzimas MMR (del inglés, “mismatch repair machinery”). La enzima PMS2, pertenece a este grupo y es responsable de convertir las roturas simples del ADN inducidas por AID/UNG en DSB.

La reparación del ADN se produce por la acción de polimerasas promotoras de errores, propias del CG, que van generando una alta tasa de mutaciones en cada ciclo celular. El principal mecanismo de reparación de DSB en los procesos de CI e HS, utilizado en mamíferos, es “NHEJ” (del inglés; *non-homologous end joining*). Definido como la re-unión de las cadenas rotas de DNA sin una extensa homología entre ellas (116). Esta modificación genética es seguida de la **selección positiva** y proliferación de los LB cuyo receptor tenga una alta afinidad por el antígeno. Dicha selección se realiza mediante el estrecho contacto del LB con las células dendríticas foliculares cargadas con el antígeno y los LT<sub>FH</sub> en CG.

Defectos en la expresión de proteínas implicadas en los procesos de cooperación T-B (CD40, CD40L, ICOS); transcripción y escisión de secuencias de ADN diana (AID), y su reparación (UNG, PMS2, ATM, NBS1); son responsables de IDP con defectos en el CI y la HS. (117)

En la IDCV ambos eventos de maduración, la CI y la HS, están afectados en grado variable y dichas alteraciones se correlacionan con las manifestaciones clínicas que puedan presentar estos pacientes, como ya fue mencionado en el capítulo 1.

## ***Diferenciación a células B memoria y plasmocitos***

Luego de esta fase de proliferación y selección clonal; los LB de CG se diferencian en células memoria o plasmocitos. El éxito en esta etapa de la maduración tardía depende de la correcta interacción del LB con las células T; a través de CD40L, moléculas coestimuladoras (CD86, ICOS), citoquinas de señalización y la activación de los factores de transcripción del LB implicados en esta etapa del desarrollo.

Las células B memoria (CD19+ CD27+) representan entre el 16 a 55% de los LB circulantes y provienen de la reacción en CG y de la zona marginal del bazo (50).

Los LB memoria de CG que sufrieron el proceso de HS y la CI, sobreviven durante muchos años en una fase de ciclo celular lento; y son capaces de expresar los distintos subtipos de inmunoglobulinas en su membrana y secretarlas ante una nueva exposición al antígeno. Esta respuesta de anticuerpos, secundaria, tiene la característica de ser rápida e intensa con una alta afinidad y especificidad por el antígeno.

IDP causadas por alteraciones en la expresión de CD40L o ICOS en LT activados, son responsables de un disturbio en la reacción del CG y la pérdida de la población de LB con CI (117).

La primera respuesta o diferenciación a plasmocito, luego del encuentro con el antígeno es proveniente de la zona marginal del bazo y de los cordones medulares de los ganglios linfáticos. Estos plasmoblastos que forman los AFC (del inglés, "antibody forming foci"), completaron el proceso de CI pero tiene un bajo nivel de HS; son responsables de una respuesta de anticuerpos rápida, de vida media corta y bajo umbral de activación (111).

En CG la diferenciación a células plasmáticas, surge luego de una fase de proliferación intensa dentro del folículo, la cual constituye un paso limitante para el inicio de esta etapa de diferenciación tardía. Se originan a partir de LB memoria o LB activados por el antígeno en interacción con LT<sub>FH</sub> específicos y células dendríticas. Por lo cual ya sufrieron los procesos de CI e HS; y son entonces responsables de la formación de anticuerpos de distintos isotipos con alta afinidad y especificidad antigénica (118). Se convierten en plasmocitos de larga vida si encuentran nichos de sobrevivencia en MO; lo cual garantiza una correcta respuesta de anticuerpos en el tiempo. Esto se encuentra alterado en la IDCV (119).

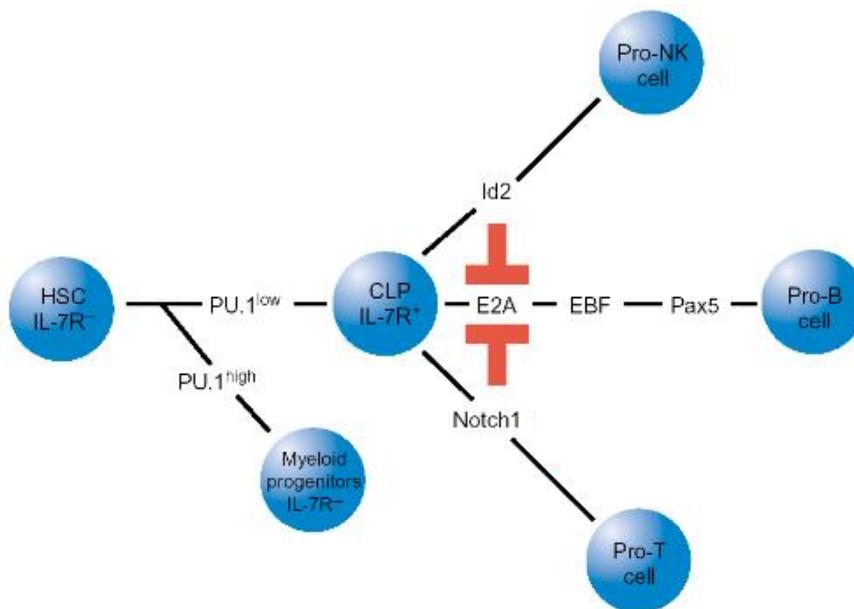
La regulación de los eventos tardíos de diferenciación B implica, para su normal desarrollo, un programa de regulación de la expresión génica por diferentes factores de transcripción. Los cuales son activados o reprimidos de forma coordinada, según el proceso de diferenciación en curso dentro de la célula B. . Es así que la activación y expresión continua del factor XBP-1 es crítica para la diferenciación a célula plasmática así como para mantener un pool de larga vida en MO con un correcto plegado y secreción de las Igs (120, 121).

### 3.0 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA MADURACIÓN DEL LB

El desarrollo del LB ha sido extensamente estudiado a lo largo del tiempo, debido a que su desregulación se encuentra en la base de enfermedades autoinmunes, linfomas e IDP.

Como fue mencionado anteriormente, la progresión del linaje B desde la célula progenitora hematopoyética (CPH) hasta el LB maduro, implica la expresión y pérdida secuencial de proteínas intracelulares y en superficie; re-arreglos de los genes de inmunoglobulinas, etc. Estos cambios fenotípicos que ocurren durante el desarrollo B son regulados molecularmente por la acción coordinada de múltiples factores de transcripción (FT).

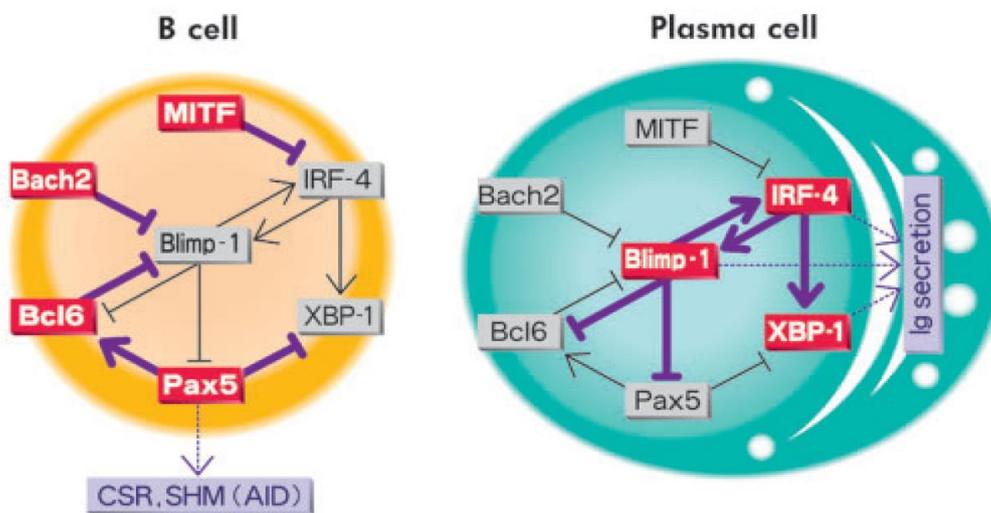
En la primera fase de diferenciación, en médula ósea (MO), los FT IKAROS y PU.1 actúan en vías paralelas para controlar la transición de CPH a precursor linfóide común (PLC) donde bajos niveles de PU.1 activan la expresión del receptor IL-7R $\alpha$  en esta célula, iniciando el compromiso con los diferentes linajes linfoides. Los factores E2A, "early B-cell factor 1" (EBF1) y PAX-5 regulan el desarrollo del precursor linfóide común (PLC) a células B tempranas, siendo críticos para su diferenciación en MO (Figura 2). Su expresión es regulada negativamente por NOTCH1 y el "inhibidor of DNA binding-2" (ID-2), los cuales son responsables de la diferenciación hacia las células T y NK respectivamente. (100, 112). Es así que la exposición de los PLC al microambiente del timo activa la expresión NOTCH.



**Figura 2. Control genético del compromiso de linaje en la linfopoyesis temprana.** HSC, *hematopoietic stem cells*; CLP, *common lymphoid progenitors*; IL-7R, *IL-7receptor*; E2A, *e-box transcription factor*; EBF, *early B-cell factor*; Pax-5, *paired box family 5*; ID-2 *inhibitor of DNA binding-2*. Modificado de *Transcriptional control of B cell development* (112)

En una segunda etapa de diferenciación, luego del encuentro del LB con Ag, aumenta la expresión de FT que le permiten adquirir sus características fenotípicas y funcionales para su maduración a células B memoria y plasmocitos. Dentro de los cuales se encuentran: “ B lymphocyte-induced maturation protein 1” (Blimp-1); “Interferon regulatory factor” (IRF-4) y “X-box-binding protein 1” (XBP-1) (118, 119). En este sentido la activación y expresión continua de este último FT es crítica para la diferenciación a célula plasmática así como para mantener un pool de larga vida en MO con un correcto plegado y secreción de las Igs.

La expresión de IRF-4 y XBP-1, es reprimida por los factores PAX-5, “microphthalmia-associated transcription factor” (MITF) y “b- cell lymphoma 6” (BCL-6) durante los procesos de HS y CI en CG (122).



**Figura 3. Transición de los factores de transcripción desde las células B hacia células plasmáticas.** En las células B, Bach2, Bcl6, MITF y PAX-5 reprimen los FT plasmocitarios (izquierda). Blimp-1, IRF-4 y XBP-1 promueven la diferenciación a plasmocitos (derecha). Los cuadros rojos indican los genes que se expresan, los grises indican los genes que no son expresados. Las líneas de color fuerte y las flechas indican la represión efectiva y la activación efectiva respectivamente. Las flechas punteadas representan el resultado biológico. CSR, *class switch recombination*; SHM, *somatic hypermutation* (SHM); Bach2, *BTB Domain And CNC Homolog 2*. Tomado de “*Architecture and Dynamics of the Transcription Factor Network that Regulates B-to-Plasma Cell Differentiation*” (123)

Como se muestra en la figura 3, los FT forman parte de una red intrínseca de regulación de la expresión génica, durante el desarrollo del LB (123).

Además de esta interacción, algunos FT muestran importantes niveles de auto-regulación a través del mecanismo de *splicing* alternativo. A modo de ejemplo en Pax-5, así como en Blimp-1, se han descrito isoformas de la proteína con funcionalidades diferentes originadas en moléculas de ARN mensajero distintos (124).

En la literatura, surgen algunos FT como los más significativos o relevantes para el normal desarrollo del LB así como alteraciones en su expresión en pacientes con IDCV. A los efectos de sistematizar el análisis de los mismos los subdividimos en dos grandes grupos:

### 3.1. Factores implicados en etapas tempranas de la diferenciación B

El gen **PAX-5** es uno de los nueve integrantes de la familia de FT *PAX* pero es el único que se expresa en las células hematopoyéticas; codifica para la proteína BSAP (del inglés: “B-cell specific activator protein”).

El *splicing* alternativo del gen *PAX-5* da lugar a múltiples isoformas de la proteína que difieren en su dominio C-terminal de transactivación pero conservan las funciones de la proteína. Este factor es requerido para mantener el programa de expresión génica del LB, mediante la regulación de un grupo variado de genes blanco, en interacción o cooperación con otros FT según la etapa del desarrollo en la cual se encuentre la célula B (123).

El inhibidor de la diferenciación, ID-2, juega un rol muy importante en la coordinación entre la proliferación y la diferenciación; a través del secuestro e inhibición de la unión al ADN de los FT E2A y PAX-5. Es así que mediante el balance entre la activación de ID-2 y PAX-5 se regula la expresión de AID y por lo tanto el proceso de CI en CG (125).

Estudios realizados en LB de pacientes con LLC, demuestran que la autorregulación del transcripto de PAX-5 y sus diferentes isoformas regulan de manera diferente la expresión de AID. Siendo que la forma de *splicing* con delección completa del exón 8 se asocia a una menor expresión de AID con defecto en el proceso de CI a diferencia de la regulación positiva de AID dada por la forma completa del factor PAX-5. Hallazgos similares se apreciarían en LB de controles sanos (124).

Este factor es crítico en los estadios tempranos de maduración, durante el pasaje del estadio pro-B a pre-B en MO (126). En el año 2001 Horcher y col, demostraron que la expresión continua de PAX-5 durante la etapa del LB maduro, en periferia, es necesaria para mantener el compromiso con el linaje B, su identidad, el pool de linfocitos de larga vida y sus funciones en las etapas tardías de la maduración.

Modelos murinos inactivados para el gen *PAX-5*, muestran que los LB maduros presentaban un cambio en el patrón de expresión génica, y alteran la expresión de diferentes proteínas implicadas en la activación y función de la célula B. Estas alteraciones afectarían la capacidad de proliferación, supervivencia y función de la célula B. Presentando un menor pool de LB maduros de larga vida en los órganos linfoides secundarios con una disminución o ausencia de la recirculación B en MO (127, 128).

En relación a PAX-5 y la enfermedad IDCV; si bien no contamos con estudios recientes, en el año 1998 se estudió la expresión de este FT en pacientes con probable IDCV. En relación al perfil inmunológico de los 7 casos analizados se destaca: hipogammaglobulinemia de los tres isotipos y valores de LB severamente descendidos (0.9 a 2.3%) en 6; un paciente con valores de IgM y células B dentro del rango normal. Se identificó una ausencia de expresión de PAX-5, a nivel de ARN mensajero (ARNm) de “ peripheral blood mononuclear cells” (PBMC), en los 6 pacientes con LB descendidos (129). Posteriormente analizan la inducción de este FT en dos de estos pacientes, luego de la activación de PBMC con anti-CD40 y las interleuquinas IL-2 e IL-10. En estas condiciones de activación, se observó expresión del gen *PAX-5* en uno de dos casos analizados. Por lo que los autores sugieren que *in vivo*, la ausencia de este FT no se debería a un defecto intrínseco del LB sino que sería un reflejo del fenotipo inmaduro de estas células producto de posibles alteraciones en la interacción con las células T a través de las señales de activación, maduración y supervivencia.

Alteraciones genéticas en *PAX-5* han sido descritas en pacientes con enfermedades hematológicas. Es así que mutaciones puntuales, deleciones o translocaciones en este FT, se observan en el 35% de niños y adultos con leucemia linfoblástica aguda del precursor de las células B. Los autores establecen una asociación significativa entre el estatus de este gen y la evolución clínica (130).

El FT **E2A** es codificado por el gen *TCF3*; su transcrito da lugar a dos isoformas de la proteína, E12 y E47, mediante *splicing* alternativo. Estas se diferencian en el dominio de dimerización y unión al ADN, responsable de la desmetilación en la región promotora que altera la estructura de la cromatina y facilita la accesibilidad de las enzimas de transcripción (131).

E2A se expresa en células hematopoyéticas como linfocitos y macrófagos; siendo crítica su expresión para el desarrollo de las células B en médula ósea. En el año 1994 Zhuang y col. demuestran un bloqueo en la diferenciación de los precursores linfoides a células B a nivel del estadio pro-preB; en modelos murinos con deleción homocigota en el gen *E2A* (132). Esto se traduce en una MO desprovista de CD19 con ausencia de expresión de los FT que actúan “corriente abajo” de E2A, como son *PAX-5* y *EBF1*. Para el caso de mutaciones en heterocigosis observan una disminución de linfocitos B a la mitad en relación a los ratones *wild type*, lo cual se correlacionaría con el nivel expresión de E2A dentro de la célula.

La normalidad en los eventos moleculares para la iniciación y compromiso con el linaje B, dependientes de E2A, no aseguran su diferenciación posterior; ya que si bien ambos procesos son “inseparables”, uno no es garantía del otro. Esto se debe a que otros mecanismos deben estar indemnes para asegurar el correcto desarrollo, sobrevivencia y expansión de las células B en médula. En este sentido, E2A en respuesta a la IL-7 liberada por las células estromales, regula la expresión de genes implicados en el re-arreglo del segmento VDJ (*RAG1-2*); la re-edición del BCR y los mecanismos anti-apoptóticos para una correcta especificidad antigénica y selección clonal (133, 134). E2A se expresa en bajos niveles en los LB maduros en tránsito; y aumenta su nivel de expresión, una vez que las células B llegan a los órganos linfoides secundarios y son activados por el antígeno y las células T para la reacción del centro germinal.

En relación al rol en CG, en año 2008, se demostró que el aumento de su expresión en LB activados se debe a la regulación que ejerce este FT en los eventos moleculares que ocurren durante la maduración tardía (135).

E2A regula la expresión de AID en los LB activados, participando tanto en su inducción como en la expresión sostenida de esta enzima. A su vez este FT reprime la expresión de la enzima UNG2 y regula negativamente su acumulación en secuencias “hotspot” para AID en los genes de IgH. Por lo cual E2A regula la expresión balanceada de AID y UNG2; estimulando la diversificación de las Igs, amplificando la HS y suprimiendo los mecanismos de reparación normal del ADN (136, 137).

En lo que refiere a la diferenciación de los LB a células memoria y/o plasmocitos; no hay evidencia de implicancias funcionales directas del FT E2A en estos procesos. Aunque su expresión actúa de forma “indirecta” a través de la activación de *PAX-5*, el cual si es responsable de mantener la identidad y funciones de la célula B durante la diferenciación tardía en CG.

En relación a posibles defectos en el FT E2A e hipogammaglobulinemia, en el año 2013, Notrangelo y col.; describen una nueva inmunodeficiencia primaria en pacientes que presentaban hipogammaglobulinemia, disminución de LB y ausencia de expresión del receptor BCR en membrana (104).

### 3.2 Factores implicados en etapas tardías de la diferenciación B

La diferenciación terminal de las células B en células plasmáticas es regulada por los siguientes factores de transcripción:

**Blimp-1** es codificado por el gen *PRDM1*, es un FT que se expresa en células de la inmunidad innata, linfocitos T y B, además de células epiteliales.

En lo que refiere al rol dentro del LB, su expresión es requerida para la diferenciación terminal a células plasmáticas; luego de la activación antigénica a través del BCR y la cooperación T a través de la vía CD-40L, además de los agonistas TLR. Su expresión es inducida de forma directa por el FT IRF-4, además de STAT3, STAT5 y AP-1 (138).

Blimp-1 actúa como “switch” molecular en CG, al reprimir la actividad de PAX-5 e inducir la expresión de XBP-1, lo cual permite iniciar la diferenciación del LB a células plasmáticas. La acción represora sobre PAX-5 es crítica y no redundante; mientras que la inducción de XBP-1 es modesta y redundante (139).

Por otra parte Blimp-1 frena la proliferación celular al inhibir de forma específica los genes *c-MYC* y *BCL-6* e inhibe el proceso de CI reprimiendo la expresión de la molécula AID y STAT-6 (121).

Una vez que la célula B se diferencia a plasmocito, baja su nivel de expresión a un mínimo suficiente que permite mantener este estadio de diferenciación así como un pool de células plasmáticas de larga vida en MO. Así mismo la inhibición de su expresión en LB naive y de CG permite completar los procesos de CI e HS, requeridos para una eficiente respuesta humoral T-dependiente.

En el año 2005, Taubenheim y col. plantean por primera vez la hipótesis de un posible defecto en FT a nivel del LB, en pacientes con IDCV. En este trabajo, se estudiaron proteínas cruciales para la reacción de CG y la maduración a células plasmáticas. Se analizó la expresión en proteínas de los FT BCL-6 y Blimp-1, a nivel de ganglios linfáticos. Además de la molécula CD138 como marcador del estadio de célula plasmática. En este trabajo se establecieron tres estadios de diferenciación: centrocitos (Ki67+/- CD138<sup>-</sup>), plasmoblastos (Blimp-1<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) y células plasmáticas (Blimp-1<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup>). Los tres pacientes, analizados, mostraron ausencia de células plasmáticas a pesar de tener una expresión normal de Blimp-1; por lo cual se plantea un posible defecto “corriente abajo” de este FT o una alteración en la función de la proteína (49).

**XBP-1** actúa río abajo de Blimp-1 y es el único FT con una funcionalidad específica como la habilidad para inducir el correcto plegado y secreción de proteínas, requerido por la célula B para secretar anticuerpos antígeno específico. Es ubicuo en los tejidos y se expresa frente a eventos que alteren el equilibrio dentro del retículo endoplásmico (RE), participando en el desarrollo de tejidos embrionarios, la angiogénesis post-isquemia y la diferenciación a plasmocitos.

En el caso particular de las células B, el evento gatillo para la expresión de XBP-1, está determinado por la acumulación de inmunoglobulinas desplegadas dentro del retículo durante el incremento de su síntesis, proceso conocido como “Unfolded Protein Response” (UPR). (140). En el circuito transcripcional dentro del LB, *XBP-1* es activado por IRF-4 “corriente arriba” y regulado negativamente por Pax-5 como se muestra en la figura 3.

Su función consiste en regular la expresión de chaperonas, implicadas en la restauración de la capacidad secretoria de la célula.

En el año 2001 Reimold y col, definen a XBP-1 como un FT crítico para la diferenciación tardía del LB, asociando su deficiencia con la disminución de células plasmáticas de larga vida en médula ósea y una menor producción de anticuerpos (120).

Trabajos posteriores sugieren que la expresión de XBP-1 impulsa la diferenciación a célula plasmática; de una manera independiente al inicio de la síntesis de proteínas. De hecho, señalan, que la acumulación de inmunoglobulinas mal plegadas, es responsable de amplificar y mantener la señal para la UPR una que este proceso se inicia. Por lo cual, un defecto o incapacidad para secretar anticuerpos, para el caso de deficiencias en XBP-1, se presentaría una vez que la célula presenta una diferenciación morfológica y funcional compatible con una célula con capacidad secretora CD138+ (140).

En cuanto a las posibles deficiencias o alteraciones de este FT en IDP, en el año 2009 Kuribayashi JS y col.; describen un paciente con disminución en la expresión de XBP-1s. Comprobando para este caso, in vitro, un defecto en el plegado y la secreción de anticuerpos, asociado a una menor expresión de los transcritos XBP-1s, IRE1- $\alpha$  y la chaperona BIP. Los autores descartan mutaciones en el gen de *XBP-1* y en relación al fenotipo del paciente, se destaca la presencia de infecciones como único antecedente clínico, hipogammaglobulinemia y LB presentes (141).

En relación a otros desórdenes inmunológicos asociados a un posible defecto en la vía de activación de XBP-1; existen algunos reportes que señalan un rol modulador en enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias como la artritis reumatoide (142).

**IRF-4** es un FT que se expresa de forma específica en linfocitos y células de la inmunidad innata (macrófagos y células dendríticas) (143).

Dentro del linaje B, IRF-4 se expresa en todos los estadios de maduración, menos durante la reacción de CG (centroblastos), y se define como un FT dispensable durante las etapas tempranas del desarrollo en MO pero clave en las etapas tardías de maduración. Es así que su expresión es responsable de iniciar o “apagar” la reacción de CG, al regular la expresión del gen *BCL-6*. Este FT participa en los procesos de CI y la diferenciación a células plasmáticas; regulando la expresión de la molécula AID además del FT Blimp-1 según su expresión relativa a nivel de ARNm (144) (145).

Induce la expresión de BLIMP-1, de forma directa, y este FT a su vez activa la expresión de IRF-4 en células plasmáticas, desencadenando un proceso de regulación en bucle. Activa además la expresión de XBP-1 “corriente abajo” al igual que BLIMP-1. Su expresión es inhibida por “Microphthalmie-associated transcription factor” (MITF) como se muestra en la figura 3 (123).

En relación a posibles desórdenes inmunológicos relacionados con el gen *IRF-4*, en el año 2018 fue descrita una inmunodeficiencia primaria con compromiso de la inmunidad humoral y celular (IDP combinada: Tipo I). Esta es causada por una disomía uniparental del cromosoma 6 que codifica para el gen *IRF-4*, provocando una disminución de su expresión. Clínicamente se presentaron con dermatitis severa e infecciones recurrentes y en el laboratorio con eosinofilia, agammaglobulinemia, disminución de las células B totales y memoria. En relación al compromiso T se destaca disminución de las Th17, T reguladores y baja respuesta a la fitohemaglutinina (PHA); lo cual la define como IDP combinada (146).

El factor “Signal Transducer and Activator of Transcription 6” (**STAT-6**) es ubicuo pero con sobreexpresión a nivel de monocitos y linfocitos. Esta proteína media la respuesta a IL-4 de los LT y LB, una vez que es activado por las “janus quinasas” (JAK) asociadas al receptor de IL-4 (R-IL-4) (147). En la célula B este FT regula la expresión de marcadores de superficie que facilitan la presentación antigénica al LT, participando en el “switch” a IgE y algunas subclases de IgG. Para lo cual induce la expresión de AID de forma sinérgica con NFkappaB, luego de la señal recibida a través del R-IL-4 y la interacción de CD40-CD40L respectivamente (148).

En relación a antecedentes en esta vía de activación y la IDCV, en el año 2017 se describe una disminución de fosforilización de STAT-6, inducida por IL-4, en linfocitos T en siete pacientes con un fenotipo de disregulación inmune predominante. En relación al fenotipo en sangre periférica se destaca un perfil de CD4 activados, sesgo hacia un perfil inflamatorio de tipo Th1 con disminución de la población *naïve* y los LT reguladores.

En relación al compartimento B, los autores observan una respuesta normal en células B para la vía IL4-Stat-6, lo cual sugiere que el defecto observado para la células T no es causado en línea germinal (149).

En relación a la regulación negativa de la diferenciación celular de la célula B, también nos interesó investigar el factor ID-2 por su conocido rol en etapas tempranas y tardías.

**ID-2** pertenece a la familia de los factores inhibidores de la unión al ADN, reprimiendo las funciones de los factores básicos de transcripción hélice-bucle-hélice de manera negativa dominante al suprimir su heterodimerización. Su expresión es ubicua a nivel de ARNm, participa en la regulación de varios procesos como el ciclo circadiano, la angiogénesis, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular. En este sentido es conocida su función para la diferenciación del PLC a células NK, al inhibir la unión del factor E2A al ADN por sobreexpresión de ID-2 en el timo, antagonizando así la diferenciación a células B como se muestra en la Figura 2 (112).

Durante el desarrollo del LB maduro, ID-2 regula la función de PAX-5 y E2A en CG, los cuales muestran una mayor expresión luego que esta célula es activada por el LT una vez que se presenta el reconocimiento antigénico (150). ID-2 inhibe la heterodimerización y unión al ADN de ambos FT, antagonizando así su función (151).

Por otra parte ID-2 afecta negativamente la expresión de la molécula AID; ya que esta depende del balance de la expresión entre PAX-5 e ID-2 (125). En ese sentido ID-2 participa en la regulación de los procesos de maduración tardía del LB, dependientes de correcta activación de AID, como son la CI y la HS afectados en grado variable en la IDCV (152).

***En síntesis: los diferentes FT del LB actúan de forma coordinada, y a través de procesos de regulación de la expresión génica permiten a la célula B completar de forma adecuada los diferentes estadios de maduración.***

## **HIPOTESIS**

La IDCV es considerada una enfermedad poligénica por algunos autores y en más del 90% de los casos no se identifica el defecto molecular. En los últimos 10 años los mayores avances en el conocimiento de la inmunopatogenia de esta enfermedad, consideran al LB como responsable principal. Como pudo observarse a lo largo de la introducción de esta tesis los FT tienen un rol fundamental en el destino de la célula linfocitaria y en el proceso de maduración linfocitaria.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, esta tesis se plantea si diferencias en el perfil de expresión de FT, implicados en el desarrollo del linfocito B, podrían explicar la hipogammaglobulinemia de la enfermedad IDCV.

Esta enfermedad tiene un espectro de presentación clínica heterogéneo, desde casos que solo se presentan con infecciones a situaciones donde las manifestaciones por desregulación predominan, afectando severamente la calidad de vida y el pronóstico de esos pacientes. En este sentido nos preguntamos si sería posible establecer una asociación entre el fenotipo clínico prevalente en la IDCV de la edad pediátrica y un perfil de expresión diferencial para los FT.

## **OBJETIVOS**

**General:** Contribuir al conocimiento sobre aspectos clínico y moleculares de la IDCV de edad pediátrica.

### **Específicos:**

1. Caracterizar el fenotipo clínico e inmunológico de niños con IDCV asistidos en el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell (HP-CHPR), Montevideo, Uruguay; y en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina.
2. Analizar el perfil de expresión de diferentes factores de transcripción implicados en la diferenciación del LB, en los pacientes con IDCV del HP-CHPR.
3. Caracterizar el perfil clínico y molecular en los pacientes con IDCV del HP-CHPR.

## CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Diseño experimental

El proyecto se desarrollo en tres etapas:

1. Descripción de las características clínicas e inmunológicas de los niños con IDCV asistidos en el “Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan”
2. Descripción de las características clínicas e inmunológicas de los niños con IDCV asistidos en el HP-CHPR. .
3. Análisis de la expresión molecular de los factores de transcripción del linfocito B en los niños con IDCV asistidos en el HP-CHPR en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo.

### 2.2 Aspectos éticos

El protocolo de estudio fue avalado por las instituciones de salud implicadas. Fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UdelaR, el HP-CHPR y el Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”.

En todo momento se mantuvo el anonimato y el respeto a la confidencialidad de los datos. Se solicitó consentimiento informado.

### 2.3 Aspectos clínicos y perfil inmunológico

Para el desarrollo de las etapas 1 y 2, se realizó un estudio retrospectivo en el que se incluyeron todos los menores de 15 años portadores de IDCV asistidos en el “Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan” entre el 1 de abril de 2001 y el 31 de marzo de 2011 (etapa 1) y en el HP-CHPR entre el 1 de agosto de 2006 y el 1 de agosto de 2012 (etapa 2).

Para el diagnóstico de probable IDCV se aplicaron los criterios de la ESID/PAGID de 1999: edad mayor a dos años, valores de IgG menor a 2DS de la media para la edad y al menos uno de los isotipos de IgA o IgM descendidos o ausentes, ausencia de respuesta a isohemaglutininas y/o pobre respuesta a inmunizaciones. Se utilizó como fuente de información la historia clínica.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que presentaban hipogammaglobulinemia secundaria a otras causas: anomalías cromosómicas (18q, trisomía 8, trisomía 21, monosomía 22); enfermedades malignas; tratamiento inmunosupresor; pérdida de proteínas secundaria a linfangiectasia intestinal, síndrome nefrótico o enteropatías.

**En relación al fenotipo clínico se registraron las siguientes variables:** edad al diagnóstico; sexo, antecedentes familiares (consanguinidad, IDP, enfermedades autoinmunes, hemato-oncológicas, HIV); patología infecciosa y no infecciosa al momento del diagnóstico (autoinmune, inflamatoria, linfoproliferación -esplenomegalia y/o poliadenomegalias-, neoplasias, enfermedad pulmonar crónica), tratamiento (gammaglobulina, profilaxis antibiótica, inmunosupresores, biológicos, fisioterapia respiratoria) y evolución (tiempo de seguimiento clínico, patologías luego del diagnóstico, muerte).

**El fenotipo inmunológico se describió a través de las siguientes variables:** recuento relativo y absoluto de leucocitos, linfocitos y neutrófilos; concentraciones de hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y recuento de plaquetas. Dosificación de Inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM e IgE. Respuesta de anticuerpos tipo IgG frente a antígenos proteicos (toxoides tetánico), antígenos capsulados de neumococo, y de tipo IgM frente grupo sanguíneo AB (isohemaglutininas); poblaciones linfocitarias ampliadas: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16/56+. Perfil de linfocitos B: CD19+/CD27+; CD19+/CD27+/IgD+; CD19+/CD27+/IgD-; CD19+/CD21+. Se consignaron los datos referidos a estudios por citometría de flujo (expresión de CD40, CD40L, NKT, CD19, CD20 e ICOS) y/o biología molecular requeridos para la exclusión de otras Inmunodeficiencias Primarias con fenotipo clínico- inmunológico similar a IDCV y genes bien caracterizados (*BTK, AICDA, UNG, CD40L, CD40, SH2D1A*). Se consignaron los casos en los cuales se realizaron estudios moleculares, disponibles en el laboratorio, de genes relacionados con la IDCV como por ejemplo el gen *TACI*.

La caracterización del fenotipo inmunológico fue realizada en el laboratorio de Inmunología del HP-CHPR en los pacientes de Uruguay y en el servicio de inmunología del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” para los pacientes procedentes de Argentina. Para lo cual se utilizaron las siguientes técnicas: nefelometría, citometría de flujo y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los estudios moleculares (método de secuenciación directa Sanger) para la exclusión de otras IDP con fenotipo similar IDCV, fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Garrahan.

La caracterización del perfil de expresión de FT de los pacientes de Uruguay, fue realizada en la Unidad de Proteínas Recombinantes (UPR) del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMont) por la autora de esta tesis.

## **2.4 Aspectos moleculares**

### **2.4.1 Obtención y procesamiento de las muestras**

Previo consentimiento informado se obtuvieron dos tipos de muestras:

- Controles: 20 ml de sangre heparinizada de un “pool” de donantes voluntarios, en seguimiento en otras áreas ambulatorias del HP-CHPR; sin antecedentes de IDP, inmunodeficiencia secundaria, malignidad ni autoinmunidad.

- Pacientes con Probable IDCV, asistidos en el HP-CHPR: 15 ml de sangre heparinizada.

### **2.4.2 Purificación de células mononucleares**

Las muestras de sangre periférica obtenidas fueron procesadas en la campana de flujo laminar, en un falcón estéril de 50 ml. Se realizó una dilución 1:1 con PBS 1X y se agregó Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077-1, Sigma) en una proporción 1:2. La muestra en suspensión se centrifugó a una velocidad de 400g durante 20 minutos a 6° C, sin aceleración ni freno del rotor. .

Se obtuvo un anillo de células PBMC mediante un gradiente de densidad, el que se logra visualizar en la interfase entre el plasma y la solución de Ficoll. Las células fueron recuperadas lentamente, utilizando una pipeta de 10 ml graduada. Luego se realizó el lavado y suspensión en solución de PBS 1X, guardando una relación de 1:10. Por último se cuantificaron por conteo en cámara de Neubauer.

### **2.4.3 Purificación de linfocitos B**

Una vez obtenidas las PBMC, se procedió a realizar la separación de linfocitos B (CD19+) mediante la técnica de selección positiva con esferas magnéticas (en inglés: "MicroBeads") del Kit Miltenyi Biotec (Ref. 130-050-301, MACS, Alemania); utilizando columnas del tipo MS. Esto permite un límite de obtención de células B de hasta  $1 \times 10^7$  sobre un total de  $2 \times 10^8$  PBMC en suspensión.

Las PBMC en solución de PBS 1 X se centrifugaron a 300 g por 10 minutos y suspendieron en el buffer de purificación B (PBS 1X, EDTA 2mM y BSA 0.5%): 80ul por cada  $10^7$  células. Luego se incubaron con micro-esferas magnéticas anti-CD19+ en una relación de 20ul por cada  $10^7$  PBMC; durante 15 minutos a 4° C. Posteriormente se realizaron lavados para eliminar uniones inespecíficas, agregando 1500µl del buffer de purificación B por cada  $10^7$  PBMC y centrifugando a 300g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen de 500ul de buffer. Estas fueron cargadas en columnas MS colocadas en un campo magnético y aquellas que fueron efectivamente marcadas con las micro-esferas anti-CD19+ quedaron retenidas en la columna y las que no pasaron a través de ésta. Luego de lavar la columna con 1500µl de buffer se removió la columna del campo magnético para así poder eluir las células B seleccionadas en 1mL del buffer de purificación.

El control de purificación se realizó mediante la técnica de citometría de flujo, utilizando los anticuerpos anti-CD19RPE (B cell, CD19-RPE (Dako, Dinamarca); se evaluó la pureza (% de linfocitos CD19 +) en el total de células CD45+ CD14-. El estudio se realizó en laboratorio de Citometría del IPMont.

### **Líneas celulares utilizadas para la puesta punto de factores de transcripción del LB**

**Daudi:** es una línea celular de linfoblastos B de sangre periférica de la especie humana, bien caracterizada, que ha sido empleada ampliamente en el estudio de los mecanismos de la leucemia. Esta línea proviene de un paciente de raza negra con linfoma de Burkitt y su conservación se realiza de rutina en el laboratorio, bajo nitrógeno líquido.

**BL-2:** es una línea celular (centroblastos) de origen humano, proveniente de un niño de raza blanca con linfoma de Burkitt no endémico (fase III). Estas células no expresan el antígeno del virus Epstein-Barr (EBV) y el proceso de hipermutación somática de genes de inmunoglobulina puede ser inducido.

Ambas líneas fueron obtenidas en ATCC ([https://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx)), expandidas y congeladas posteriormente.

### **2.4.4 Extracción de ARN de linfocitos B y no B**

Se procedió a la extracción de ARN del grupo de linfocitos B (CD19+) y linfocitos no B (CD19-) como control de un perfil de expresión diferencial ya conocido.

La extracción de ARN de los LB se realizó a partir de  $3,5 \times 10^6$  en el paciente 1 (IDCV1);  $4 \times 10^6$  en el paciente 2 (IDCV2) y de  $2,1 \times 10^6$  LB en el paciente 3 (IDCV3).

Se utilizó el reactivo TRIzol Reagent y se obtuvo el ARNm según las instrucciones del fabricante.

Las células B y no B en suspensión se centrifugan a una velocidad de 2500rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante y se agregaron 1000ul de TRIzol al total de células,

homogenizando la muestra con pipeta, vortex y dejando la misma durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Para la separación de las fases se agregaron 200µl de solución de cloroformo, dejando incubar la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 12000g durante 15' a 4 ° C. Se extrajo la fase superior acuosa-ARN y se agregó 500µl de isopropanol para la precipitación 15 minutos a -20 °C. . Luego se centrifugó a 12000g durante 10 minutos a 4 ° C; se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1000µl de etanol 75% en centrifuga a 7500g durante 5' y 4°C. Luego de descartar el sobrenadante en su totalidad, se dejó secar el pellet. El ARN se resuspendió en 25-30µl de H2O pura y se dejó durante 10 minutos a 60 °C para poder disolverlo completamente. Luego se mezcló bien la muestra con micropipeta y se conservó en hielo hasta evaluar la cantidad de ARN obtenido por medición de la absorbancia a 260nm y 280nm por espectrofotometría. El material así obtenido fue almacenado a -20 °C para ser utilizado en la síntesis de ADN complementario (ADNc).

#### 2.4.5 Optimización de la técnica de extracción de ARN para las células B

Debido al poco material que muchas veces obteníamos (número de células luego de la purificación de células CD19 positivas), nos vimos obligados a evaluar distintos protocolos para aumentar la cantidad y calidad del producto obtenido. De esta manera se realizaron las siguientes variaciones en el protocolo de extracción de ARN previamente descrito:

1) Disminución del volumen de TRIzol a 800µl y adecuación de los volúmenes de cloroformo e isopropanol a 160µl y 400µl respectivamente con el objetivo de mantener las proporciones entre los reactivos. 2) Luego de recuperada la fase acuosa-ARN, se adicionó 1µl de glicógeno para aumentar la estabilización del ARNm. 3) Incremento del tiempo de precipitación 1 hora a - 20° C. Una vez que visualizamos el pellet de ARN, se realizó un el lavado con Etanol al 75% frío.

#### 2.4.6 Síntesis de ADNc (Retro Transcripción)

El ADN copia (ADNc) se obtuvo mediante transcripción inversa (RT). La cantidad de ARN utilizada para su síntesis fue adecuada y optimizada según la calidad del ARN extraído. La calidad del mismo fue analizada por espectrofotometría (Nanodrop) como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Concentración y pureza del ARN extraído a partir de LB con IDCV.

Identidad de la muestra	ng/µl	A260/280	A260/230	ARN (RT-PCR)
IDCV1 (CD19+)	610.8	2.06	0.54	700ng
IDCV1 (CD19-)	268	1.96	0.62	700ng
IDCV2 (CD19+)	185.40	1.86	0.51	1000ng
IDCV2 (CD19-)	561.28	1.96	1.12	1000ng
IDCV3 (CD19+)	111	1.86	0.30	700ng
IDCV3 (CD19-)	391.8	1.97	0.88	700ng

IDCV: inmunodeficiencia común variable; LB: linfocito B; CD: "cluster of differentiation".  
A: medida de absorbancia en el NanoDrop.

Para la RT se utilizó la enzima Transcriptasa Reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MLV-RT), según instrucciones del fabricante. El ARN presente en cada muestra fue transcrito a ADNc utilizando oligoDT.

Se realizó **Mix1**: 2µl de dNTPs 10mM, 2µl OligodT (500ug/ul), ARN según tabla 1 y H2O ultrapura libre de ARNasa hasta completar un volumen de 24µl. Mix1 se llevó a una temperatura de 65°C

durante 5' y luego de una breve centrifugación se colocó en hielo durante 2 minutos para estabilizar el ARN. Posteriormente se adicionó **Mix2**: 4µl de DTT 0.1M, 8ul Buffer Reacción 5X (250Mm Tris HCl pH8.3 a TA, 375Mm KCl, 15Mm MgCl<sub>2</sub>) y 2µl de la enzima RNAasa sin (40µl/ul). Una vez que se alcanzó una temperatura de 37°C (actividad enzimática de M-MLV presente) durante 2' se adicionó 1µl de la enzima M-MLV-RT. El volumen final de la reacción fue de 40µl, este se incubó a 37 °C por 50 minutos. Se realizó la inactivación enzimática a 70 °C por 15 minutos.

El control de calidad del ADNc obtenido se realizó un mediante la amplificación por PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) del gen constitutivo GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa). Primers GAPDH: Foward 5`ATGCCAGTGAGTTCCC y Reverse 5`GGTGCTGAGTATGTCGTGGA; según el protocolo descrito en Oppezzo y col. (153).

### 2.4.7 Diseño y selección de primers específicos para los FT

Los primers fueron diseñados y seleccionados por el laboratorio de la Unidad de Proteínas Recombinantes (UPR) del Insituto Pasteur de Montevideo, lugar ejecución de la tesis. Se consideraron 6 principales variables:

1. Hibridación eficiente a la secuencia de interés y despreciable a otra secuencia presente en la muestra.
2. Ausencia de complementariedad intra e intermolecular entre los primers, especialmente en el extremo 3' para evitar la formación de dímeros de primers que disminuyan la eficacia en la formación del producto de interés.
3. Longitud de cada primer entre 18- 24 bases.
4. Mantener un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 % (similar al templado).
5. Los dos primers del par deben de tener temperatura de fusión "Tm" cercana.
6. Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.

En la tabla 2 se muestran los primers con sus respectivas secuencias. La temperatura de *annealing* fue de 62° C.

**Tabla 2.** Secuencia de *primers* para la amplificación por PCR de los genes de los factores de transcripción del linfocito B analizados.

<b>PRIMERS</b>	<b>For 5' - 3'</b>	<b>Rev 5' - 3'</b>
<b>PAX-5</b>	ACTTTTCCCTGTCCATTCCATC	GCC ATC AGT GTT TGG TGC CCG
<b>E2A</b>	ATGAACCAGCCGCAGAGGATG	GCAGCCCAAGAAGGTCCGG
<b>IRF-4</b>	AGGATCTACTGGGACGGGCC	GGGGCTACGATTTACCAGAACA
<b>ID-2</b>	AGCATGAAAGCCTTCAGTCCCG	CACGGAATCTTTTAAGTGCTGAAC
<b>STAT-6</b>	CAGCAGGAGGTAGGGGCG	TGGGAAGTCTGCTCTGCC
<b>XBP-1</b>	AATGGATCCATGGTGGTGGTGCCAG	GTC CAA GTT GTC CAG AAT GCC C

E2A, *e-box transcription factor*; PAX-5, *paired box family 5*; IRF-4, *interferon-regulatory factor 4*; XBP-1, *x-box-binding protein 1*; ID-2, *inhibidor de DNA binding-2*; STAT-6, *signal transducer and activator of transcription 6*.

#### **2.4.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se amplificó la región de interés mediante la reacción de PCR. El volumen total de la reacción (25 µl) contenía los siguientes reactivos: **ADNc** 1µl, **Primer For 10µM** 1.25µl, **Primer Rev 10µM** 1,25 ul, **Buffer 10X** 2,5 µl , **MgCl 25mM** 1.25, **dNTP 10mM** 0,5 µl, **Taq polimerasa (Fermentas)** 0.8 µl y **H2O** hasta alcanzar un volumen final de 25 µl.

Se realizó el programa de amplificación en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a una temperatura de 94°C por 3 minutos; seguido de 30 ciclos de amplificación, en el caso de los primers para GADPH y 35 ciclos para los factores de transcripción. Cada ciclo de amplificación consistió en un paso de 60 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 62°C (temperatura de de annealing) y 1 minuto de extensión a 72°C. El programa terminaba con un una elongación final durante 7 minutos a 72°C y parada a 4°C.

En el caso del paciente 3 (IDCV3) se realizaron ajustes en el volumen de ADNc de la reacción de PCR para la amplificación del FT XBP-1, en las muestras de LB del paciente y el control. Esto se debió a la ausencia de amplificación en el control sano LB con el volumen de ADNc según el protocolo inicial. El ajuste final para la PCR XBP-1 fue de 2µl para la muestra de LB del paciente; y 4µl para LB del control.

#### **Geles de agarosa**

La evaluación de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Para el análisis de las muestras se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. La electroforesis se realizó a 100V durante 20 minutos. Los fragmentos de ADN se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

#### **2.4.9 Cuantificación de la PCR y análisis de los datos**

El producto de amplificación obtenido por la PCR fue cuantificado mediante el estudio de densitometría de la imagen, utilizando el programa FIJI descrito por Schindelin y col. (154)

Los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

#### 2.4.10 Activación *in vitro* de células B del paciente IDCV1

La activación se realizó a partir de una población de  $1.6 \times 10^6$  células B/ml del paciente IDCV1 y  $1.4 \times 10^6$  células B/mL del control.

El **mix de activación** contenía los siguientes reactivos: 500µl de IL-4 (Preprotech, México) y 20µl de la proteína recombinante CD40L soluble (Preprotech, México) a una concentración final de 5ug/ml en el medio RPMI + SBF al 10% hasta completar un volumen final de 2000 µl.

Inicialmente se peletearon las células durante 5 minutos a 4°C y 400g; luego se descartó el sobrenadante con pipeta para dejar el menor volumen posible. Agregamos 1000 µl de la mix de activación a cada muestra: P1 y control. Luego se colocó la solución final en placa de 24 pocillos; y se adicionaron 10 ul de penilestreptomocina a cada pocillo.

Las células permanecieron en la estufa de cultivo a 37 °C durante 3 días. Al día +3 post-activación se recuperaron las células en suspensión y se centrifugaron a 400g con una temperatura de 4°C, durante 5'. El pellet y los pocillos de la placa fueron lavados con 3ml de PBS 1X.

Luego procedimos a la extracción de ARN, a partir de las células activadas en suspensión, utilizando el kit de mirVana, según las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se eluyó en un volumen de 100µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa.

La síntesis de ADNc se realizó por RT a partir de 160 ng de ARN y según el protocolo del **item 2.4.6**, pero en esta oportunidad se utilizó la enzima “SuperScript™ II Reverse Transcriptase” (Invitrogen, USA). Optamos por esta enzima con el objetivo de mejorar el rendimiento de la RT dada la escasa concentración de ARNm (molde) que se obtuvo del pellet de células activadas. Las características del ARN extraído se analizaron por espectrofotometría como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración y pureza del ARN extraído de LB post-activación.

Identidad de la muestra	ng/µl	A260/280	A260/230	ARN (RT-PCR)
IDCV1 activado	16,49	1,99	0.86	160ng
Control activado	43.54	2,15	1,71	160ng

IDCV: inmunodeficiencia común variable. A: medida de absorbancia en el NanoDrop.

#### 2.4.11 Clonado y secuenciado del producto de PCR del gen XBP-1

Se amplificó por PCR el ADNc de XBP-1 en las condiciones descriptas en el **ítem 2.4.8**. Revelando el amplicón con bromuro de etidio en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Los productos de la reacción de tamaños 644pb y 350pb aproximadamente se cortaron del gel y se purificaron con el Kit de purificación *NucleoSpin*® Extract II Kits (Ref. 740609.250, <https://www.mn-net.com>, USA).

Los distintos productos de ADNc de XBP-1 amplificados y purificados se clonaron en el vector *pGEM*®-T Easy (Promega, <https://worldwide.promega.com>) en una reacción de ligación de 10  $\mu$ L siguiendo las recomendaciones del proveedor, utilizando 3 $\mu$ L de inserto purificado.

- Transformación de bacterias XL1- Blue

La transformación se realizó por electroporación de bacterias *E.coli* de la cepa XL1-Blue electrocompetentes. Se utilizaron cubas de electroporación estériles previamente enfriadas, en donde se colocó 2 $\mu$ L de la reacción de ligación y 20 $\mu$ L de bacterias electrocompetentes. En estas condiciones se realizó una descarga de 500V durante 8mseg en electroporador marca BTX modelo ECM 830. Las bacterias electroporadas se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37°C con agitación (220rpm) durante 1 hora.

- Selección de bacterias transformadas

Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactoside (X-Gal) 33 $\mu$ g/ $\mu$ L, Isopropyl  $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) 160 $\mu$ g/ml y Ampicilina. Se las incubó durante toda la noche a 37 °C. A las 24hrs se observaron colonias y se seleccionaron aquellas que habían incorporado el inserto (blancas). Las colonias seleccionadas, se amplificaron en 4mL de medio de cultivo líquido LB-Ampicilina y se las incubó a 37°C durante 17hrs con agitación.

- Purificación de ADN plasmídico

A partir de cultivos en medio líquido de bacterias transformadas y seleccionadas se procedió a la purificación de ADN plasmídico utilizando el kit *NucleoSpin*® Plasmid (Ref. 740588.250, <https://www.mn-net.com>, USA). El ADN plasmídico purificado fue cuantificado a través de la medición de su absorbancia por espectrofotometría a 260nm y se evaluó su pureza determinado la relación de absorbancia 260nm/280nm.

- Digestión de plásmidos con enzimas de restricción y confirmación de secuencia por método de Sanger

Se verificó la presencia de inserto mediante digestión de los plásmidos purificados con la enzima *EcoRI* (Invitrogen, USA) según recomendaciones del proveedor. El análisis de dicha digestión se realizó mediante geles de agarosa, verificando la liberación del inserto del tamaño esperado: 644pb y 350pb y el secuenciado de inserto fue llevado a cabo en la Unidad e Biología Molecular del IPMont con los primers de secuenciado universal Sp6 y T7.

## CAPITULO 3: RESULTADOS

### 3.1: Caracterización clínico-inmunológica de los pacientes con IDCV

#### 3.1.1 Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”

En el periodo analizado de 44 pacientes con diagnóstico de posible IDCV se excluyeron 10 por no cumplir con los criterios diagnósticos para probable IDCV. El total de pacientes incluidos fue 34 pacientes; 18 niñas y 16 varones.

La media de la edad al inicio de los síntomas y del diagnóstico fue, 5.8 años y 11.1 años, respectivamente. Las manifestaciones clínicas al momento del inicio de la enfermedad más frecuentes fueron las infecciones, éstas ocurrieron en 31 pacientes: infecciones respiratorias bajas en 21, infecciones respiratorias altas en 6, y otras 4. Tres pacientes debutaron con manifestaciones no infecciosas. En la Tabla 4 se describen las manifestaciones clínicas al momento del debut.

La media de seguimiento fue 10 años.

**Tabla 4.** Manifestaciones clínicas al debut en 34 pacientes IDCV, del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”

<b>Infecciones</b>	<b>Nº de pacientes</b>
Infección respiratoria baja	21
Infección respiratoria alta	6
Meningitis	1
Sepsis	1
Varicela Necrotizante	1
Diarrea	1
<b>No Infecciosas</b>	
Enfermedad inflamatoria intestinal	1
Trombocitopenia autoinmune	1
Linfoproliferación	1

En relación a la patología infecciosa previo al diagnóstico y en la evolución, las infecciones respiratorias altas se observaron en la mayoría de los pacientes (n=26), sinusitis (n=21) y otitis media aguda (n=14). Presentaron bronquitis catarral no autolimitada 29 pacientes. Neumonía 31, registrada como consolidante típica en la mayoría de los casos. De los cuales 5 pacientes presentaron derrame pleural y 2 empiema paraneumónico. En un caso se destaca la evolución aguda grave con shock séptico y el ingreso a cuidados intensivos.

En la tabla 5 se presenta el detalle de las infecciones en la serie de casos del Hospital Garrahan.

**Tabla 5.** Prevalencia de infecciones al diagnóstico y seguimiento de pacientes IDCV del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”

<b>Infecciones</b>	<b>Nº de pacientes</b>
Otitis media aguda	14
Sinusitis	21
Bronquitis	29
Neumonía	31
Gastroenterocolitis	18
Meningitis	4
Sepsis	5
Infección de piel y partes blandas	7
Artritis séptica	1

Dentro de las infecciones de piel y partes blandas se presentaron con abscesos 3, celulitis 3 y paciente ambas.

Luego de iniciado el tratamiento con gammaglobulina intravenosa presentaron neumonía 12 de 34 pacientes. Ninguno de los pacientes con sinusitis crónica (n=9) mostró resolución de esta infección luego iniciado el tratamiento sustitutivo.

En 21 casos no fue posible identificar el agente causal de la infección respiratoria baja debido a falta de búsqueda etiológica o de registro en la historia clínica. En 12 pacientes se obtuvo registro de los aislamientos en muestras de secreciones respiratorias obtenidas por LBA o esputo, con cultivos positivos a *Haemophilus influenzae* 3, *Streptococcus pneumoniae* 3 y *Moraxella catarrhalis* 2.

Se identificaron agentes inusuales u oportunistas en muestras obtenidas por LBA en tres pacientes con neumonía: *Mycobacterium tuberculosis* 1, *Fusarium sp* 1, *Pneumocystis jirovecii* 1. Este último paciente se encontraba bajo tratamiento inmunosupresor por plaquetopenia inmune.

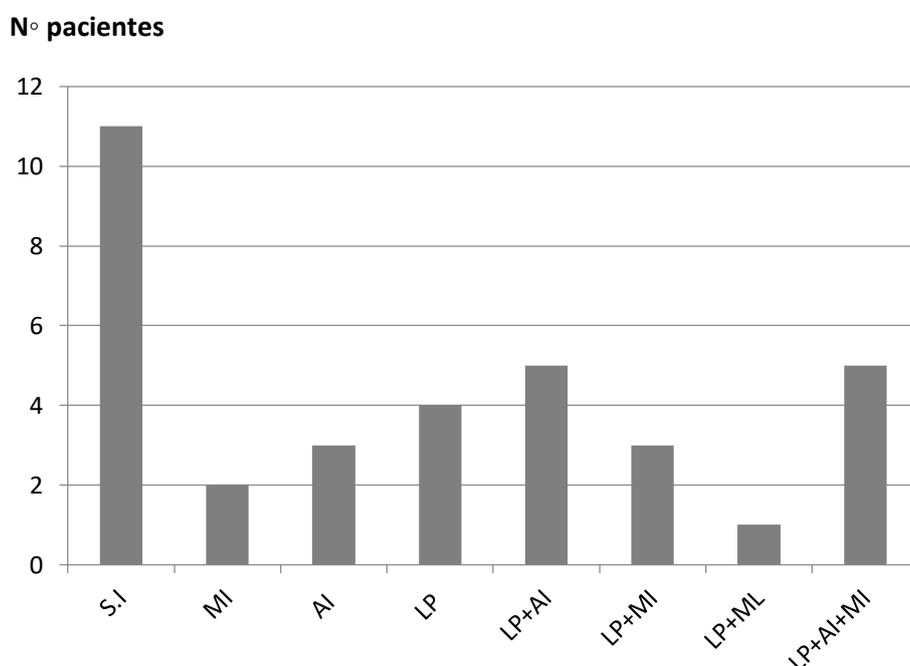
Las infecciones gastrointestinales se observaron en 18 de los 34 pacientes, la mitad evolucionaron a la cronicidad, asociada a infección por *Giardia lamblia* en 7, *Cryptosporidium sp* 1, *Microsporidium sp* 1 y *Campylobacter coli* 1.

Presentaron enfermedades bacterianas invasivas 9 pacientes: meningitis 4 y sepsis 5 pacientes. En tres de los cuatro pacientes con meningitis la infección ocurrió previo al diagnóstico. En dos de ellos la investigación microbiológica (bacteriológica y virológica) fue negativa. En uno se aisló *Cryptococcus*, y el otro presentó una meningoencefalitis subaguda por *Enterovirus* en la evolución, bajo tratamiento con gammaglobulina.

En dos de los cinco pacientes con sepsis se aisló microorganismo: *Pseudomona sp* en uno y *Streptococcus pneumoniae* en el otro. Sólo un paciente presentó sepsis luego de iniciado el tratamiento con gammaglobulina.

Presentaron infección de piel y partes blandas 7 pacientes y artritis por *Pseudomona aeruginosa* uno.

Al analizar los posibles fenotipos clínicos de los pacientes con IDCV asistidos en el Hospital Garrahan, presentaron solo manifestaciones infecciosas 11 pacientes e infecciones asociadas a una o más manifestaciones por desregulación 23 (67%); como se puede observar en la Figura 4.



**Figura 4.** Fenotipo clínico de 34 pacientes con IDCV, asistidos en el Hospital de Pediatría “ Prof. Dr. Juan P. Garrahan ”. S.I: solo infecciones; MI: manifestaciones inflamatorias; AI: autoinmunidad; LP: linfoprolimeración; ML: malignidad.

En la tabla 6 se detalla el tipo de manifestaciones no infecciosas que presentaron los pacientes. En el caso de las manifestaciones inflamatorias como neumonitis intersticial linfóide (NIL) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el diagnóstico se confirmó por anatomía patológica.

La enfermedad pulmonar con bronquiectasias se observó en 20 de 34 pacientes.

**Tabla 6.** Prevalencia de manifestaciones no infecciosas en pacientes IDCV del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”. n=34

<b>Manifestaciones no infecciosas</b>	<b>Nº de pacientes</b>
<b><u>Autoinmunidad</u></b>	
Citopenias hemáticas	9
Vitiligo	2
Hepatitis	2
<b><u>Inflamación</u></b>	
Neumonitis intersticial linfoide	4
Enfermedad inflamatoria intestinal	2
Artritis	2
Granulomas	1
Hepatitis granulomatosa	1
<b><u>Linfoproliferación</u></b>	
Esplenomegalia	16
Linfadenopatías persistentes	8
<b><u>Malignidad</u></b>	
Linfoma no Hodgkin tipo B	1

En relación al fenotipo inmunológico al momento del diagnóstico: el 100% (n=34) se presentaron con valores de IgG  $\leq$  2DS para la edad (hipogammablobulinemia); 29 con IgA descendida ( $\leq$  10mg/dl); 25 con IgM normal o alta ( $\pm$  2 DS) y 19 descendida ( $<$  2DS). Se observó linfopenia (valor absoluto  $\leq$  P5) en 20, y linfocitos B  $\leq$  2% 3 pacientes (2 de ellos con valor menor al 1%).

Los estudios complementarios para la **exclusión de otras IDP con fenotipo clínico-inmunológico similar a la IDCV** se realizaron en 10 pacientes. Defectos en la molécula CD40 por citometría de flujo en 5 casos y secuenciación en 1; CD40L por citometría en 2 y secuenciación en 1. Deficiencias en AID, UNG por secuenciación en 4 y 2 casos respectivamente.

Se excluyó deficiencia en FOXP3 por citometría con marcación de LT reguladores en un caso. Deficiencia en SAP por citometría en un caso y por secuenciación en otro. Deficiencia de BTK por secuenciación en 1. Deficiencia en ADA 2 y PNP 1, mediante el estudio de la actividad enzimática. La población B memoria (CD19+ CD27+) fue evaluada en 21 pacientes, de los cuales 14 presentaron *switch*  $\leq$  2% (smB<sup>-</sup>) según la clasificación del *EURO class trial*. En la tabla 7 se muestran las características clínicas asociadas.

**Tabla 7.** Fenotipo clínico de 14 pacientes con IDCV y smB- del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan ”

<b>Características clínicas</b>	<b>Nº de pacientes</b>
Esplenomegalia + NIL	1
Esplenomegalia + NIL + citopenias	1
Esplenomegalia + Citopenias	4
Esplenomegalia + Granulomas	2
Sin complicaciones	6

Se realizó el análisis molecular para búsqueda mutaciones en el gen TNFRSF13B (TACI) en 20 de 34 pacientes: 11 presentaron la mutación heterocigota para TACI (S231R). Todos estos pacientes presentaron esplenomegalia y citopenias hemáticas.

En relación al tratamiento, todos los pacientes recibieron terapia supletoria con inmunoglobulina intravenosa y 31 quimioprofilaxis antibiótica. Recibieron tratamiento con inmunosupresores 7 pacientes, biológicos 1 y quimioterapia 1. En la evolución fallecieron 2 pacientes por infecciones graves, uno de ellos por tiflitis en el curso de tratamiento inmunosupresor por PTI; y otro por sepsis con síndrome de activación macrofágica.

### **3.1.2 Hospital de Pediatría, Centro Hospitalario Pereira Rossell (HP-CHPR)**

En el período de estudio fueron derivados al equipo de inmunología 5 pacientes con probable IDCV, 4 de sexo masculino y 1 femenino. La primera manifestación clínica fue neumonía en tres de ellos, artritis idiopática juvenil (AIJ) 1 y linfoma no Hodgkin tipo B 1. La media de la edad al inicio de los síntomas y del diagnóstico fue 5.3 años y 9.5 años, respectivamente.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las infecciones, en la tabla 8 se muestran cuales se presentaron en los pacientes con probable IDCV, asistidos en el HP-CHPR, y los aislamientos microbiológicos obtenidos.

**Tabla 8.** Prevalencia de infecciones al diagnóstico y seguimiento de 5 niños con probable IDCV del HP-CHPR

<b>Manifestaciones infecciosas</b>	<b>Nº de pacientes</b>
<b>Otitis media aguda</b>	3
<b>Sinusitis crónica</b>	1
<b>Neumonía y bronquitis</b>	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	2
<b>Gastroenteritis</b>	4
<i>Giardia lamblia</i>	4
<i>Microsporidium</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i>	1
<b>Gastritis</b>	2
<i>Helicobacter pylori</i>	2
<b>Herpes labial recurrente</b>	3

La enfermedad pulmonar crónica con bronquiectasias se presentó en 4 de 5 pacientes, al momento del diagnóstico.

En relación a las manifestaciones no infecciosas, el compromiso gastroenterológico se presentó en 2: enteropatía simil-enfermedad celíaca (Marsh 2) y gastritis crónica con identificación de *Helicobacter pylori* por métodos directos en ambos, asociadas a enfermedad inflamatoria intestinal en uno de ellos. Estos 2 pacientes presentaban hiperplasia nodular linfoide en la lámina propia del tubo digestivo.

Otras manifestaciones no infecciosas observadas se describen, en la tabla 9, junto al perfil de LB de cada paciente. Al momento del diagnóstico el 100% (n=5) se presentaron con valores de IgG  $\leq$  2DS para la edad (hipogammablobulinemia), IgM normal o alta ( $\pm$  2 DS) 2 y descendida ( $<$  2DS) 1. Se observó linfopenia (valor absoluto  $\leq$  P5) en 2 y no se observó linfopenia B  $\leq$  2% en ningún paciente. La población B memoria (CD19+ CD27+) fue evaluada en los 5 pacientes, y en 4 casos se observó la población B con CI  $\leq$  2% (smB<sup>-</sup>).

**Tabla 9. Características clínicas e inmunológicas de 5 niños con probable IDCV del HP-CHPR**

Nº de paciente	Edad al debut (años)	Immunoglobulinas	smBcells	LB	Manifestaciones no infecciosas	Infecciones	Seguimiento (años, meses)
		IgG / IgA / IgM (mg/dL)	(%)	(%)			
<b>IDCV1</b>	6.8	200 / <6 / <6	2	12	No	Sí	5,11
<b>IDCV2</b>	6.2	227 / <2 / 26	0.2	24	Enteropatía, AIJ, Tiroiditis.	Sí	5, 10
<b>IDCV3</b>	4.3	530 / <6 / 37	0.9	5	Dermatitis, asma.	Sí	1.10
<b>IDCV4</b>	3.3	378 / <6 / 76	0.3	9	Enteropatía, EII, esplenomegalia	Sí	1,5
<b>IDCV5</b>	2.2	240 / <6 / 158	7	8	Linfoma no Hodgkin tipo B	Sí	11,4

Valores de referencia LB (IC: P5-P95): 12-22%; smBcells (IC: P5-P95): 7-21%. Inmunoglobulinas ( $\pm 2$ DS para la edad): IgG (650-1590mg/dL), IgA (11-251mg/dL), IgM (13-145mg/dL). IDCV: inmunodeficiencia común variable; LB: linfocitos B; smBcells: "switch memory B cells"; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; AIJ: artritis idiopática juvenil.

Se realizaron estudios complementarios para la exclusión de otras IDP con fenotipo clínico-inmunológico similar a la IDCV en un paciente (expresión de CD40L, CD40, NKT y secuenciación de los genes *AICD*, *UNG* y *SH2D1A*).

Todos los pacientes (n=5) recibieron gammaglobulina supletoria cada 28 días por vía intravenosa, profilaxis con azitromicina trisemanal 5, y fisioterapia respiratoria de forma irregular 2 de los 5 pacientes. 1 paciente recibió biológicos (rituximab) por linfoma no Hodgkin tipo B y 1 corticoides por AIJ sistémica al debut.

La media de seguimiento fue 4.8 años con un mínimo de 1.5 años y un máximo de 11.04 años. Durante este período no hubo fallecimientos; 3 pacientes requirieron internación, 2 por neumonía y 1 por infección gastrointestinal por múltiples parásitos (*Microsporidium*, *Blastocystis homini* y *Giardia lamblia*) con desnutrición aguda. La infección por *Giardia lamblia*, evolucionó a la cronicidad en 2 de 3 casos.

En relación a las complicaciones no infecciosas en la evolución, 1 paciente (IDCV4) presentó internación por anasarca con hipoalbuminemia secundaria a descompensación de su enteropatía con pérdida de proteínas en materia fecal. En la evolución se pierde contacto con el paciente, razón por la cual no pudo incluirse en el estudio molecular para FT.

Las complicaciones inflamatorias (gastritis y colitis) se diagnosticaron en la evolución; sin embargo la autoinmunidad no tuvo otros episodios de clínicamente ostensibles.

Dado el fenotipo clínico del paciente n°5 (IDCV5) con debut con patología tumoral, y la dificultad de excluir otros defectos moleculares referidos a IDP con fenotipo "IDCV simil", se decidió excluir el paciente del análisis molecular para la expresión de FT (etapa 3, diseño experimental, capítulo 3).

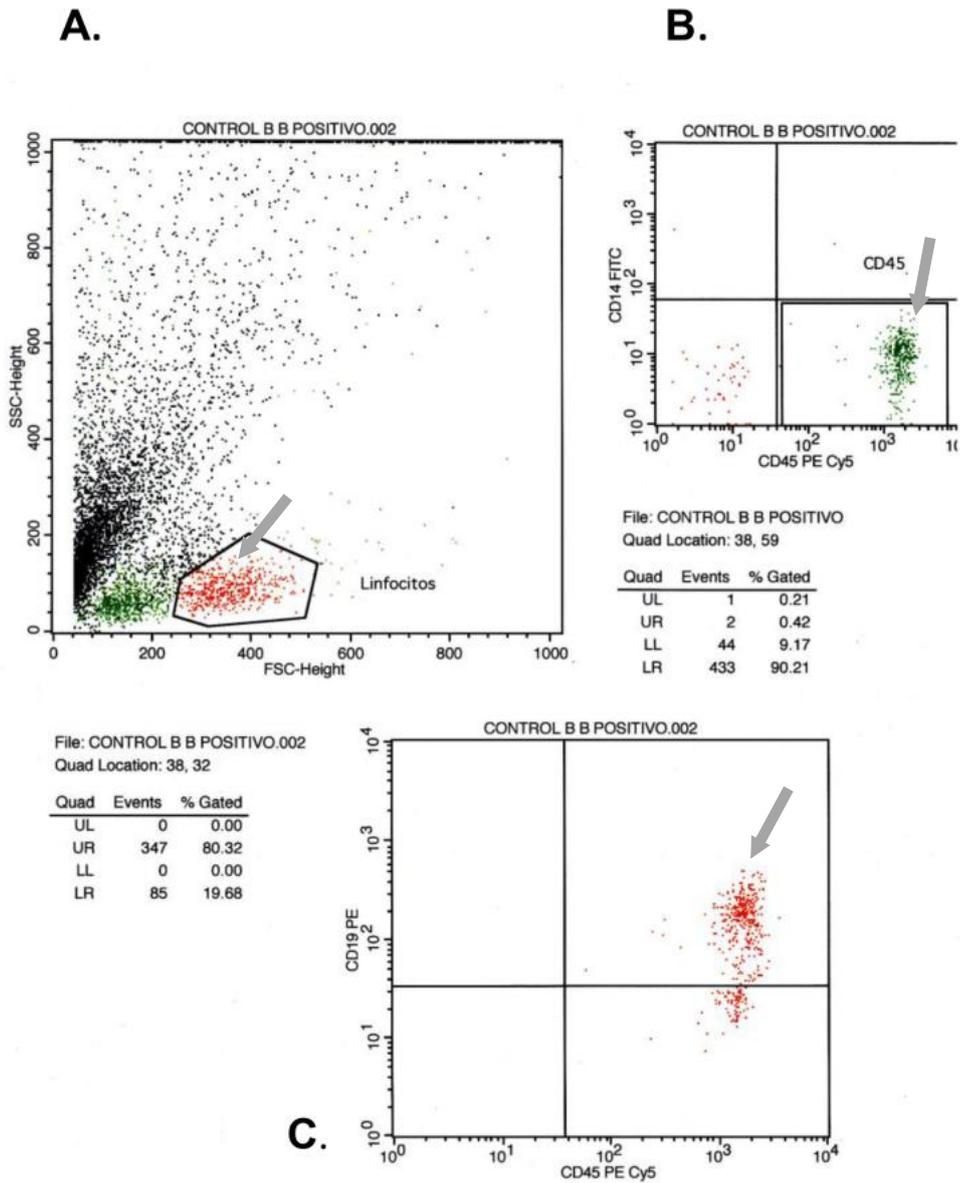
## **3.2 Análisis de la expresión molecular de los FT en células B de niños con IDCV del HP-CHPR**

### **3.2.1 Purificación de LB (CD19+) a partir de PBMC y evaluación de la pureza**

Una vez realizada la purificación de LB a partir PBMC, se procedió a realizar su control determinando su pureza, por citometría de flujo, a través del marcado de las células con anticuerpos monoclonales anti-CD19-PE Cy5, anti-CD45-PE Cys y anti-CD14-FITC (figura 5).

En el gráfico **A** de la figura 5, se muestran el análisis por citometría de flujo ( "Forward and Side Scatter"), evaluando la granularidad o complejidad celular (eje X) y el tamaño celular (eje Y). De acuerdo a estos índices se muestra un *gate* en la zona correspondiente a los linfocitos totales. A partir de la población seleccionada en el *gate*, realizamos el primer control de pureza, excluyendo a los monocitos (CD14+) del total de células CD45+ (monoclonal panleucocitario) y esta población se correspondió con el 90.21% de la muestra analizada como se observa el gráfico **B** de la figura 5. Luego determinamos la pureza de células B sobre el total de linfocitos seleccionados (CD45+ CD14-), para lo cual utilizamos el monoclonal anti-CD19RPE mencionado anteriormente.

Como se muestra en el gráfico **C de manera representativa**, la pureza de las células B en la mayoría de los casos fue mayor del 80%.

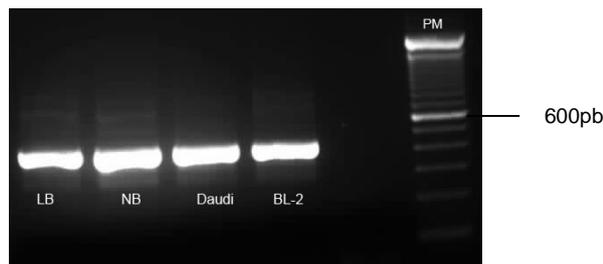


**Figura 5.** Análisis de la pureza de los linfocitos B (LB) por citometría de flujo. **A:** selección del *gate* de linfocitos totales por granularidad y tamaño; **B:** pureza de linfocitos totales (CD45+ CD14-); **C:** pureza de LB del total de linfocitos (CD19+ CD45-). CD, cluster of differentiation; UL, up left, UR, up right, LL, low left; LR, low right.

### 3.2.2 Puesta a punto de la amplificación de los distintos FT

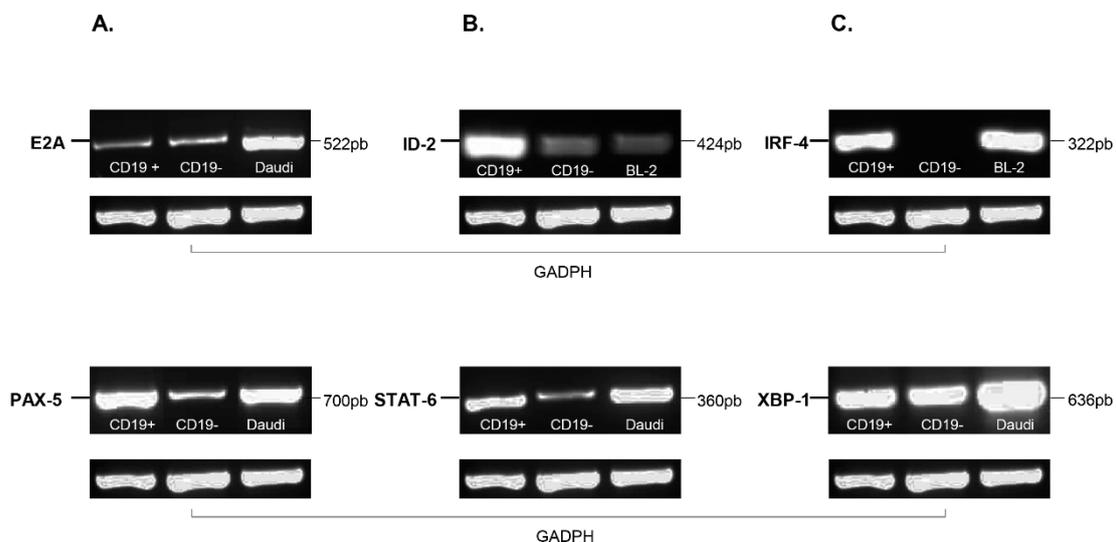
Para realizar la puesta a punto de los distintos factores de transcripción (FT) se procedió a aislar el ARNm y generar el ADNc de las líneas celulares Daudi y BL2 y de un pool de donantes sanos (control) de linfocitos B (CD19+) y no B (CD19-); para luego con este material poder poner a punto la amplificación por PCR para cada FT.

En un primer paso realizamos la verificación de la integridad del ADNc obtenido; mediante la amplificación de un gen constitutivo como la "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase" (GAPDH). Los resultados se muestran en la figura 6.



**Figura 6. Control de amplificación del transcripto constitutivo de la GAPDH** en LB (CD19+) y NB (CD19-) en las líneas celulares: Daudi, BL-2; y controles. Gel de agarosa al 1%. PM: 100pb.

Una vez confirmada la amplificación del transcripto de GAPDH procedimos a realizar la **puesta a punto** de las PCR semicuantitativas, correspondientes a los genes *PAX-5*; *E2A*; *ID-2*; *STAT6*; *IRF-4* y *XBP-1* (Figura 7). Ajustando los puntos críticos para las PCR de cada FT: temperatura de *annealing*, titulación de la concentración de MgCl<sub>2</sub> y número de ciclos.



**Figura 7. Amplificación de los factores de transcripción** en LB (CD19+), y no B (CD19-) de controles; y en líneas celulares (BL-2, Daudi). A: E2A y PAX 5; B: ID-2 y STAT-6; C: IRF-4 y XBP-1. Gel de agarosa al 1 %. PM 100pb.

Se optó por la línea celular Daudi para la puesta a punto de todos los FT, con excepción de los transcritos ID-2 e IRF-4 que se optó por realizar la amplificación en la línea BL-2. Esta selección se basó en la experiencia previa en el laboratorio de ejecución de la tesis (Unidad de proteínas recombinantes, Instituto Pasteur de Montevideo) en relación a la amplificación de estos genes.

Como se observa en la **figura 7**, se obtuvieron amplicones acordes al tamaño molecular esperado para cada uno de ellos. Los FT analizados mostraron un patrón de expresión diferencial entre las células B y las células no B. Una mayor amplificación fue encontrada en los LB para la mayoría de los casos; siendo más clara la expresión de los FT PAX-5 e IRF-4 en la célula B. Dado que la PCR es una técnica muy sensible y nuestras muestras mantienen un 80-90% de pureza, la amplificación de los FT en las células no B podría estar sesgada por algo de contaminación residual por parte de las células B, lo cual es técnicamente muy difícil de excluir.

Sin embargo los resultados de esta puesta a punto muestran que somos capaces de amplificar el producto de interés y de manera semicuantitativa poder evaluar si hay diferencias en la expresión del ARNm de alguno de los FT estudiados. Por ejemplo la diferencia de expresión semicuantitativa, observada para el gen *E2A* del control en relación a la línea celular Daudi, parecería ser consecuencia de una mayor expresión de este transcrito en la línea celular Daudi ya que como se puede observar en la figura 7 con cantidades similares de amplificación del transcrito GAPDH en todas las muestras obtenemos diferencias significativas en la expresión de los diferentes FT estudiados.

Una vez realizada la puesta a punto, se procedió a evaluar la expresión de los FT en los pacientes de la tabla 9, mediante PCR semicuantitativa aplicando el programa 2 detallado en Materiales y Métodos.

### **3.2.3 Expresión de los FT *E2A* y *PAX-5***

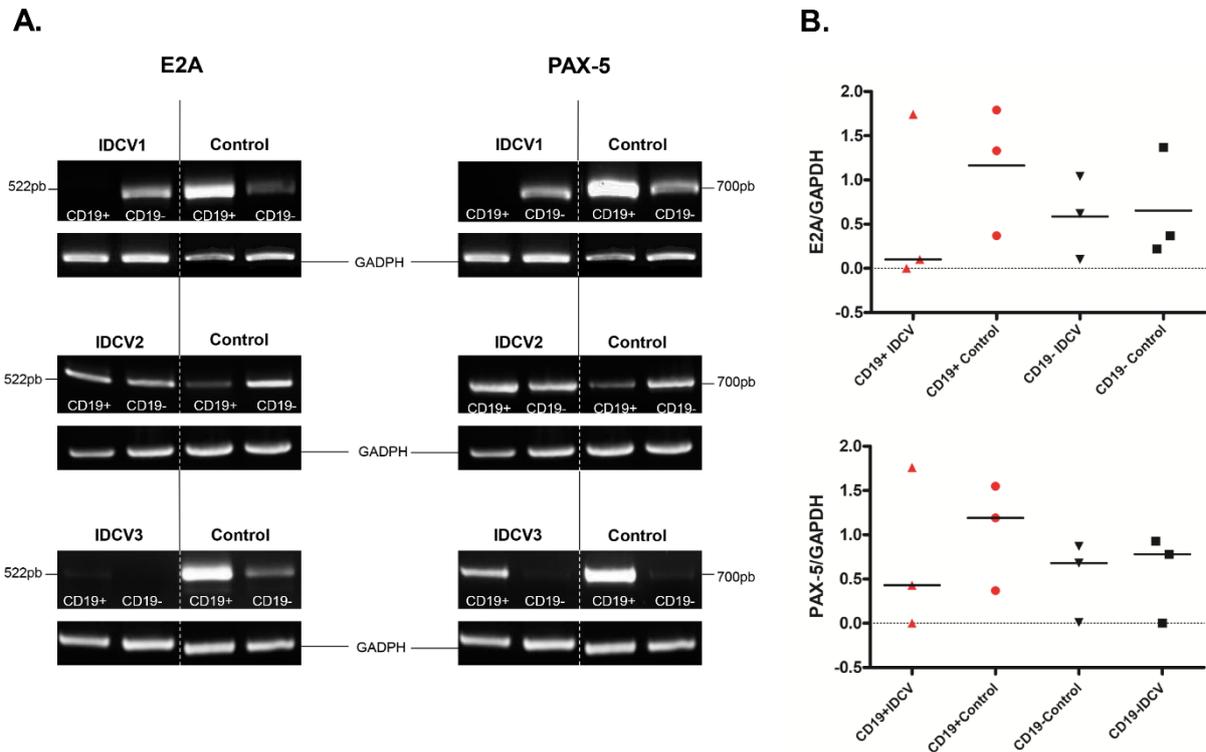
Dado que durante la ontogenia temprana del linfocito B, la expresión del gen *PAX-5* se encuentra río abajo de *E2A*; y su expresión es activada por este FT, decidimos analizar en conjunto su expresión para poder extraer conclusiones de posibles afecciones en el desarrollo del LB en esta vía de activación en los pacientes con IDCV.

La evaluación de estos FT fue llevada a cabo en los pacientes 1, 2 y 3 referidos en la tabla 9. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 8**.

En donde podemos observar diferencias en el perfil de expresión de los genes *E2A* y *PAX-5* en relación a los controles. Para el caso del paciente IDCV1 se observa ausencia de expresión de *E2A* y *PAX-5* en LB del paciente, en comparación a las células B del control en donde pueden observarse claramente ambos FT. Esta ausencia de expresión en *E2A* y *PAX-5* es restringida al LB ya que si observamos su expresión en las células no B de los pacientes al igual que en el control NB.

Por su parte el paciente IDCV2 muestra una expresión similar a la de los controles sanos a nivel de ARNm tanto del FT *E2A* como del FT *PAX-5*.

Para el caso del paciente IDCV3 y al igual que para el paciente IDCV1 no se observa expresión del FT E2A en LB ni tampoco en la población NB, en comparación a sus respectivos controles. Sin embargo y a diferencia de lo observado en el paciente IDCV1 se obtiene un transcrito de PAX-5 acorde al peso esperado en LB aunque con una menor expresión en relación al LB del control.

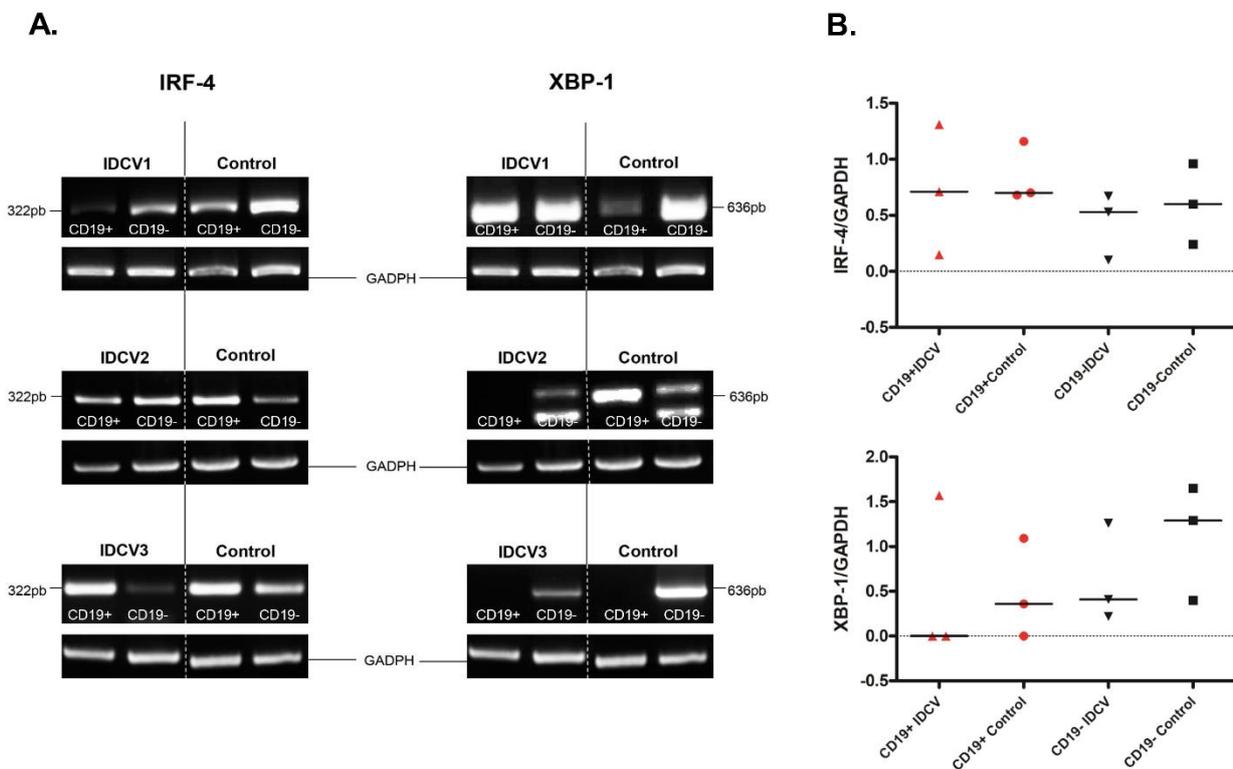


**Figura 8. Perfil de expresión de los factores de transcripción E2A y PAX-5 de 3 pacientes IDCV asistidos en el HP- CHPR (tabla 6). A:** PCR semicuantitativa; ADNc para GADPH utilizada como control. **B:** Cuantificación de la PCR y análisis de los datos. IDCV: inmunodeficiencia común variable.

### 3.2.4 Expresión de los FT IRF-4 y XBP-1

Posteriormente procedimos a evaluar también, dos factores implicados en etapas tardías del desarrollo del LB: IRF-4 y XBP-1. Este último FT es regulado por IRF-4 durante la activación del LB T-dependiente, promoviendo así la diferenciación a células plasmáticas.

La evaluación de estos FT fue llevada a cabo en los pacientes 1, 2 y 3 referidos en la tabla 9. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9**.



**Figura 9. Perfil de expresión de los factores de transcripción IRF-4 y XBP-1 de 3 pacientes IDCV asistidos en el HP- CHPR (tabla 6). A:** PCR semicuantitativa; ADNc para GADPH utilizada como control. **B:** Cuantificación de la PCR y análisis de los datos. IDCV: inmunodeficiencia común variable.

A partir de los resultados que se muestran en la figura 9, se desprenden las siguientes observaciones:

En relación al gen *IRF-4*, no se observan grandes diferencias en el perfil de expresión de los pacientes, cuando se los compara con los controles. Si bien se observa una menor expresión en las células B del paciente IDCV1, en comparación a su control; en los LB de los casos IDCV2 e IDCV3 se muestra una expresión normal de *IRF-4*, en relación a sus controles.

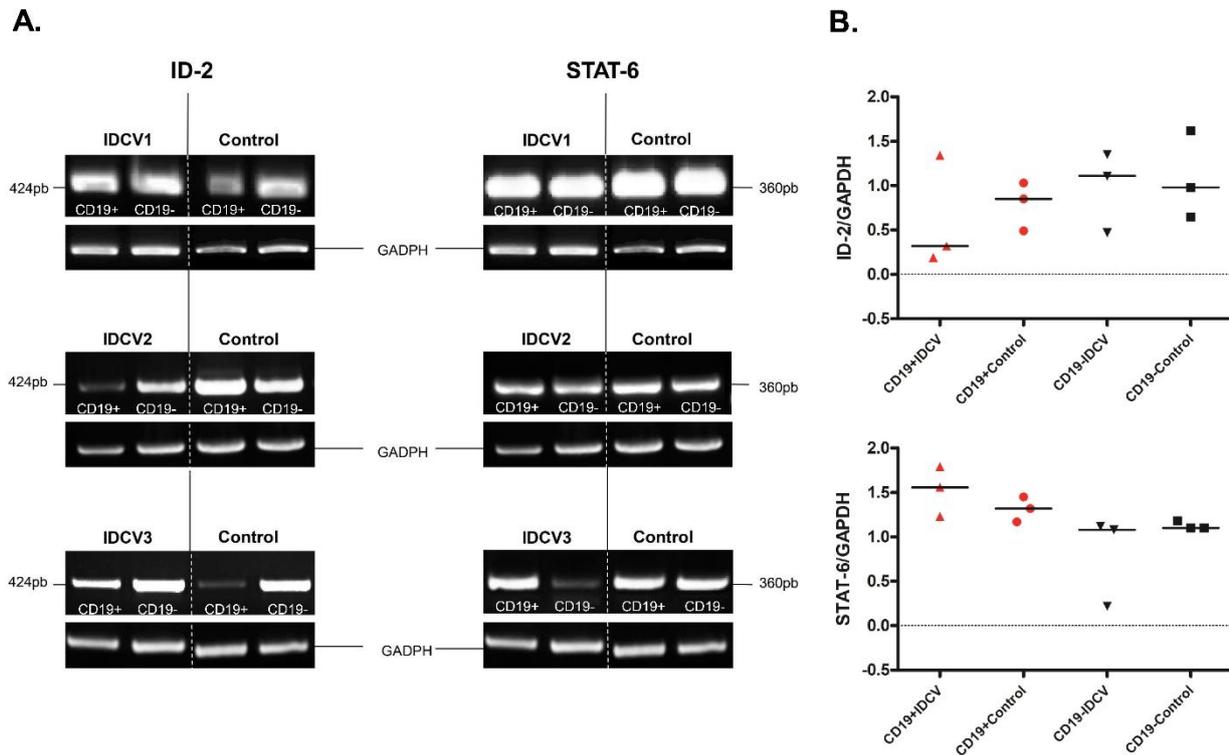
En el caso del factor XBP-1, podemos observar diferencias en el perfil de expresión de los pacientes IDCV, en comparación a sus controles. Como se muestra en la figura 9, en los casos IDCV2 e IDCV3 se observa una ausencia expresión de *XBP-1* en las células B, y una expresión normal en LB de IDCV1.

En la PCR del paciente 2 y su control, se observan dos amplicones de diferente peso molecular, uno de ellos acorde al peso esperado (636pb) y otro de menor peso molecular a lo esperado para el FT XBP-1. Esto requirió el análisis de identidad del *amplicon XBP-1* expresado en las células B control; mediante la técnica clonado y secuenciación directa. Confirmando así la identidad correcta de la banda de mayor peso molecular en LB del control, y se valida así la ausencia de expresión de XBP-1 en los LB del paciente IDCV2, como se puede observar en la figura 9.

### 3.2.5 Expresión de los FT *ID-2* y *STAT-6*

Posteriormente se procedió a realizar la amplificación del gen *ID-2*; con el interés de analizar defectos en la expresión de este FT; dado el rol regulador negativo en la diferenciación a célula B, al inhibir la unión del FT PAX-5 al ADN.

La evaluación de estos FT fue llevada a cabo en los pacientes 1, 2 y 3 referidos en la tabla 9. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 10**.



**Figura 10. Perfil de expresión de los factores de transcripción *ID-2* y *STAT-6* de 3 pacientes IDCV asistidos en el HP- CHPR (tabla 6). A:** PCR semicuantitativa; ADNc para *GADPH* utilizada como control. **B:** Cuantificación de la PCR y análisis de los datos. IDCV: inmunodeficiencia común variable.

A partir de los resultados que se muestran en la figura 10, se desprenden las siguientes observaciones:

En relación al FT *ID-2*, no se observan grandes diferencias en la expresión de este FT cuando se lo compara las subpoblaciones (CD19+ y CD19-) de los pacientes IDCV en relación a los controles sanos. Si bien en el paciente IDCV2 se puede observar una menor expresión de *ID-2* a nivel de LB cuando se la compara con su control.

Finalmente nos interesó analizar la expresión del gen *STAT-6*, en base a los reportes recientes que mostraron una afectación de la vía de IL-4/STAT-6 en la IDCV, en pacientes con complicaciones no infecciosas por desregulación. Además, como se mencionó en la introducción, es conocido el rol activador de este FT para la expresión de molécula AID y el FT IRF-4, ambos

requeridos para los procesos de maduración tardía del LB. En los resultados que se muestran en la figura 10, al igual que para ID-2, no parecen observarse diferencias significativas en la amplificación obtenida para las subpoblaciones B y no B de los tres pacientes analizados respecto a la expresión obtenida en los controles.

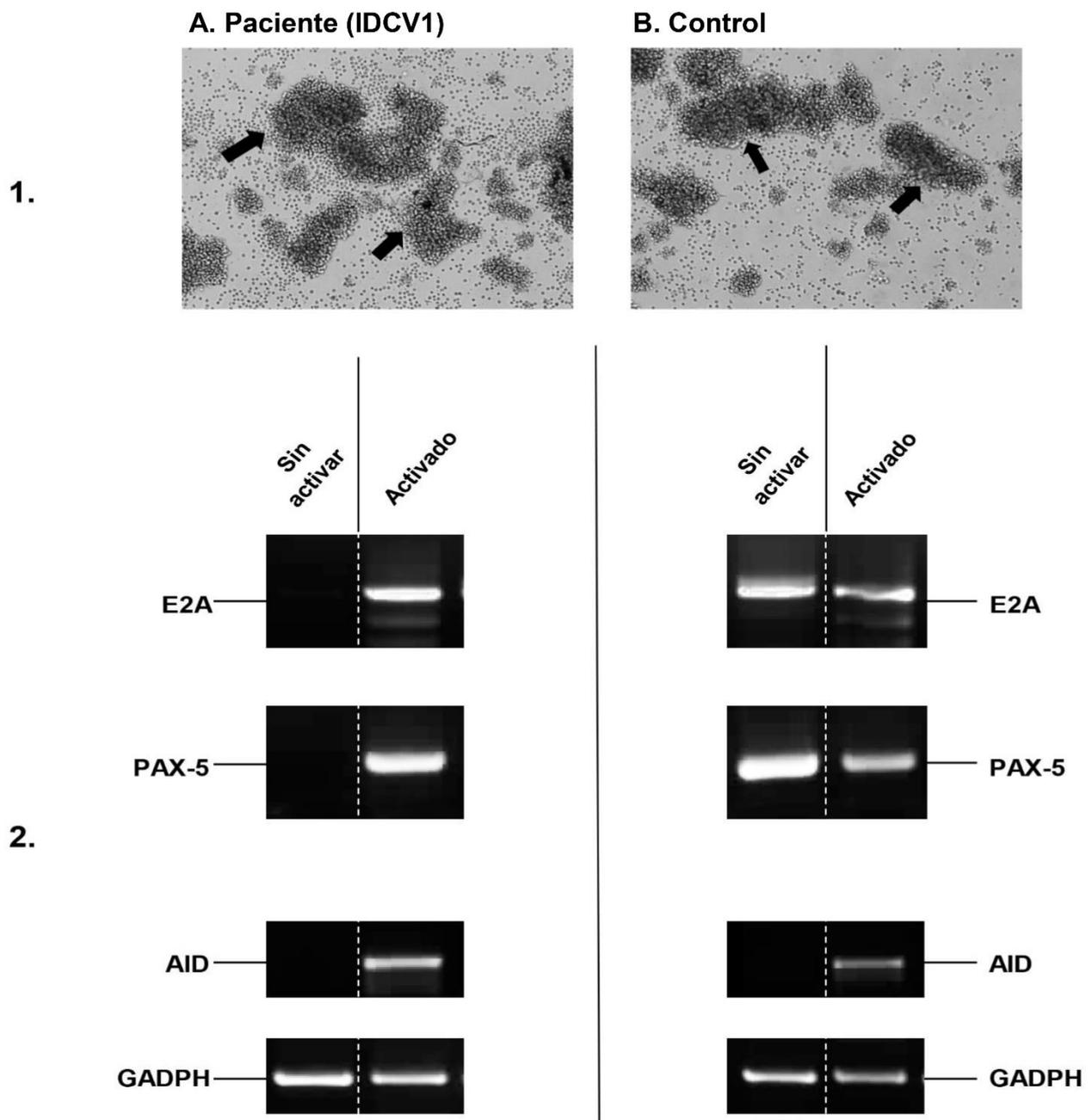
### **3.2.6 Expresión de E2A y PAX-5 en IDCV1, luego de la activación *in vitro* de las células B**

Como se mencionó en la introducción las células B son capaces de activarse mediante la interacción de la molécula CD40L con CD40, una proteína de superficie que se expresa de forma constitutiva en la membrana de los LB. Esta activación que ocurre en el CG una vez que se encuentra con el antígeno y el linfocito T y es incrementada con la producción de la IL-4 (155). Ambos ligandos, CD40L e IL-4 son responsables entonces de la transcripción de la molécula AID en el LB quien a su vez es regulada por los FT E2A y PAX-5, durante la dicha activación (156).

Teniendo esto en mente y de acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 8 en donde no se observa expresión del ARNm del paciente ICDV1 para los FT E2A y PAX-5, decidimos evaluar *in vitro* la capacidad de las células B de este paciente para expresar dichos genes. Para ello procedimos a activar con CD40L + IL-4 simulando el microambiente de activación del CG; y así poder comparar la expresión de estos FT con el control pre y post-activación. Los resultados se muestran en la figura 11.

En las imágenes de microscopia, tanto las células del control como del paciente muestran cambios relevantes luego de la activación con CD40L+IL4. Los resultados muestran *clusters* de activación generados por la acumulación de LB fácilmente diferenciables luego de 4 días de cultivo. Figura 11 (cuadrante superior).

Los resultados obtenidos del experimento graficado en la figura 11 (cuadrante inferior) muestran que la activación con CD40L/IL-4 funcionó y logra expresar la enzima AID a nivel de ARNm. También puede observarse la expresión a nivel de ARNm de los genes *E2A* y *PAX-5*, demostrando que las células del paciente ICDV1 son capaces de transcribir estos FT así como la enzima AID.



**Figura 11.** Perfil de expresión de los transcritos E2A, PAX-5 y AID en células B de IDCV1 y el control, luego de la activación *in vitro* con CD40L + IL-4. (1): Cultivo de las células B 72hs post-activación en IDCV1 (1.A) y control (1.B). (2): PCR semicuantitativa pre y post-activación en IDCV1 (2.A) y control (2.B). ADNc para GADPH utilizada como control.

### 3.3 Perfil clínico y molecular en los pacientes con IDCV asistidos en HP-CHPR

Por último y de forma posterior al análisis del perfil de expresión de los FT, nos interesó describir las características clínicas principales de los pacientes con IDCV en relación a su perfil molecular en LB para los genes *E2A*, *PAX-5*, *IRF-4*, *XBP-1*, *ID-2* y *STAT-6*.

Los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Perfil de expresión de los factores de transcripción *E2A*, *PAX-5*, *IRF-4*, *XBP-1*, *ID-2*, *STAT-6* y características clínicas de 3 pacientes IDCV asistidos en el HP-CHPR.

Características	Pacientes		
	IDCV1	IDCV2	IDCV3
<b>Edad del debut (años)</b>	6.8	6.2	4.3
<b>Manifestaciones infecciosas</b>	+	+	+
<b>Manifestaciones no infecciosas</b>	-	AIJ, tiroiditis, enteropatía	Dermatitis, asma
<b>Expresión de los FT</b>			
<i>E2A/PAX-5</i>	-/-	+/+	-/baja
<i>IRF-4/XBP-1</i>	baja/+	+/-	+/-
<i>ID-2/STAT-6</i>	+/+	baja/+	+/+

+(presencia); - (ausencia). *E2A*, *e-box transcription factor*; *PAX-5*, *paired box family 5*; *IRF-4*, *interferon-regulatory factor 4*; *XBP-1*, *x-box-binding protein 1*; *ID-2*, *inhibidor of DNA binding-2*; *STAT-6*, *signal transducer and activator of transcription 6*; IDCV, inmunodeficiencia común variable; AIJ, artritis idiopática juvenil.

En esta tabla podemos observar que para el caso del paciente IDCV2 con ausencia de expresión de *XBP-1*, se describe un perfil clínico con autoinmunidad además de infecciones. Estos hallazgos difieren con lo reportado por Kuribayashi J. y col. en el año 2008; en el cual se describen las infecciones como una única manifestación clínica asociada a defectos en la expresión de *XBP-1* en la enfermedad IDCV (141).

## DISCUSIÓN

Las IDP son consideradas dentro del grupo de las “enfermedades raras”. Sin embargo, en los últimos diez años, numerosos reportes a nivel internacional señalan que su frecuencia es mayor a la estimada en el pasado (157). En Uruguay no se cuenta con un registro nacional de estas patologías.

La IDCV es la IDP sintomática más frecuente en la infancia y en la edad adulta (62). Se trata de un grupo heterogéneo de condiciones clínicas, caracterizado por una falla en la producción de anticuerpos frente a patógenos, cuya característica principal es la mayor susceptibilidad a presentar infecciones recurrentes o crónicas.

En los últimos años con la implementación de la gammaglobulina sustitutiva y las terapias antimicrobianas, se ha reducido de forma significativa la morbimortalidad de causa infecciosa. Sin embargo y a pesar de esta aparente mejoría clínica, existe un incremento de manifestaciones no infecciosas secundarias a la desregulación inmune que pueden asociar los pacientes con IDCV. De ahí la necesidad de agruparlos según el fenotipo clínico, con el objetivo de establecer tratamientos y posibles pronósticos. Por otra parte, esta agrupación permitió entender más la enfermedad y su inmunopatogenia (7).

La pérdida de función de las células B constituye el defecto inmune principal de esta enfermedad. Esto se debe a un defecto intrínseco del LB y/o a una cooperación insuficiente de otras células (LT, células dendríticas, etc) durante las etapas de maduración tardía. Por lo que no logra completar de forma satisfactoria los procesos de CI, HS y la maduración a células plasmáticas. Sin embargo, existe un grupo menor de pacientes, cercano al 10%, que presentan alteraciones durante la maduración temprana y cursan con depleción importante de LB (9).

En relación a las bases moleculares de esta enfermedad y su patogenia, con excepción de algunas formas monogénicas, no se conoce el defecto genético en más del 90% de los pacientes con IDCV(158). Por lo cual, conocer y entender cuáles son las moléculas implicadas en las alteraciones inmunológicas descritas nos llevó a formular la pregunta principal de esta tesis de maestría: *¿es posible que existan diferencias o defectos en la expresión de algunos factores de transcripción responsables de la maduración del LB, como causa de la hipogammaglobulinemia en la IDCV?*

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue poder contribuir al conocimiento sobre aspectos básico-clínicos de la IDCV en la edad pediátrica. La discusión de nuestros resultados va estar dada en base a los objetivos específicos, planteados para intentar responder nuestra hipótesis de estudio.

## 1) Caracterizar el fenotipo inmunológico y clasificar los distintos síndromes clínicos que puede presentar la IDCV pediátrica en Uruguay y Argentina

La IDCV tiene un espectro de presentación clínica muy variado, desde casos que sólo se presentan con infecciones a situaciones donde las manifestaciones por desregulación predominan, afectando severamente la calidad de vida y el pronóstico (7).

El diagnóstico de probable IDCV se establece en aquellos pacientes que presentaron su primera manifestación clínica con una edad  $\geq 2$  años; y al momento del diagnóstico una edad  $\geq 4$  años (8). Las manifestaciones clínicas pueden ocurrir a cualquier edad. Sin embargo, se describen dos picos de incidencia, el primero entre los 5 a 10 años y el segundo de los 20 a 30 años. En la serie estudiada del Hospital Garrahan, la media de la edad al debut fue 5.8 años y al diagnóstico 11.1 años, similar a la observada en la pequeña serie del HP-CHPR, 5.3 y 9.5 años, respectivamente. Se observó un retraso diagnóstico en ambas series, algo superior a lo reportado en el último estudio multicéntrico de Gathmann y col., que observaron una media de 4.1 años. Se ha descrito que el retraso diagnóstico varía entre los diferentes países y es mayor en los pacientes que debutan antes de los 10 años de vida (33.7%) (61). Esto posiblemente está vinculado a que, si bien, las infecciones recurrentes son un signo de alarma para la sospecha de IDCV, en comparación con la población adulta las infecciones se presentan con mayor frecuencia en niños sin IDCV.

En relación al **fenotipo clínico** observado en este trabajo y teniendo en cuenta que las muestras no son comparables, las manifestaciones infecciosas fueron el hallazgo más frecuente en ambas casuísticas analizadas. Las infecciones respiratorias bajas constituyeron la infección más frecuente en ambas series; seguido de las infecciones respiratorias altas como la otitis media aguda recurrente y la sinusitis crónica. Además de las infecciones gastrointestinales persistentes o crónicas.

Al igual que lo reportado por Cunningham-Rundles y col. en el año 1999 y en series posteriores, la mayoría de los pacientes del Hospital Garrahan y todos los del HP-CHPR presentaron al menos un episodio de neumonía previo al diagnóstico (62, 63)

En un trabajo multicéntrico reportado en el año 2008, se señala que las infecciones que habitualmente sugieren IDCV al debut se corresponden con neumonía, meningitis o un aumento significativo de la gravedad o frecuencia de infecciones bacterianas del tracto respiratorio (7)

En este sentido, las enfermedades bacterianas invasivas como sepsis y/o meningitis, fueron un signo de alarma para la sospecha de IDCV en este trabajo. Las cuales se presentaron en una proporción importante en la serie del Hospital Garrahan.

En cuanto a la **microbiología** de las infecciones, los agentes habituales de la edad pediátrica fueron los más prevalentes como causa de las infecciones respiratorias bajas, entre los cuales se observaron *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarralis*. En ambas series, la parasitosis por *Giardia lamblia* fue el principal hallazgo en pacientes con infecciones gastrointestinales. De forma excepcional se aisló *Cryptosporidium sp* y *Microsporidium sp*.

En 2 de 5 pacientes con sepsis se identificó en el hemocultivo *Pseudomona sp* y *Streptococcus pneumoniae*, lo cual coincide con reportes previos referidos a la microbiología de infecciones invasivas en IDCV.

Se observaron de forma inhabitual, infecciones oportunistas (IO) graves en tres pacientes del Hospital Garrahan, con aislamiento de *Fusarium sp*, *Pneumocystis jirovecii* y *Cryptococcus*. Estas representan un signo de alarma para descartar inmunodeficiencias combinadas dado que en la IDCV las IO no son un hallazgo frecuente. Pudiendo corresponder en estos casos a pacientes con fenotipo IDCV similar, como las IDP causadas por deficiencias enzimáticas (ADA, PNP). Estas últimas deficiencias se excluyeron en dos pacientes.

En este sentido en el año 2009 *Malphettes y col.*, definen un subgrupo de niños y adultos con IDCV cuya característica principal fue la presencia de IO y/o un recuento de CD4 < 200 x 10<sup>6</sup> cells/L, con una disminución de la población de LT *naive* (60). En la serie del Hospital Garrahan la IO se presentó en pacientes con linfopenia CD4 pero con valores superiores a 500 x 10<sup>6</sup> cells/L.

Al igual que lo descrito en la bibliografía, el **compromiso gastrointestinal** infeccioso y no infeccioso, fue la segunda manifestación más frecuente en ambas series. Presentando diarrea crónica en muchos casos, principalmente de causa infecciosa, y en ocasiones acompañada de fallo nutricional y malabsorción.

Es así que *Quinti y col.* describen una prevalencia de diarrea crónica del 14% al momento del diagnóstico y 22.4% en el seguimiento, acompañado de malabsorción en 6.2 % y 8.1%, respectivamente (63).

En relación a la superposición de manifestaciones no infecciosas en la IDCV, a nivel gastrointestinal, destacamos que en la serie del Hospital Garrahan un paciente se presentó con síntomas gastrointestinales vinculados a EII además de la gastroenteritis infecciosa. Al igual que dos pacientes del HP-CHPR con enfermedad celíaca similar y giardiasis.

Dado que este tipo de complicación puede estar enmascarada o superpuesta con cuadros infecciosos, es importante la realización de estudios complementarios como la endoscopia digestiva y en especial en aquellos pacientes que cursan con malabsorción. En este sentido, *Quinti y col.* sugieren en un estudio multicéntrico, realizar estudio endoscópico alto cada 2 años en mayores de 18 años, dada la mayor prevalencia de gastritis crónica y enteropatía a partir de la segunda década de la vida (63). Estos estudios complementarios permiten distinguir la enfermedad celíaca clásica de la enteropatía AI de la IDCV, insensible a la exclusión de gluten, en base a algunos hallazgos característicos como la ausencia de células plasmáticas (72, 159).

La hepatomegalia leve con elevación persistente de las enzimas hepáticas, incluida la fosfatasa alcalina, es frecuente en la IDCV. La causa más frecuente de estas alteraciones, una vez descartada las causas infecciosas, se refiere a la hiperplasia nodular regenerativa (HNR) de curso benigno en la mayoría de los casos. Sin embargo en ocasiones puede evolucionar o presentarse al diagnóstico como una "hepatitis autoinmune similar", al igual que dos pacientes del Hospital Garrahan (8, 160).

Por otra parte, se observó elevada prevalencia de manifestaciones no infecciosas por **desregulación inmune** en la casuística del Hospital Garrahan, con un espectro de presentación variado. La más frecuente fue la esplenomegalia, seguido de trombocitopenia inmune. Estas dos condiciones se presentaron en un mismo paciente en varios casos, como se observó en reportes previos (7, 61, 64).

En función de estos resultados (tabla 4) y en base a la evidencia científica disponible, las citopenias aisladas o el síndrome de Evans, son considerados un signo de alarma clínica para la sospecha de IDCV, especialmente si recurren o evolucionan a la cronicidad. Michel y col., observaron que el púrpura trombocitopénico precedió al diagnóstico de IDCV en 13 de 21 adultos (69). Sin embargo, solo en un caso se había solicitado PEF para descartar hipogammaglobulinemia en el

curso de la citopenia inmune. Esto jerarquiza la necesidad de considerar el diagnóstico de IDCV en pacientes con púrpura trombocitopénico crónico y/o refractario al tratamiento.

En la serie del HP-CHPR no se observaron citopenias hemáticas como manifestación autoinmune, pero un paciente presentó Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) sistémica como primera manifestación de la enfermedad. El diagnóstico de IDCV se realizó en la evolución, con un retraso diagnóstico de 6 años. En este caso, el estudio de la inmunidad fue solicitado por los antecedentes de neumonías recurrentes y no por las manifestaciones autoinmunes. Esto demuestra las dificultades diagnósticas, relacionadas a la heterogeneidad clínica en la IDCV y la baja sospecha de este grupo de enfermedades. Por otra parte es conocido, que existe una mayor superposición de fenotipos clínicos y de laboratorio inmunológico con otras IDP en niños que en adultos (38).

Otras manifestaciones frecuentes en los pacientes del Hospital Garrahan, fueron las **linfadenopatías persistentes, seguidas de granulomas pulmonares en asociación con Neumonitis Intersticial Linfoide (NIL)**. La IDCV presenta de forma característica esta enfermedad pulmonar, que a diferencia de las bronquiectasias (BQT), es asintomática en sus primeras etapas. Por lo tanto, es importante aumentar la sospecha de NIL y buscarla en forma oportuna con estudios funcionales como el test de difusión con monóxido de carbono (DLCO) (79). En la serie analizada, el estudio anatomopatológico permitió arribar al diagnóstico en todos los casos, así como definir la presencia o no de granulomas y caracterizar la celularidad por inmunofenotipo. Esto tuvo implicancias en la terapéutica empleada y en definir factores pronósticos.

La EPC con **BQT** fue la complicación más frecuente en ambas series de pacientes. Esto refleja el daño estructural secundario a los episodios de neumonías recurrentes previo al diagnóstico, y asocia una reducción significativa de la sobrevida en relación a los pacientes que no presentan BQT (62, 64).

El paciente IDCV5 del HP-CHPR presentó linfoma a los 2.2 años. Este hallazgo resulta llamativo, ya que la evidencia científica disponible señala que, los pacientes con IDCV pueden presentar esta complicación no a edades tempranas, sino tardías (161). Además, en general estos pacientes presentan infiltración linfocitaria policlonal previa. Más aun, la presencia de infiltración linfocitaria policlonal incrementa 5 veces el riesgo de linfomas (7). Es por este motivo que para este caso en particular, se realizó la exclusión de otras IDP con defecto molecular identificado vinculados con una susceptibilidad particular a desarrollar linfomas a edad temprana (SAP, XIAP, AID, UNG). De todos modos dado que durante este trabajo no fue posible ampliar el análisis molecular con otros estudios genéticos para la exclusión diagnóstica; es posible que este paciente no cumpla con los criterios de probable IDCV sino de otra IDP similar IDCV. Por este motivo, este paciente fue excluido de la etapa experimental para el análisis de la expresión de FT.

En relación al **fenotipo inmunológico**, en ambas casuísticas se destaca, además de la hipogammagobulinemia, una alteración en el perfil de LB memoria en la mayoría de los pacientes. Se observó una disminución de la población con CI, observando valores menores al 2% (smB<sup>-</sup>) en la mayoría de los casos evaluados. Recientemente, Ameratunga y col. incluyen las alteraciones en el perfil B como criterio diagnóstico para IDCV a diferencia del consenso internacional *ICON* que no lo contempla (162). Sin embargo, la principal utilidad del estudio de esta población es que constituye un marcador biológico asociado a complicaciones no infecciosas como se observó en los pacientes analizados en el presente trabajo. La asociación más fuerte descrita es con manifestaciones de autoinmunidad no órgano-específica como citopenias y granulomas(43-45). En este sentido, en la casuística del Hospital Garrahan la mitad de los pacientes con

esplenomegalia presentaron un fenotipo linfocitario smB<sup>-</sup> y dentro de este grupo 62% asoció citopenias hemáticas.

En la cohorte del HP-CHPR, el total de los pacientes analizados presentaron smB<sup>-</sup>, y dentro de ellos 2 presentaron esplenomegalia al diagnóstico o en la evolución, y ninguno citopenias hemáticas si bien el período de seguimiento en esta serie fue corto. Los disturbios en el compartimento T, como la disminución de las células reguladoras y las células CD4 *naïve*, no fueron consignados en las dos casuísticas analizadas.

La linfopenia absoluta fue un hallazgo frecuente al momento del diagnóstico. Sin embargo, dado que esto constituye una alteración frecuente en este tipo de pacientes, no constituyó una alarma para el diagnóstico diferencial con otras IDP. Salvo en los casos que cursaron con linfopenia T y se acompañaron de infecciones oportunistas.

Algunos autores cuestionan la estabilidad en el tiempo del fenotipo de las células B y T, y sugieren controles periódicos en sangre, ya que el escenario del paciente puede cambiar y esto alerta sobre posible riesgo de infecciones oportunistas, complicaciones no infecciosas, y en algunos casos sobre otros defectos moleculares diferentes a los descritos en las IDCV (60, 163).

La presencia de una IgM normal o elevada fue un hallazgo frecuente en este grupo de pacientes, lo cual justificó en muchos casos, según el fenotipo clínico, la búsqueda de diagnósticos diferenciales con otras IDP y fenotipo similar a la IDCV.

Aunque los pacientes de las cohortes analizadas comparten muchas características clínicas e inmunológicas, es interesante señalar que el grado y severidad del fenotipo clínico varía entre los pacientes, lo cual es intrínseco a la patología estudiada, según los reportes mencionados.

Con respecto a la relación entre los fenotipos clínicos y el **pronóstico**, se destaca una alta prevalencia de complicaciones no infecciosas. En la casuística del Hospital Garrahan se presentaron en el 67% de los casos. La evidencia científica señala que estos pacientes tienen 11 veces más riesgo de muerte que aquellos que se presentan solo con infecciones (64). Entre las complicaciones no infecciosas que se han asociado con mayor mortalidad, en la casuística del Hospital Garrahan se observó alta prevalencia de manifestaciones por infiltración linfocitaria policlonal (NIL, granulomas, y/o linfadenopatías persistentes) y linfoma en un paciente. Por otra parte, en la serie del HP-CHPR dos de los cinco pacientes presentaron enteropatía, uno de ellos severa con malabsorción y pérdida de proteínas. La relación de las complicaciones AI con aumento de la mortalidad es controvertida. Algunos trabajos no encontraron asociaciones significativas y otros sí. En este último caso, el impacto de las complicaciones AI es menor que el de las complicaciones no infecciosas (7, 61). A pesar de ello, las complicaciones AI suelen requerir tratamientos de mayor complejidad como inmunosupresores y/o inmunomoduladores, que se asocia con riesgo adicional de complicaciones y mortalidad. En este sentido destacamos el caso de un paciente del Hospital Garrahan que falleció por una infección severa e inhabitual (tiflitis) en el curso de su tratamiento crónico por PTI refractario.

El presente trabajo presenta limitaciones en relación con el tiempo de seguimiento, en especial de los pacientes del HP-CHPR. En estos, la media de seguimiento fue de 4.8 años vs. 10 años en la serie del Hospital Garrahan. Este aspecto debe ser considerado, en relación al pronóstico, debido que la “supuesta” estabilidad del fenotipo clínico requiere una confirmación longitudinal ya que algunas complicaciones pueden presentarse en la evolución e incluso en la edad adulta. Por otra parte, el escaso número de casos diagnosticados en el HP-CHPR impide definir un claro fenotipo. Además, se debe considerar que al momento actual han transcurrido varios años de avance del conocimiento, por lo que es posible que alguno de los pacientes analizados, puedan corresponder a otras entidades no identificadas al cierre de la tesis. Si bien la mayoría de los casos de IDCV

ocurren de forma esporádica, esta IDP es considerada una enfermedad “paraguas” en la cual convergen defectos genéticos diferentes. Estas otras enfermedades de causa monogénica similar a la IDCV, en su mayoría son de herencia mendeliana, ocurren con frecuencia en la infancia y pueden presentar en más de un integrante de la familia (99). Es por esto que el clínico debe reconocer el perfil clínico e inmunológico que podría corresponder con estas nuevas entidades. Identificarlas nos permitiría optimizar el seguimiento y recurrir a terapias dirigidas al defecto inmunológico de base y considerar la experiencia en TPH según la patología identificada.

El estudio genético adquiere relevancia en pacientes IDCV similar, en los cuales predomine la expresión clínica por desregulación con complicaciones autoinmunes múltiples, severas o sistémicas que evoquen un Lupus. También en aquellos que presentan otras características sindrómicas sugestivas de defectos específicos como baja talla, deficiencia de ACTH, mielodisplasia, infecciones por agentes oportunistas, verrugas, infección persistente por el virus de *Epstein Barr* o *Citomegalovirus* asociada o no a linfoproliferación crónica así como linfomas a edad temprana (infancia) (11).

En relación al fenotipo inmunológico constituyen alertas para un diagnóstico diferencial de IDP monogénica las siguientes variables: compromiso hematológico severo con mielodisplasia, IgM normal o elevada; linfopenia B marcada al debut o en la evolución así como un compromiso de la inmunidad celular profundo con linfopenia CD4 < 300 células/μl y/o proliferaciones linfocitarias ausentes (11, 164).

En las series analizadas, se observaron pacientes con valores normales o elevados de IgM que requirieron la exclusión diagnóstica de deficiencias en el cambio de clase (HIGM). En un caso con linfopenia B severa, se descartó mutación en el gen *BTK*.

En síntesis, en este estudio se pudo identificar en la serie Hospital Garrahan un fenotipo clínico prevalente caracterizado por desregulación inmune acompañado de infecciones recurrentes especialmente respiratorias. En relación al fenotipo inmunológico todos presentaron hipogammaglobulinemia y elevada frecuencia de población de LB con CI  $\leq$  2% (smB<sup>-</sup>). Como se analizó previamente, este perfil tienen un correlato de manifestaciones no infecciosas e implicancias pronósticas. Se destaca la importancia del seguimiento clínico y de laboratorio ya que es posible que algunos defectos o alteraciones inmunológicas puedan presentar un efecto deletéreo con el tiempo. Además es posible que factores epigenéticos o ambientales actúen como posibles modificadores del curso de la enfermedad (165).

## **2) Analizar el perfil de expresión de diferentes FT implicados en la diferenciación del LB en los pacientes IDCV del HP-CHPR**

El principal objetivo de este trabajo fue el de aportar a la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la inmunopatogenia de esta enfermedad como posible causa de la hipogammaglobulinemia y de las alteraciones en los procesos de maduración tardía como son la CI, HS y maduración a células plasmáticas, descritos en IDCV. En este sentido, uno de los objetivos específicos fue describir el perfil de expresión de diferentes FT implicados en el desarrollo del LB en los niños con probable IDCV procedentes del HP-CHPR. A pesar que sólo se pudo estudiar tres pacientes, los resultados representan un valioso aporte, dado que no existen antecedentes a nivel nacional de investigaciones básico-clínicas que aborden este tema. Las investigaciones también son escasas a nivel internacional.

Por otra parte, los estudios disponibles en general abordan el estudio de un solo gen. En esta tesis se analizaron seis genes diferentes implicados en el desarrollo normal de la célula B.

A nuestro entender el principal aporte de esta tesis en el campo de la biología molecular fue la de encontrar diferencias en el perfil de expresión génica (ARNm) en LB (CD19+) de pacientes IDCV comparados con los controles. Específicamente, en tres de seis FT estudiados se observó una menor expresión en las células CD19 positivas comparadas con su control. De estos tres genes, dos de ellos están vinculados con las etapas tempranas de la maduración B (*E2A* y *PAX-5*) mientras que el gen *XBP-1* lo está con etapas tardías. A continuación se discuten por separado los hallazgos relacionados con estos FT.

## 2.a) Expresión de los genes *E2A* y *PAX-5*

Durante la maduración temprana en MO, los principales FT responsables de comprometer el precursor linfoide con el linaje B y mantener su identidad, son los FT *E2A* y *PAX-5*, respectivamente (112). Es interesante destacar que si bien la iniciación y la diferenciación B son eventos inseparables, uno no es garantía del otro, por lo que la expresión normal de ambos FT es responsable de mantener un recuento normal de LB en periferia. Así mismo, la expresión normal de *PAX-5* es responsable de mantener la identidad y un pool de LB maduros circulantes. (127). El factor *E2A* activa a su vez la expresión de *PAX-5*, y ambos factores aumentan su expresión, luego de ser activados por el LT, a través de la vía de CD40L/CD40 en el CG.

Como fue previamente expresado en el capítulo 3, nuestros resultados muestran una clara ausencia de expresión de *E2A* en los LB del paciente IDCV1 y la disminución de este gen en IDCV3 en comparación al control. Similar patrón de expresión diferencial del gen *PAX-5* se observó en los mismos pacientes. Estos resultados sugieren un posible defecto en la vía de activación del FT *E2A*, lo cual podría afectar a su vez la expresión de *PAX-5* llevando a una disminución en la población de LB en estos pacientes.

### Nos planteamos tres preguntas en relación al defecto de expresión de *E2A* observado:

1. La ausencia de expresión del gen *E2A* observada en ambos pacientes (IDCV1 y IDCV3) podría deberse a un defecto en la región genómica que lo contiene?
2. El perfil de expresión observado en LB de sangre periférica es igual luego de activar la célula B con CD40L más IL-4?
3. La ausencia de expresión de *E2A* observada en estos pacientes, responde a un defecto intrínseco del LB o una ineficiente activación por los LT y /o las APC in vivo?

Para responder las primeras dos preguntas, en IDCV1 se estudió la expresión de *E2A* y *PAX-5* simulando *in vitro* el microambiente de CG ya que ambos FT aumentan su expresión luego de ser activados por el linfocito T a través de la vía de CD40L/CD40. Esto permitió comparar su expresión en relación al control pre y post-activación. En estas condiciones los LB de IDCV1 expresaron el gen *E2A* luego de ser activados. Se observó además que, eran capaces de activar la expresión de *PAX-5* e inducir la expresión de *AID*. Estos resultados proporcionan evidencia para excluir defectos genómicos en línea germinal del gen *E2A* en el paciente IDCV1 y confirman que el perfil de expresión de estos factores es normal en condiciones de activación. Estos hallazgos coinciden con el reporte publicado en el año 1999 por Kaneko y col. quienes identificaron ausencia de

expresión del gen *PAX-5* en PBMC de 6 pacientes con probable IDCV (129). Es de destacar que estos autores luego de activar las células con anti-CD40, IL-2 e IL-10 en dos pacientes, encuentran una expresión normal de *PAX-5*. En nuestro caso esta misma característica se observó además para el gen *E2A* sugiriendo que otros serían los factores responsables de la disminución de la expresión de ambos genes en la población B de este paciente.

A pesar de estos hallazgos, es importante considerar que es posible que las condiciones alcanzadas durante la activación *in vitro* no necesariamente son iguales a lo que sucede *in vivo*. Por lo tanto no se pueden excluir en este paciente, defectos o alteraciones extrínsecas en los mecanismos de activación de las APC y/o cooperación de los LT<sub>FH</sub> como causa de la disminución o ausencia de expresión de *E2A* y *PAX-5*. En este sentido, en la IDCV se han descrito defectos en la activación, diferenciación y función de las células dendríticas derivadas de monocitos como menor expresión de moléculas de coestimulación y liberación de IL-12 (39). Los hallazgos comunicados por Bayry y col. apoyan la hipótesis de un posible “escenario adverso” para el LB *in vivo* que afecte negativamente la expresión génica sostenida de estos FT en los órganos linfoides secundarios.

Dado que durante los estadios de maduración temprana en MO y en la recirculación del LB, esta célula regula la expresión de FT de una manera T-independiente, nos propusimos analizar cuáles podrían ser las causas de las alteraciones descritas en LB no activados.

La expresión de *E2A* y *PAX-5* es regulada también por otros FT. En este sentido, el FT EBF-1, actúa regulando la expresión génica de *E2A* y *PAX-5*; a su vez estos últimos regulan la expresión de *EBF-1* en una serie de “feedbacks loops” (132, 166). Teniendo en cuenta este circuito transcripcional una menor expresión de EBF-1 podría ser la causa o contribuir en las diferencias observadas en el perfil de expresión de *E2A* y *PAX-5*.

En cuanto al estudio del FT ID-2, este trabajo no mostró diferencias en el perfil de expresión en los pacientes IDCV cuando se los comparó con sus controles.

Por otra parte la expresión de los FT durante etapas tempranas de maduración en MO, es regulada por factores de crecimiento y citoquinas liberadas por las células estromales. Es así que la IL-7 es la principal responsable de guiar la diferenciación, proliferación y supervivencia de los LB. Esto lo logra a través de la unión a su receptor (IL7-R) y de procesos de señalización interna que activan la expresión de FT dentro de la célula B (133). La expresión de IL7-R en PLC está regulada por el FT PU.1; este presenta un perfil de regulación diferente según el nivel de su transcripto. Según el cual en cantidades bajas induce la expresión de IL-7R y la diferenciación a células B; y por el contrario altos niveles inhiben su expresión facilitando la diferenciación de células mieloides (112, 167). Teniendo en cuenta los resultados previamente descritos en esta tesis y como perspectivas del trabajo creemos que sería importante poder analizar la expresión del gen *PU.1* en estos pacientes que muestran diferencias en la expresión de *E2A* y *PAX-5*, para corroborar el origen de la deficiencia de estos factores.

En esta instancia de la discusión es interesante también comparar nuestros hallazgos con el trabajo en IDCV reportado por Tallmagde y col. En este sentido, si bien el estudio fue realizado en caballos, compartimos nuestra hipótesis de trabajo acerca de posibles alteraciones en el perfil de expresión génica de FT como causa de las alteraciones en el desarrollo B en la IDCV. En este trabajo se propusieron analizar el perfil de expresión de varios FT en MO y ganglios mesentéricos de caballos con IDCV y fenotipo LB- (168).

Entre los genes analizados se incluyeron *E2A*, *PAX-5*, *EBF-1* y *PU.1*, además del análisis de *IL-7R* y otras moléculas reguladas por estos como *CD79A*, *BLK*, *BLNK* y *CD19*. Los autores

encontraron menor expresión de *E2A*, *PAX-5*, no encontrando diferencias significativas en sus genes blanco. En relación a las posibles causas de estas diferencias, no observaron en estos casos una reducción de *EBF-1* en la mayoría de los casos como esperaban encontrar. Por otra parte excluyeron defectos genómicos en *PAX-5* mediante secuenciación directa.

Nuestros hallazgos mostraron resultados similares, sin embargo las muestras analizadas en este trabajo se corresponden con la expresión en LB de sangre periférica y no en MO.

Por otra parte y en consonancia con este estudio, creemos es interesante considerar que la menor expresión observada a nivel de ARNm, pueda responder a factores epigenéticos que silencien la expresión de FT a nivel del LB. Lo cual ha sido demostrado en la IDCV para otros genes claves en procesos de maduración tardía del LB. En este sentido se reportaron alteraciones en la desmetilación del gen *AICDA* asociados a una menor expresión y reducción del porcentaje de LB memoria (169).

En esta oportunidad nos interesó analizar el **fenotipo inmunológico de nuestros pacientes en relación al perfil de expresión diferencial de los genes *E2A* y *PAX-5***, si bien se estudiaron muy pocos casos.

En el perfil inmunológico de los tres pacientes estudiados, se destaca la hipogammaglobulinemia, recuento normal de LB y disminución de la población con CI de inmunoglobulinas (smB<sup>+</sup>). La presencia de un recuento normal de LB nos sugiere que la disminución de la expresión de *E2A* y *PAX-5*, no es debido a la disminución de células B sino más bien un efecto intrínseco de que o bien muchas células no expresan estos FT o bien la mayoría los expresan en bajos niveles.

Los reportes previos referidos a FT e IDP con hipogammaglobulinemia son escasos, y en particular en IDCV. Estos trabajos pueden dividirse en aquellos referidos a variantes patogénicas en los genes de FT y otros vinculados a diferencias en el perfil de expresión génica sin un defecto genómico comprobado como citamos anteriormente.

En este sentido Boisson y col., recientemente, describieron una nueva IDP causada por variante patogénica en el gen *E2A*. El fenotipo inmunológico característico se correspondió con hipogammaglobulinemia y linfopenia B severa (agammaglobulinemia). La causa de esta alteración responde a un bloqueo en la diferenciación temprana dada las implicancias funcionales de *E2A* en esta etapa. Bloqueando el pasaje de las PLC a células pro-B y determinando una ausencia del BCR en membrana (104).

Por tanto, en relación con nuestros hallazgos en el perfil inmunológico de los pacientes IDCV, es posible que la menor expresión observada a nivel del transcripto de *E2A* pueda estar vinculada con la hipogammaglobulinemia. Sin embargo a diferencia de los hallazgos descritos por Boisson y col., no se observó linfopenia B como consecuencia de la menor expresión del gen *E2A*, lo cual podría explicarse por la ausencia de un defecto genómico como se comprobó en un caso.

De igual modo es importante tener en cuenta que en algunos casos de IDCV, la linfopenia B puede aparecer en la evolución como fue descrito en la cohorte de Piatosa y col. (163). En este sentido, nuestra serie presenta como factor adicional para un posible descenso de LB, las alteraciones encontradas en el perfil de expresión en el gen *PAX-5*. Dado que este FT es responsable de mantener el compromiso con el linaje B y por tanto la sobrevivencia de estas células en periferia (127, 128). El perfil inmunológico con hipogammaglobulinemia y linfopenia B, fue descrito por Kaneko y col., en pacientes con IDCV y menor expresión de *PAX-5* (129).

En series reportadas en adultos y niños con IDCV se describe un 10% de casos con linfopenia B severa (LB<sup>-</sup>), y de un 40 a 50% con valores de LB discretamente descendidos (9). Piatosa y col. recomiendan la valoración periódica del perfil inmunológico para poder reclasificar el perfil

inmunológico de los pacientes y diagnosticar o prevenir complicaciones no infecciosas asociadas con este fenotipo LB<sup>-</sup>. Este perfil inmunológico estaría asociado con defectos tempranos de la maduración B en pacientes con IDCV, por lo cual creemos que nuestros hallazgos en relación a una menor expresión de *E2A* y *PAX-5* aportan evidencia a favor de una alteración a dicho nivel.

En relación a posibles defectos en el perfil de maduración de las células B como causa de la menor expresión de los genes *E2A* y *PAX-5*, nos interesó compartir algunos comentarios.

Los procesos de **HS** y **CI** ocurren de manera exclusiva en LB, una vez que esta célula es activada por el antígeno. Ambos procesos requieren de la cooperación del LT<sub>FH</sub> a través de la interacción CD40-CD40 y citoquinas (IL-10, IL-4, IL-21). Estas señales se traducen intracelularmente, activando la enzima AID y FT (113). Estos procesos de diferenciación T-dependiente se encuentran afectados en grado variable en la IDCV, lo cual se traduce en el fenotipo de LB que presentan los pacientes (46, 49).

En lo que refiere a la capacidad de las células B para completar el proceso de CI, los tres pacientes analizados mostraron una disminución profunda de LB con CI, confirmado por el perfil smB<sup>-</sup>.

Si bien *E2A* es crítico para etapas tempranas del desarrollo B en MO, tiene un rol adicional durante la linfopoyesis tardía (133). Debido a que este FT es responsable de regular la expresión de AID, su unión y relocalización en el locus de la IgH durante el proceso de CI; y esto lo logra en conjunto con *PAX-5* e *IRF-4* (170).

En el caso de un paciente, pudimos confirmar una correcta activación *in vitro* del LB a través de la vía de CD40-CD40L, con expresión de *E2A*, *PAX-5* y la correcta inducción de la molécula *AID*. Por lo cual es menos probable que estos FT estén implicados en la disminución de la población de LB con CI observada.

Posteriormente al inicio de este trabajo, Almejun y col. describieron el análisis molecular del proceso de HS para la serie de casos del Hospital Garrahan incluidos en esta tesis (Anexo I). Los hallazgos confirmaron que los LB de estos pacientes presentaban alteraciones en este proceso, destacando un grupo con una mayor frecuencia de complicaciones no infecciosas y reducción severa de la HS (171).

*E2A* tiene un rol importante en el proceso de HS ya que como se mencionó anteriormente induce la expresión de AID pero además reprime la expresión del transcrito de *UNG2*. Regula entonces la expresión balanceada de ambas moléculas, estimulando la diversificación de las Igs, amplificando la HS y suprimiendo los mecanismos de reparación normal del ADN (136, 137).

Por lo cual, si bien en esta tesis no se analizó el perfil de HS de los pacientes estudiados para FT, creemos que el estudio de la expresión génica de moléculas implicadas en este proceso como *E2A* y AID, fue un aporte de nuestro trabajo para comprender los posibles mecanismos implicados en las alteraciones del desarrollo B, descritas en los pacientes con IDCV.

## **2.b) Expresión de los genes *XBP-1* e *IRF-4***

En el año 2005, Taubenheim y col. plantean por primera vez la hipótesis de un posible defecto en FT a nivel de CG, de pacientes con IDCV. En esa oportunidad se estudió, en ganglios linfáticos, la expresión a nivel de proteínas de BCL-6 y Blimp-1; además la molécula CD138 como marcador de superficie de células plasmáticas. (49). Los autores establecen tres estadios de diferenciación:

centrocitos (Ki67+/- CD138<sup>-</sup>), plasmoblastos (Blimp-1<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) y células plasmáticas (Blimp-1<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup>) (49). Los tres pacientes, analizados, mostraron ausencia de células plasmáticas a pesar de tener una expresión normal de Blimp-1; por lo cual se plantea un posible defecto río abajo de este FT o una alteración en la función de la proteína.

La diferenciación terminal a células plasmáticas, con capacidad de secretar anticuerpos de alta afinidad y especificidad antigénica, se origina a partir de LB memoria o LB activados por el antígeno en interacción con LT<sub>FH</sub> específicos y células dendríticas. Estas células que ya sufrieron los procesos de CI e HS, maduran a plasmocitos de larga vida que colonizan MO. Este proceso de maduración requiere del correcto plegado y secreción de anticuerpos mediado por el proceso de “UPR” que se inicia por la acumulación de inmunoglobulinas desplegadas dentro del retículo endoplásmico y señales de activación a través del BCR (121).

En el año 2001 Reimold y col, definen a XBP-1 como un FT crítico para la diferenciación tardía del LB, asociando su deficiencia con la disminución de células plasmáticas de larga vida en MO y una menor producción de anticuerpos (120, 121). Trabajos posteriores sugieren que la expresión de XBP-1 impulsa la diferenciación a célula plasmática; señalando que la acumulación de inmunoglobulinas mal plegadas, es responsable de amplificar y mantener la señal para la UPR una vez que este proceso se inicia de forma independiente. Por lo cual, un defecto o incapacidad para secretar anticuerpos, para el caso de deficiencias en XBP-1, se presentaría después de que la célula presente una diferenciación morfológica y funcional compatible con una célula con capacidad secretora (CD138+) (172).

En base a que estos eventos tardíos de maduración se encuentran alterados en la IDCV nos propusimos también analizar el perfil de expresión del gen *XBP-1*.

Nuestros resultados mostraron una ausencia de expresión de este FT en LB sin activar en dos pacientes. En el caso de IDCV3 no logramos una amplificación de *XBP-1* en el control del LB (CD19+); por lo cual no podemos validar la ausencia de expresión de este FT a nivel de las células B. Sin embargo, se pudo documentar en la misma PCR, una menor expresión de *XBP-1* a nivel de las células CD19- en relación al control. Lo cual aporta evidencia a favor de nuestros hallazgos a nivel de los LB del paciente IDCV3, y nos obliga a confirmarlo en una nueva PCR para *XBP-1*.

En el trabajo previo referido a este FT en IDCV, reportado en el año 2008, se utilizó una estrategia diferente para analizar un posible defecto de XBP-1 en una paciente adulta. En esa oportunidad se realizó la activación con LPS de PBMC y LB inmortalizados con el virus *Epstein-Barr*. Luego evaluaron la expresión de XBP-1 (ARNm) en su forma activa o “spliced” e inactiva o “unspliced”; además del transcrito de XBP-total (141). Este estudio mostró en un caso particular aumento de la forma inactiva, mientras que a nivel de células B se observó acumulación de IgM en el RE. Posteriormente excluyeron variantes patogénicas en *XBP-1*, y en el gen *IRE-α* que codifica para la enzima responsable de generar la forma activa de *XBP-1*.

En base a estos hallazgos, los autores, plantean una disrupción de la UPR como causa del defecto en la maduración a células plasmáticas y la hipogammaglobulinemia; sugiriendo el estudio del FT XBP-1 para todos los pacientes con IDCV.

El perfil inmunológico de nuestros pacientes con menor expresión de *XBP-1*, al igual que lo reportado por Kuribayashi y col.; mostró hipogammaglobulinemia y valores normales de LB. Por lo que, nuestros resultados son un nuevo aporte a favor de la hipótesis postulada por Taubenheim y col., referida a posibles alteraciones en FT que actúan río abajo de BLIMP-1 como causa de los defectos en CG y la hipogammaglobulinemia de pacientes con IDCV (49).

En relación a las posibles causas que puedan estar afectando los niveles de expresión del gen *XBP-1* a nivel de los LB, debemos considerar el circuito o “network” de regulación que permite

completar la maduración a células plasmáticas. Los principales FT implicados en la maduración y supervivencia de las células plasmáticas son Blimp-1, IRF-4 y XBP-1 (123).

La expresión de XBP-1 (ARNm) es inducida por IRF-4, en relación a este último FT nuestros hallazgos no mostraron diferencias que puedan explicar la menor expresión de *XBP-1* en dos de tres pacientes estudiados.

IRF-4 es activado por Blimp-1, y se caracteriza por su rol "pivotal" en la regulación de la expresión génica. Según el cual solo una concentración alta y sostenida, a nivel de ARNm, es responsable de inducir la diferenciación a células plasmáticas. Esto se logra al inducir la expresión de XBP-1 y Blimp-1 en bucle. Sin embargo niveles bajos y transitorios de IRF-4 activan la expresión de genes claves para la reacción de CG como *BCL-6* y *AICDA*. Es así que se logra controlar de forma dinámica y no redundante, los eventos tardíos de diferenciación de la célula B. (173, 174).

Creemos que es importante tomar en cuenta las limitaciones de nuestro estudio, en relación a posibles variaciones en la concentración del transcrito de IRF-4. Para lo cual se requiere de un estudio con mayor especificidad como es la PCR en tiempo real.

En relación a otras causas posibles que expliquen la menor expresión de *XBP-1* observada, debemos excluir en primer lugar defectos a nivel del ADN genómico. Para lo cual sería necesario acceder al secuenciado de este gen completo (exones, intrones y regiones regulatorias UTRs) y además poder valorar su expresión total a nivel de ARNm y de las respectivas formas de splicing diferencial, una vez que la célula B es activada correctamente a través del BCR o la vía TLR4/9.

En síntesis nuestro trabajo, pudo evaluar dos de los tres FT del circuito transcripcional que dirige la diferenciación a células plasmáticas, y evidenció una posible implicancia de XBP-1 como causa de la hipogammaglobulinemia. La cual podría estar relacionado a una menor capacidad secretora de las células plasmáticas (CD138+) y una menor colonización de las células plasmáticas de larga vida en MO, según las funciones que le competen a este FT crítico para la ontogenia B tardía (120, 172)

### **3) Caracterizar el perfil clínico y molecular en pacientes con IDCV del HP-CHPR**

En este sentido debemos considerar que la heterogeneidad clínica de la IDCV refleja el origen poligénico de esta enfermedad, de presentación esporádica en la mayoría de los casos (6). Por lo cual creemos que este trabajo aportó datos, experimentales, que nos permitieron entender al menos en una pequeña parte, los posibles mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la IDCV de tres pacientes pediátricos.

Diferentes autores describen que las infecciones recurrentes constituyen la principal manifestación de la IDCV y en el 32% representan la única manifestación clínica. Sin embargo el 70% presenta una o más complicaciones no infecciosas como son la autoinmunidad, infiltración linfocitaria policlonal, enteropatía y/o malignidad (7, 64).

Los mayores esfuerzos en investigación en IDCV, intentan poder definir "perfiles biológicos" que orienten al clínico en relación a una mayor susceptibilidad o predisposición a presentar complicaciones no infecciosas y por tanto una mayor morbimortalidad. En este sentido los mayores avances son referidos al perfil de células B y T que presentan los pacientes, como ya fue mencionado en la introducción.

En relación a la implicancia de nuestros hallazgos referidos a FT y una posible correlación clínica, consideramos que para poder sacar conclusiones más acertadas deberíamos contar con una

mayor cantidad de pacientes estudiados. Sin embargo algunas observaciones podemos destacar en relación al perfil clínico y la expresión diferencial encontrado en los genes estudiados.

Los dos pacientes que mostraron una menor expresión de *E2A* y *PAX-5* se presentaron con un fenotipo clínico similar donde las infecciones recurrentes constituyeron la principal manifestación. Esta expresión clínica coincide con los pacientes descritos por Boisson y col. con la enfermedad agammaglobulinemia, causada por una variante patogénica en el gen *E2A*. Similares hallazgos clínicos fueron descritos por Kaneko y col. en relación a *PAX-5* (104, 129).

En una media de seguimiento de 4.8 años, no se observó AI en ninguno de los dos casos con menor expresión de *E2A*. Sin embargo como se comentó anteriormente este tipo de complicación se puede presentar en la evolución en un 20-50% de los casos (68). En relación a las causas de estas alteraciones en el año 2011 Romberg y col. describen una afectación en los mecanismos de tolerancia central como uno de los mecanismos de la AI en los pacientes con IDCV (175). En este sentido es importante señalar que el FT *E2A* participa en el proceso de re-edición del BCR en MO, responsable de responsable de la correcta especificidad antigénica y selección clonal de LB. Por lo que consideramos interesantes nuestros hallazgos en relación a un perfil de expresión diferencial en el gen *E2A* (176).

En los tres pacientes estudiados no se observaron patologías malignas. Este tipo de complicación suele estar vinculada con el defecto inmunológico de base, por lo que aquellas IDP que afectan el desarrollo de las CPH, linfocitos o células mieloides suelen presentar un mayor riesgo de desarrollar enfermedades hemato-oncológicas como leucemia y/o linfomas.

En la IDCV, el cáncer se presenta mayoritariamente en la edad adulta, con una prevalencia del 8.5%, y predominan los linfomas además del cáncer gástrico. Kralickova y col. sugieren un escenario heterogéneo en la genética de este tipo de complicaciones, considerando que pueden existir variantes patogénicas no identificadas como causa de malignidad pero también subrayan el rol de posibles genes modificadores para el desarrollo o no de malignidad (177). En esta línea de razonamiento; si bien no contamos con trabajos previos referidos a FT en IDP y un mayor riesgo de desarrollar cáncer, en el año 2013 Tijchon y col.; realizan una revisión a propósito de enfermedades hemato-oncológicas y FT, en la cual refieren que alteraciones en la regulación de la expresión de los genes *E2A* y *PAX-5*, podrían estarían vinculados con un mayor riesgo de desarrollar leucemias y menos frecuentemente linfomas (130).

En relación a la menor expresión del **FT XBP-1** y posibles asociaciones clínicas en IDCV, existe un solo reporte previo a esta tesis. En el cual se describe un paciente con afectación de este FT, y como perfil clínico principal las infecciones recurrentes (141).

Teniendo en cuenta que nuestro trabajo describe un perfil clínico diferente en relación a la ausencia de expresión de *XBP-1*, dado por la presencia de manifestaciones AI como fueron la AIJ sistémica y la tiroiditis. Nos interesó comentar, en relación a estos hallazgos, algunos aspectos referidos al rol de este FT en respuesta al estrés dentro del RE y posibles complicaciones no infecciosas.

Es así que la UPR, mediada por la acción del FT *XBP-1*, es fisiológicamente activada en el LB durante la maduración a células plasmáticas; es además estimulada bajo condiciones de inflamación como se ha demostrado a nivel del SNC en el contexto de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, etc) (142). Esta respuesta celular tiene como objetivo principal estabilizar la estructura de las proteínas mal plegadas para luego poder secretarlas o expresarlas en membrana, y degradar aquellas que no se pliegan de manera inapropiada.

En lo que refiere a patologías autoinmunes y posibles defectos en los LB, la respuesta inadecuada de la UPR con formación de autoanticuerpos ha sido descrito en la artritis reumatoide. Es así que en este grupo de pacientes, se ha observado una expresión aumentada de la chaperona BIP, anticuerpos anti-BIP y anti-BIPcitrulinados (178). Este tipo de alteraciones, se reportaron recientemente en otras patologías AI como el lupus eritematoso sistémico, y si bien las implicancias en la patogenia de la enfermedad no están claras su aparición en suero puede anticipar la aparición de manifestaciones clínicas (179, 180).

De manera que nuestros hallazgos, en relación al FT XBP-1 y el perfil clínico con AI, si bien se refieren a un solo paciente, son un nuevo aporte a favor de un posible defecto en la respuesta al stress dentro del RE en la IDCV.

Lo reportado por Kuribayashi y col. en IDCV y XBP-1 apoya nuestra hipótesis en relación a estas alteraciones a nivel de la célula B. En este estudio, los autores, realizaron estudios funcionales en LB, simulando *in vitro* el stress dentro del RE, y posteriormente evaluando la respuesta celular mediante RT-PCR de los transcritos: *IRE $\alpha$* , *XBPs* y la chaperona *BIP*. En el caso control se pudo observar un pico de los transcritos a las 12hs que descendiente rápidamente como “reflejo” de un correcto funcionamiento de la UPR y resolución del stress dentro del RE; mientras que el paciente con menor expresión de *XBP-1* no se observa este comportamiento, a nivel celular, sino por el contrario se muestra una respuesta más lenta, tardía y no se logra restablecer la homeostasis del RE.

Los mayores desafíos vinculados al tratamiento de la IDCV, se refieren a importancia de prevenir y tratar complicaciones no infecciosas (85). Dichas manifestaciones responden a procesos de desregulación inmune como causa de defectos en la función de LT reguladores pero también por la pérdida de tolerancia de las células B. Por lo que poder conocer los defectos moleculares que causan estas alteraciones nos permitiría dirigir terapias a blancos específicos que alteren el curso de la enfermedad así como mejorar el tratamiento de las complicaciones.

En este sentido es interesante la revisión publicada en el año 2014 a propósito de FT del LB, alteraciones en su expresión génica y nuevas terapéuticas en LES. Los autores destacan a Blimp-1 como un posible blanco molecular, dada la sobreexpresión de este FT en pacientes con LES y una correlación de los niveles de este transcrito con la severidad de la enfermedad y los títulos de anticuerpos antinucleares (ANA) (181).

En relación a posibles implicancias terapéuticas en IDCV, en base al perfil molecular descrito para los genes de FT estudiados en esta tesis, creemos que sería importante poder contar con un número mayor de pacientes para así poder correlacionar estas alteraciones con un fenotipo clínico más específico y eventualmente establecer factores pronósticos.

## Conclusiones y Perspectivas

Los resultados de este trabajo subrayan la importancia de caracterizar tanto a nivel clínico como molecular este grupo de patologías. Dada su heterogeneidad es imprescindible contar con la mayor información posible involucrando el área celular, molecular y clínica para obtener así una mejor estadificación y control de los pacientes.

Esta tesis contribuye a la generación de conocimiento en el área de las IDP y sus resultados representan un punto de partida para estudiar los FT en un número mayor de pacientes, en un estudio multicéntrico con estas técnicas u otras como PCR cuantitativa. Los hallazgos aportan evidencia a favor de la hipótesis de un posible defecto en la expresión génica de FT como causa de las alteraciones durante la maduración del LB en la enfermedad IDCV.

Por otra parte, se realizaron aportes en lo metodológico, ya que se pusieron a punto técnicas de biología molecular como la PCR-semicuantitativa para seis genes de FT (*E2A*, *PAX-5*, *ID-2*, *STAT-6*, *IRF-4* y *XBP-1*) implicados en la maduración de las células B. Estos datos podrían ser utilizados para generar un panel de FT que estando implicados en la IDCV, sea útil cuantificar. Para ello, nuevos juegos de “primers” y la puesta a punto en PCR cuantitativa podría ser instaurada luego de haber confirmado estos datos en una cohorte mayor de pacientes.

Se destaca que, en nuestro país, la inmunología es una disciplina que ha tenido mayormente un desarrollo básico. Sin embargo, en los últimos 10 años, en el marco de esta tesis de maestría, y en conjunto con otros colegas, se conformó un grupo de estudio en Inmunología en el HP-CHPR. En este sentido es importante resaltar el apoyo que la Facultad de Medicina de la UdelaR y el HP-CHPR dieron para el desarrollo de la inmunología clínica en el Uruguay y el aporte del trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis para comenzar a consolidar este camino.

Esta tesis fue posible gracias al desarrollo de un trabajo en equipo, interdisciplinario, con especialistas de centros de referencia nacionales (HP-CHPR, Instituto Pasteur) y regionales (Hospital Garrahan) mediante abordaje básico-clínico. Como consecuencia se generaron vínculos para el posible desarrollo de futuros proyectos entre estos centros de referencia.

Se destaca que parte de los resultados han motivado una publicación en una revista arbitrada internacional (169, Anexo I). El compromiso es difundir todos los resultados de la misma con la comunidad médica y científica nacional y realizar una publicación en relación a los hallazgos moleculares.

Considero que esta tesis es un proceso de autoformación, inspirado en la inquietud por responder preguntas que surgieron junto a mis tutores y durante el ejercicio clínico.

Me gustaría citar una frase de una experta en IDCV como reflexión final, a propósito de nuestra hipótesis de trabajo:

” .....the extensive biological effort manifest in B cell biology, it may be surprising to consider that an equally extensive network of genetic influences—some working singly, others as collective influences—must support the many stages of B cell biology. The study of B cells with single gene defects has elucidated some of the most essential components of B cell biology, especially for the early events of B cell survival and activation. However, the most common of these events—common variable immunodeficiency (CVID)— is for the most part not yet well understood, thus providing a still open field for exploration”. (Cunningham-Rundles and col. Perspectives on common variable immune deficiency, Ann N Y Acad Sci. 2011 Dec; 1246:41-9)

## Contribuciones

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis formaron parte de las siguientes comunicaciones científicas:

*Resúmenes en congresos nacionales, regionales e internacionales:*

**Patiño V**; Giachetto G; Montenegro C; Oleastro M; Opezzo P. Análisis de los diferentes factores de transcripción implicados en el desarrollo del linfocito B en la Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV). Presentado: Escuela Avanzada de Inmunodeficiencias Primarias en São Paulo: Unravelling Human Immuno-Physiology. 28 de noviembre-4 de diciembre, 2010. Poster.

**Patiño V**; Bernasconi A; Rossi J; Roy A; Cabanillas D; Nievas E; Tahuil N; Almenejún B; Danielian S; Oleastro M. "Common Variable Immunodeficiency (CVID): Description of 34 Pediatric Patients". Presentado: II Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias. Ciudad de México. 13 al 15 de octubre, 2011. Poster.

**Patiño V**; Bernasconi A; Rossi J; Roy A; Cabanillas D; Nievas, Elma; Tahuil N; Almejún Belén; Danielian S; Oleastro. Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV): descripción de 34 pacientes pediátricos. Informe de avance de Maestría en formato poster. Autores: Presentado: III Jornadas Científicas. Programa para la Investigación Biomédica (Pro.in.bio.) Hospital de Clínicas, Piso 15. Montevideo. 19-20 de abril, 2012. Expositora oral.

*Artículo publicado:*

Almejún B, Campos B, **Patiño V**, Galicchio M, Zelazko M, Oleastro M, Opezzo P, Danielian S. J Allergy Clin Immunol. 2017; 139(3): 913-922.

Non infectious complications in pediatric-onset CVID patients correlated with defects in somatic hypermutation but not in class switch recombination (**Anexo I**).

## BIBLIOGRAFÍA

1. García Martínez JM, Santos-Díez L, Dopazo L. Diagnóstico de las Inmunodeficiencias Primarias. *Protoc diagn ter pediatri*. 2013;1:81-92.
2. Condino-Neto A, Sorensen RU, Gomez Raccio AC, King A, Espinosa-Rosales FJ, Franco JL. Current state and future perspectives of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID). *Allergologia et immunopathologia*. 2015;43(5):493-7.
3. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary I, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(6):1161-78.
4. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *Journal of clinical immunology*. 2015;35(8):696-726.
5. Janeway CA, Apt L, Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1953;66:200-2.
6. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *British journal of haematology*. 2009;145(6):709-27.
7. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008;112(2):277-86.
8. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2016;4(1):38-59.
9. Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency: an update. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(5):223.
10. Park JH, Levinson AI. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical immunology*. 2010;134(2):97-103.
11. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of medical genetics*. 2016;53(9):575-90.
12. Vorechovsky I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster AD, Bjorkander J, et al. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clinical immunology and immunopathology*. 1995;77(2):185-92.
13. Schroeder HW, Jr., Zhu ZB, March RE, Campbell RD, Berney SM, Nedospasov SA, et al. Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA-DR3, -B8, -A1 haplotypes. *Molecular medicine*. 1998;4(2):72-86.
14. Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(6):1360-7 e6.
15. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology*. 2002;20:29-53.

16. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397(6716):263-6.
17. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature immunology*. 2003;4(3):261-8.
18. Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, et al. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical immunology*. 2004;113(3):234-40.
19. Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, et al. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *Journal of immunology*. 2009;182(9):5515-27.
20. Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*. 1992;256(5053):105-7.
21. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England journal of medicine*. 2006;354(18):1901-12.
22. Kanegane H, Agematsu K, Futatani T, Sira MM, Suga K, Sekiguchi T, et al. Novel mutations in a Japanese patient with CD19 deficiency. *Genes and immunity*. 2007;8(8):663-70.
23. Vince N, Boutboul D, Mouillot G, Just N, Peralta M, Casanova JL, et al. Defects in the CD19 complex predispose to glomerulonephritis, as well as IgG1 subclass deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(2):538-41 e1-5.
24. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagen T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(3):801-10 e6.
25. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(10):1453-66.
26. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Bohm J, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(33):13945-50.
27. Losi CG, Silini A, Fiorini C, Soresina A, Meini A, Ferrari S, et al. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology*. 2005;25(5):496-502.
28. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature genetics*. 2005;37(8):820-8.
29. Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nature genetics*. 2007;39(4):430-1.
30. Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G, et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(5):1178-85.
31. Almejun MB, Cols M, Zelazko M, Oleastro M, Cerutti A, Opezzo P, et al. Naturally occurring mutation affecting the MyD88-binding site of TNFRSF13B impairs triggering of class switch recombination. *European journal of immunology*. 2013;43(3):805-14.

32. Pan-Hammarstrom Q, Salzer U, Du L, Bjorkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nature genetics*. 2007;39(4):429-30.
33. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *American journal of human genetics*. 2012;90(6):986-1001.
34. Burns SO, Zenner HL, Plagnol V, Curtis J, Mok K, Eisenhut M, et al. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(6):1428-32.
35. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322(5899):271-5.
36. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature medicine*. 2014;20(12):1410-6.
37. Goldacker S, Warnatz K. Tackling the heterogeneity of CVID. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005;5(6):504-9.
38. Glocker E, Ehl S, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency in children. *Current opinion in pediatrics*. 2007;19(6):685-92.
39. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*. 2004;104(8):2441-3.
40. Scott-Taylor TH, Green MR, Eren E, Webster AD. Monocyte derived dendritic cell responses in common variable immunodeficiency. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138(3):484-90.
41. Cunningham-Rundles C, Radigan L, Knight AK, Zhang L, Bauer L, Nakazawa A. TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *Journal of immunology*. 2006;176(3):1978-87.
42. Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramon S, et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(2):349-56, 56 e1-3.
43. Wher C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77-85.
44. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, 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(5):1544-51.
45. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *Journal of clinical immunology*. 2003;23(5):385-400.
46. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert review of clinical immunology*. 2009;5(5):557-64.
47. Levy Y, Gupta N, Le Deist F, Garcia C, Fischer A, Weill JC, et al. Defect in IgV gene somatic hypermutation in common variable immuno-deficiency syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(22):13135-40.
48. Bonhomme D, Hammarstrom L, Webster D, Chapel H, Hermine O, Le Deist F, et al. Impaired antibody affinity maturation process characterizes a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Journal of immunology*. 2000;165(8):4725-30.

49. Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter HH, et al. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *Journal of immunology*. 2005;175(8):5498-503.
50. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2008;74(5):261-71.
51. Mouillot G, Carmagnat M, Gerard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(5):746-55.
52. Isgro A, Marziali M, Mezzaroma I, Luzi G, Mazzone AM, Guazzi V, et al. Bone marrow clonogenic capability, cytokine production, and thymic output in patients with common variable immunodeficiency. *Journal of immunology*. 2005;174(8):5074-81.
53. De Vera MJ, Al-Harthi L, Gewurz AT. Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2004;93(5):478-84.
54. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *Journal of immunology*. 2007;178(6):3932-43.
55. Raeiszadeh M, Kopycinski J, Paston SJ, Diss T, Lowdell M, Hardy GA, et al. The T cell response to persistent herpes virus infections in common variable immunodeficiency. *Clinical and experimental immunology*. 2006;146(2):234-42.
56. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, Muller F, Aukrust P, et al. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clinical and experimental immunology*. 2007;147(3):521-5.
57. Yu GP, Chiang D, Song SJ, Hoyte EG, Huang J, Vanisharn C, et al. Regulatory T cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. *Clinical immunology*. 2009;131(2):240-53.
58. Arumugakani G, Wood PM, Carter CR. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21lo B lymphocytes. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(2):292-300.
59. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clinical and experimental immunology*. 2012;170(2):202-11.
60. Malphettes M, Gerard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, et al. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(9):1329-38.
61. Gathmann B, Mahlaoui N, Ceredih, Gerard L, Oksenhendler E, Warnatz K, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(1):116-26.
62. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clinical immunology*. 1999;92(1):34-48.
63. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology*. 2007;27(3):308-16.
64. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;119(7):1650-7.

65. Rudge P, Webster AD, Revesz T, Warner T, Espanol T, Cunningham-Rundles C, et al. Encephalomyelitis in primary hypogammaglobulinaemia. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 ( Pt 1):1-15.
66. Franz A, Webster AD, Furr PM, Taylor-Robinson D. Mycoplasmal arthritis in patients with primary immunoglobulin deficiency: clinical features and outcome in 18 patients. *British journal of rheumatology*. 1997;36(6):661-8.
67. Pipitone N, Fioravanti A, Marcolongo R, Pitzalis C. [Articular involvement in the course of primary hypogammaglobulinemia]. *Recenti progressi in medicina*. 2001;92(1):63-7.
68. Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin ME, Ma X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity--an inconvenient truth. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(8):858-64.
69. Michel M, Chanet V, Galicier L, Ruivard M, Levy Y, Hermine O, et al. Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine*. 2004;83(4):254-63.
70. Yong PF, Tarzi M, Chua I, Grimbacher B, Chee R. Common variable immunodeficiency: an update on etiology and management. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008;28(2):367-86, ix-x.
71. Venhoff N, Emmerich F, Neagu M, Salzer U, Koehn C, Driever S, et al. The role of HLA DQ2 and DQ8 in dissecting celiac-like disease in common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(5):909-16.
72. Malamut G, Verkarre V, Suarez F, Viallard JF, Lascaux AS, Cosnes J, et al. The enteropathy associated with common variable immunodeficiency: the delineated frontiers with celiac disease. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(10):2262-75.
73. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(4):658-64.
74. Malamut G, Zioli M, Suarez F, Beaugrand M, Viallard JF, Lascaux AS, et al. Nodular regenerative hyperplasia: the main liver disease in patients with primary hypogammaglobulinemia and hepatic abnormalities. *Journal of hepatology*. 2008;48(1):74-82.
75. Gompels MM, Hodges E, Lock RJ, Angus B, White H, Larkin A, et al. Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study. *Clinical and experimental immunology*. 2003;134(2):314-20.
76. Gobert D, Bussel JB, Cunningham-Rundles C, Galicier L, Dechartres A, Berezne A, et al. Efficacy and safety of rituximab in common variable immunodeficiency-associated immune cytopenias: a retrospective multicentre study on 33 patients. *British journal of haematology*. 2011;155(4):498-508.
77. Ardeniz O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clinical immunology*. 2009;133(2):198-207.
78. Boursiquot JN, Gerard L, Malphettes M, Fieschi C, Galicier L, Boutboul D, et al. Granulomatous disease in CVID: retrospective analysis of clinical characteristics and treatment efficacy in a cohort of 59 patients. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(1):84-95.
79. Hurst JR, Verma N, Lowe D, Baxendale HE, Jolles S, Kelleher P, et al. British Lung Foundation/United Kingdom Primary Immunodeficiency Network Consensus Statement on the Definition, Diagnosis, and Management of Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2017;5(4):938-45.
80. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(2):415-21.
81. Horn J, Manguiat A, Berglund LJ, Knerr V, Tahami F, Grimbacher B, et al. Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with common variable immunodeficiency. *Clinical and experimental immunology*. 2009;156(3):446-54.

82. Leone P, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. Common Variable Immunodeficiency and Gastric Malignancies. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2).
83. Garcia-Lloret M, McGhee S, Chatila TA. Immunoglobulin replacement therapy in children. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008;28(4):833-49, ix.
84. Sachs UJ, Socher I, Braeunlich CG, Kroll H, Bein G, Santoso S. A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunology*. 2006;119(1):83-9.
85. Abolhassani H, Sagvand BT, Shokuhfar T, Mirminachi B, Rezaei N, Aghamohammadi A. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. *Expert review of clinical immunology*. 2013;9(6):561-74; quiz 75.
86. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. 2010;116(1):7-15.
87. Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;109(6):1001-4.
88. Lucas M, Lee M, Lortan J, Lopez-Granados E, Misbah S, Chapel H. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(6):1354-60 e4.
89. Shapiro RS. Subcutaneous immunoglobulin therapy given by subcutaneous rapid push vs infusion pump: a retrospective analysis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2013;111(1):51-5.
90. Roifman CM, Levison H, Gelfand EW. High-dose versus low-dose intravenous immunoglobulin in hypogammaglobulinaemia and chronic lung disease. *Lancet*. 1987;1(8541):1075-7.
91. de Gracia J, Vendrell M, Alvarez A, Pallisa E, Rodrigo MJ, de la Rosa D, et al. Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency. *International immunopharmacology*. 2004;4(6):745-53.
92. Stirling RG. Primary immunodeficiency: a call for multidisciplinary care. *Lancet*. 2008;372(9653):1877-8.
93. Chua I, Lagos M, Charalambous BM, Workman S, Chee R, Grimbacher B. Pathogen-specific IgG antibody levels in immunodeficient patients receiving immunoglobulin replacement do not provide additional benefit to therapeutic management over total serum IgG. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(6):1410-1.
94. Junker AK, Bonilla FA, Sullivan KE. How to flee the flu. *Clinical immunology*. 2004;112(3):219-20.
95. Inmunizaciones. MdSPDEUd. Personas con IDP. Guía Nacional de Vacunación en Situaciones Especiales. Montevideo: MSP; 2018. p. 96-111.
96. Wong GK, Goldacker S, Winterhalter C, Grimbacher B, Chapel H, Lucas M, et al. Outcomes of splenectomy in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a survey of 45 patients. *Clinical and experimental immunology*. 2013;172(1):63-72.
97. Chua I, Standish R, Lear S, Harbord M, Eren E, Raeiszadeh M, et al. Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy for severe enteropathy in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and experimental immunology*. 2007;150(2):306-11.
98. Wehr C, Gennery AR, Lindemans C, Schulz A, Hoenig M, Marks R, et al. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(4):988-97 e6.
99. Yong PF, Thaventhiran JE, Grimbacher B. "A rose is a rose is a rose," but CVID is Not CVID common variable immune deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Advances in immunology*. 2011;111:47-107.
100. Blom BS, H. Development of human lymphoid cells. 2006;24:287-320.

101. Lieber M. Antibody diversity: a link between switching and hypermutation. *Current biology* : CB. 2000;10(21):R798-800.
102. Zhang Z, Espinoza CR, Yu Z, Stephan R, He T, Williams GS, et al. Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nature immunology*. 2006;7(6):616-24.
103. Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunological reviews*. 2005;203:216-34.
104. Boisson B, Wang YD, Bosompem A, Ma CS, Lim A, Kochetkov T, et al. A recurrent dominant negative E47 mutation causes agammaglobulinemia and BCR(-) B cells. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4781-5.
105. Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, et al. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Current biology* : CB. 2001;11(19):1547-52.
106. Victoria GD, Nussenzweig MC, cartographers. *Germinal Centers*2012.
107. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):137-48.
108. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104(12):3647-54.
109. Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(7):939-45.
110. Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, et al. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(2):412-7.
111. MacLennan IC. Germinal centers. *Annual review of immunology*. 1994;12:117-39.
112. Schebesta MH, B; Busslinger, M. Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol* 2002;14(2):216-23.
113. Kenter AL. Class-switch recombination: after the dawn of AID. *Current opinion in immunology*. 2003;15(2):190-8.
114. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends in immunology*. 2002;23(1):31-9.
115. Puga IC, A.; Monteseratt, C. Modulación del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas por señales del sistema inmunitario innato. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2014;15(1):11-8.
116. Xu Y. DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(4):261-70.
117. Durandy AKS. Immunoglobulin class-switch recombination deficiencies. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(4):218.
118. Tangye SG, Hodgkin PD. Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses. *Immunology*. 2004;112(4):509-20.
119. Ochtrop ML, Goldacker S, May AM, Rizzi M, Draeger R, Hauschke D, et al. T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood*. 2011;118(2):309-18.
120. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallesse EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*. 2001;412(6844):300-7.
121. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(3):230-42.

122. Sciammas R, Davis MM. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *Journal of immunology*. 2004;172(9):5427-40.
123. Igarashi K, Ochiai K, Muto A. Architecture and dynamics of the transcription factor network that regulates B-to-plasma cell differentiation. *Journal of biochemistry*. 2007;141(6):783-9.
124. Oppezzo P, Dumas G, Lalanne AI, Payelle-Brogard B, Magnac C, Pritsch O, et al. Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;105(6):2495-503.
125. Gonda H, Sugai M, Nambu Y, Katakai T, Agata Y, Mori KJ, et al. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(9):1427-37.
126. Urbanek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*. 1994;79(5):901-12.
127. Horcher M, Souabni A, Busslinger M. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity*. 2001;14(6):779-90.
128. Revilla IDR, Bilic I, Vilagos B, Tagoh H, Ebert A, Tamir IM, et al. The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *The EMBO journal*. 2012;31(14):3130-46.
129. Kaneko H, Ariyasu T, Inoue R, Fukao T, Kasahara K, Teramoto T, et al. Expression of Pax5 gene in human haematopoietic cells and tissues: comparison with immunodeficient donors. *Clinical and experimental immunology*. 1998;111(2):339-44.
130. Tijchon E, Havinga J, van Leeuwen FN, Scheijen B. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. *Leukemia*. 2013;27(3):541-52.
131. Murre C. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nature immunology*. 2005;6(11):1079-86.
132. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell*. 1994;79(5):875-84.
133. Kee BL, Quong MW, Murre C. E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunological reviews*. 2000;175:138-49.
134. de Pooter RF, Kee BL. E proteins and the regulation of early lymphocyte development. *Immunological reviews*. 2010;238(1):93-109.
135. Kwon K, Hutter C, Sun Q, Bilic I, Cobaleda C, Malin S, et al. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*. 2008;28(6):751-62.
136. Schoetz U, Cervelli M, Wang YD, Fiedler P, Buerstedde JM. E2A expression stimulates Ig hypermutation. *Journal of immunology*. 2006;177(1):395-400.
137. Wallenius A, Hauser J, Aas PA, Sarno A, Kavli B, Krokan HE, et al. Expression and recruitment of uracil-DNA glycosylase are regulated by E2A during antibody diversification. *Molecular immunology*. 2014;60(1):23-31.
138. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*. 1994;77(2):297-306.
139. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
140. Costa CZ, da Rosa SE, de Camargo MM. The unfolded protein response: how protein folding became a restrictive aspect for innate immunity and B lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;73(5):436-48.

141. Kuribayashi JS, Bombardieri CR, Baracho GV, Aliberti J, Machado FS, Kalil J, et al. Slower rescue of ER homeostasis by the unfolded protein response pathway associated with common variable immunodeficiency. *Molecular immunology*. 2008;45(10):2990-7.
142. Morito D, Nagata K. ER Stress Proteins in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*. 2012;3:48.
143. Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, Potter J, Shahinian A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science*. 1997;275(5299):540-3.
144. Cattoretti G, Shaknovich R, Smith PM, Jack HM, Murty VV, Alobeid B. Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *Journal of immunology*. 2006;177(10):6930-9.
145. De Silva NS, Simonetti G, Heise N, Klein U. The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunological reviews*. 2012;247(1):73-92.
146. Bravo Garcia-Morato M, Aracil Santos FJ, Briones AC, Blazquez Moreno A, Del Pozo Mate A, Dominguez-Soto A, et al. New human combined immunodeficiency caused by interferon regulatory factor 4 (IRF4) deficiency inherited by uniparental isodisomy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(5):1924-7 e18.
147. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunologic research*. 2011;50(1):87-96.
148. Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW, Geha RS. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *International immunology*. 2004;16(3):395-404.
149. Taraldsrud E, Fevang B, Jorgensen SF, Moltu K, Hilden V, Tasken K, et al. Defective IL-4 signaling in T cells defines severe common variable immunodeficiency. *Journal of autoimmunity*. 2017;81:110-9.
150. Quong MW, Harris DP, Swain SL, Murre C. E2A activity is induced during B-cell activation to promote immunoglobulin class switch recombination. *The EMBO journal*. 1999;18(22):6307-18.
151. Roberts EC, Deed RW, Inoue T, Norton JD, Sharrocks AD. Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(2):524-33.
152. Driessen GJ, van Zelm MC, van Hagen PM, Hartwig NG, Trip M, Warris A, et al. B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiological backgrounds in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2011;118(26):6814-23.
153. Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, Dumas G, Magnac C, Payelle-Brogard B, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. 2003;101(10):4029-32.
154. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82.
155. Jeppson JD, Patel HR, Sakata N, Domenico J, Terada N, Gelfand EW. Requirement for dual signals by anti-CD40 and IL-4 for the induction of nuclear factor-kappa B, IL-6, and IgE in human B lymphocytes. *Journal of immunology*. 1998;161(4):1738-42.
156. Xu Z, Pone EJ, Al-Qahtani A, Park SR, Zan H, Casali P. Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Critical reviews in immunology*. 2007;27(4):367-97.
157. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Benhsaien I, Mahlaoui N, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(1):1-7.
158. Park JH, Resnick ES, Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1246:41-9.

159. Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review. *The American journal of surgical pathology*. 2007;31(12):1800-12.
160. Fuss IJ, Friend J, Yang Z, He JP, Hooda L, Boyer J, et al. Nodular regenerative hyperplasia in common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(4):748-58.
161. Mellekjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clinical and experimental immunology*. 2002;130(3):495-500.
162. Ameratunga R, Woon ST, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for CVID. *Expert review of clinical immunology*. 2014;10(2):183-6.
163. Piatosa B, Pac M, Siewiera K, Pietrucha B, Klaudel-Dreszler M, Heropolitanska-Pliszka E, et al. Common variable immune deficiency in children--clinical characteristics varies depending on defect in peripheral B cell maturation. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(4):731-41.
164. Buchbinder D, Baker R, Lee YN, Ravell J, Zhang Y, McElwee J, et al. Identification of patients with RAG mutations previously diagnosed with common variable immunodeficiency disorders. *Journal of clinical immunology*. 2015;35(2):119-24.
165. Jorgensen SF, Fevang B, Aukrust P. Autoimmunity and Inflammation in CVID: a Possible Crosstalk between Immune Activation, Gut Microbiota, and Epigenetic Modifications. *Journal of clinical immunology*. 2019;39(1):30-6.
166. Treiber T, Mandel EM, Pott S, Gyory I, Firner S, Liu ET, et al. Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription-independent poisoning of chromatin. *Immunity*. 2010;32(5):714-25.
167. Hagman J, Lukin K. Transcription factors drive B cell development. *Current opinion in immunology*. 2006;18(2):127-34.
168. Tallmadge RL, Such KA, Miller KC, Matychak MB, Felipe MJ. Expression of essential B cell development genes in horses with common variable immunodeficiency. *Molecular immunology*. 2012;51(2):169-76.
169. Del Pino-Molina L, Rodriguez-Ubreva J, Torres Canizales J, Coronel-Diaz M, Kulis M, Martin-Subero JI, et al. Impaired CpG Demethylation in Common Variable Immunodeficiency Associates With B Cell Phenotype and Proliferation Rate. *Frontiers in immunology*. 2019;10:878.
170. Hauser J, Grundstrom C, Kumar R, Grundstrom T. Regulated localization of an AID complex with E2A, PAX5 and IRF4 at the Igh locus. *Molecular immunology*. 2016;80:78-90.
171. Almejun MB, Campos BC, Patino V, Galicchio M, Zelazko M, Oleastro M, et al. Noninfectious complications in patients with pediatric-onset common variable immunodeficiency correlated with defects in somatic hypermutation but not in class-switch recombination. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;139(3):913-22.
172. Hu CC, Dougan SK, McGehee AM, Love JC, Ploegh HL. XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *The EMBO journal*. 2009;28(11):1624-36.
173. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology*. 2006;7(7):773-82.
174. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*. 2013;38(5):918-29.
175. Podjasek JC, Abraham RS. Autoimmune cytopenias in common variable immunodeficiency. *Frontiers in immunology*. 2012;3:189.

176. Beck K, Peak MM, Ota T, Nemazee D, Murre C. Distinct roles for E12 and E47 in B cell specification and the sequential rearrangement of immunoglobulin light chain loci. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(10):2271-84.
177. Kralickova P, Milota T, Litzman J, Malkusova I, Jilek D, Petanova J, et al. CVID-Associated Tumors: Czech Nationwide Study Focused on Epidemiology, Immunology, and Genetic Background in a Cohort of Patients With CVID. *Frontiers in immunology*. 2018;9:3135.
178. Shoda H, Fujio K, Shibuya M, Okamura T, Sumitomo S, Okamoto A, et al. Detection of autoantibodies to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patients and pro-inflammatory role of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(6):R191.
179. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):380-6.
180. Hirabayashi Y, Oka Y, Ikeda T, Fujii H, Ishii T, Sasaki T, et al. The endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, is a potential triggering antigen for anti-DNA response. *Journal of immunology*. 2010;184(6):3276-83.
181. De S, Barnes BJ. B cell transcription factors: Potential new therapeutic targets for SLE. *Clinical immunology*. 2014;152(1-2):140-51.

## Lista de abreviaturas

<b>AD</b>	autosómico dominante
<b>Ag</b>	antígeno
<b>AI</b>	autoinmunidad
<b>AID</b>	“activation-induced cytidine deaminase”
<b>APRIL</b>	“a proliferation-inducing ligand”
<b>AR</b>	autosómico recesivo
<b>APC</b>	“antigen presenting cells”
<b>BTK</b>	“bruton tyrosine kinase”
<b>BAFF</b>	“b-cell activating factor”
<b>BAFF-R</b>	“b-cell activating factor receptor”
<b>BCL-6</b>	“b cell lymphoma 6”
<b>BCR</b>	“b cell receptor”
<b>BLIMP-1</b>	“B lymphocyte-induced maturation protein 1”
<b>BQT</b>	bronquiectasias
<b>CD4</b>	“cluster of differentiation 4”
<b>CD19</b>	“cluster of differentiation 19”
<b>CD27</b>	“cluster of differentiation 27”
<b>CD40L</b>	“cluster of differenttion 40 ligando”
<b>CD138</b>	“cluster of differentiation 138”
<b>CD21<sup>low</sup></b>	“cluster of diffrentation 21” con baja intensidad de expresión
<b>CG</b>	centro germinal
<b>CI</b>	conmutación isotípica
<b>CPH</b>	célula progenitora hematopoyética
<b>CpG</b>	“CpG oligodeoxynucleotides”
<b>CTLA4</b>	“citotoxic T lymphocyte antigen-4”
<b>DE</b>	desvío estándar
<b>DS</b>	donante sano
<b>DSIgA</b>	deficiencia selectiva de IgA
<b>EBV</b>	virus de <i>Epstein Barr</i>
<b>E2A</b>	“e-box transcription factor”
<b>EBF1</b>	“early B-cell factor1”
<b>FT</b>	factores de transcripción
<b>GLILD</b>	“granulomatous lymphocytic interstitial lung disease”
<b>HIV</b>	virus de inmunodeficiencia humana
<b>HLA</b>	human leucocyte antigen
<b>HS</b>	hipermutación somática
<b>HSC</b>	“ hematopoyetic stem cells”
<b>IDP</b>	inmunodeficiencia primaria
<b>IDCV</b>	inmunodeficiencia común variable
<b>ICOS</b>	“inducible co-stimulator”
<b>ID-2</b>	“inhibidor of DNA binding-2”
<b>IgA</b>	inmunoglobulina A
<b>IgD</b>	inmunoglobulina D
<b>IgE</b>	inmunoglobulina E
<b>IgM</b>	inmunoglobulina M

<b>IgG</b>	inmunoglobulina G
<b>IL-12</b>	interleuquina 12
<b>IL-4</b>	interleuquina 4
<b>IL-10</b>	interleuquina 10
<b>IL-7R</b>	receptor de IL-7
<b>IRF-4</b>	"interferon-regulatory factor 4"
<b>IRF2BP2</b>	"interferon regulatory factor 2 binding protein 2"
<b>IKZF1</b>	"ikaros family zinc finger 1"
<b>LB</b>	linfocito B
<b>LNH</b>	linfoma no hodgkin
<b>LRBA</b>	"lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein"
<b>LT</b>	linfocito T
<b>LT<sub>FH</sub></b>	LT "follicular helper"
<b>MMR</b>	"mismatch repair machinery"
<b>MO</b>	médula ósea
<b>NIL</b>	neumonitis intersticial linfoide
<b>NF-κB1</b>	"nuclear factor Kβ subunit 1"
<b>NF-κB2</b>	"nuclear factor Kβ subunit 2"
<b>MyD88</b>	"MYD88 innate immune signal transduction adaptor"
<b>PAX-5</b>	"paired box family 5"
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cell
<b>PI3K</b>	"phosphatidylinositol-3-kinases"
<b>PLCγ2</b>	"phospholipase c gamma 2"
<b>PLC</b>	"precursor linfoide común"
<b>smBcells</b>	"switch memory B cells"
<b>STAT-6</b>	"signal transducer and activator of transcription 6"
<b>SH2D1A</b>	"sh2 domain containing 1A"
<b>TAC1</b>	"transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor"
<b>TLR</b>	"toll like receptor"
<b>TNFRSF13C</b>	"tumor necrosis factor superfamily receptor 13C"
<b>TPH</b>	transplante de precursores hematopoyéticos
<b>UPR</b>	"unfolded protein response"
<b>UNG</b>	"uracil-N-glycosylase"
<b>XLA</b>	"X-linked agammaglobulinemia"
<b>XBP-1</b>	"x-box-binding protein 1"

## ANEXO I

“Non infectious complications in pediatric-onset CVID patients correlated with defects in somatic hypermutation but not in class switch recombination”

Almejún B<sup>a</sup>, Campos B<sup>b</sup>, **Patiño V<sup>c</sup>**, Galicchio M<sup>d</sup>, Zelazko M<sup>a</sup>, Oleatro M<sup>a</sup>, Oppezco P<sup>c</sup>, Danielian S<sup>a</sup>.  
J Allergy Clin Immunol. 2017; 139(3): 913-922.

<sup>a</sup>Servicio de Inmunología y Reumatología y Coordinación de Laboratorio, Hospital Nacional de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”, Buenos Aires; <sup>c</sup> Unidad de Proteínas Recombinantes, Instituto Pasteur, Montevideo; y <sup>d</sup>Hospital de Niños Víctor J. Vilela, Rosario, Santa Fé.

# Noninfectious complications in patients with pediatric-onset common variable immunodeficiency correlated with defects in somatic hypermutation but not in class-switch recombination



María Belén Almejún, PhD,<sup>a</sup> Bárbara Carolina Campos,<sup>b</sup> Virginia Patiño, MD,<sup>c</sup> Miguel Galicchio, MD,<sup>d</sup> Marta Zelazko, MD,<sup>a</sup> Matías Oleastro, MD,<sup>a</sup> Pablo Oppezzo, PhD,<sup>c</sup> and Silvia Danielian, PhD<sup>a</sup> *Buenos Aires and Santa Fé, Argentina, and Montevideo, Uruguay*

**Background:** Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous syndrome characterized by impaired immunoglobulin production and usually presents with a normal quantity of peripheral B cells. Most attempts aiming to classify these patients have mainly been focused on T- or B-cell phenotypes and their ability to produce protective antibodies, but it is still a major challenge to find a suitable classification that includes the clinical and immunologic heterogeneity of these patients.

**Objective:** In this study we evaluated the late stages of B-cell differentiation in a heterogeneous population of patients with pediatric-onset CVID to clinically correlate and assess their ability to perform somatic hypermutation (SHM), class-switch recombination (CSR), or both.

**Methods:** We performed a previously reported assay, the restriction enzyme hotspot mutation assay (I $\kappa$ CREHMA), to evaluate *in vivo* SHM status. We amplified switch regions from genomic DNA to investigate the quality of the double-strand break repairs in the class-switch recombination process *in vivo*. We also tested the ability to generate immunoglobulin germline and circle transcripts and to upregulate the activation-induced cytidine deaminase gene through *in vitro* T-dependent and T-independent stimuli.

**Results:** Our results showed that patients could be classified into 2 groups according to their degree of SHM alteration. This stratification showed a significant association between patients of group A, severe alteration, and the presence of noninfectious complications. Additionally, 60% of patients presented with increased microhomology use at switched regions. *In vitro*

activation revealed that patients with CVID behaved heterogeneously in terms of responsiveness to T-dependent stimuli. **Conclusions:** The correlation between noninfectious complications and SHM could be an important tool for physicians to further characterize patients with CVID. This categorization would help to improve elucidation of the complex mechanisms involved in B-cell differentiation pathways. (*J Allergy Clin Immunol* 2017;139:913-22.)

**Key words:** Common variable immunodeficiency, somatic hypermutation, class-switch recombination, hypermutation, pediatric, switch

The hypogammaglobulinemia of at least 2 immunoglobulin isotypes characterizes the heterogeneous group of the primary immunodeficiency disorder known as common variable immunodeficiency (CVID; OMIM #240500).<sup>1-5</sup> These patients are particularly susceptible to recurrent infections of the respiratory tract, as well as the gastrointestinal system, and manifest noninfectious complications, such as autoimmunity, gastrointestinal disorders, and lymphoproliferation.<sup>1,5</sup>

Despite the rarity of this condition, CVID is the most common immunodeficiency of clinical significance whose main immunologic defect, the failure of immunoglobulin production, is usually associated with a normal peripheral B-cell counts.<sup>1,5</sup> Genetic defects associated with survival, differentiation, and/or immune interactions of B cells have been proposed to be responsible for the pathophysiology of the disease. Several attempts aiming to classify patients with CVID have mainly focused on T- or B-cell phenotypes and their ability to produce protective antibodies,<sup>2,6,7</sup> but it is still a major challenge to find a suitable classification that includes the clinical and immunologic heterogeneity of these patients and their variable response to treatment. The plasma IgG level has poor predictive value in patients with CVID because patients with slightly decreased IgG levels can be highly susceptible to infections and benefit from replacement with intravenous gammaglobulin therapy.<sup>8</sup> Nevertheless, the molecular mechanisms underlying the maturation of the antibody response triggered by natural infections and vaccines have been poorly investigated in these patients.

During somatic hypermutation (SHM), point mutations are introduced into the V region of immunoglobulin genes (both IgH as IgL), increasing antibody affinity for the antigen, and this process is essential for the generation of long-lived plasma and memory B cells.<sup>9-11</sup> Failure in the affinity maturation process of

From <sup>a</sup>Servicio de Inmunología y Reumatología and <sup>b</sup>Coordinación de Laboratorio, Hospital Nacional de Pediatría Prof. Dr Juan P. Garrahan, Buenos Aires; <sup>c</sup>Unidad de Proteínas Recombinantes, Instituto Pasteur, Montevideo; and <sup>d</sup>Hospital de Niños Víctor J. Vilela, Rosario, Santa Fé.

Supported by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT2004 No 21235).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication January 13, 2015; revised August 3, 2016; accepted for publication August 10, 2016.

Available online October 3, 2016.

Corresponding author: María Belén Almejún, PhD, Hospital Nacional de Pediatría Prof. Dr Juan P. Garrahan, Servicio de Inmunología y Reumatología, CABA 1245, Argentina. E-mail: [mbalmejún@gmail.com](mailto:mbalmejún@gmail.com).

 The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749/\$36.00

© 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.030>

**Abbreviations used**

AICDA:	Activation-induced cytidine deaminase
Bcl-6:	B-cell lymphoma 6
CSR:	Class-switch recombination
CT:	Circle transcript
CVID:	Common variable immunodeficiency
DSB:	Double-strand break
GLT:	Germline transcript
IgκREHMA:	Restriction enzyme hotspot mutation assay
NHEJ:	Nonhomologous end joining
SHM:	Somatic hypermutation
TD:	T-dependent
TI:	T-independent

all isotypes of antibodies could underlie a qualitative humoral immunodeficiency. In previous reports impaired SHM was associated with a high frequency of severe respiratory tract infections in a cohort of mainly adult patients with CVID.<sup>12</sup> In addition, antibody response maturation also requires the class-switch recombination (CSR) process, in which the C $\mu$  region is replaced by a downstream immunoglobulin CH gene, resulting in a change from IgM to IgG, IgA, or IgE, a mechanism involving S regions located upstream of each CH except C $\delta$ .<sup>13</sup>

Both SHM and CSR are dependent on activation-induced cytidine deaminase (AICDA) function, an enzyme expressed in antigen-activated B cells that generates high-affinity antibodies and antibody CSR, respectively.<sup>14</sup> To achieve CSR, AICDA generates double-strand breaks (DSBs) mainly repaired through a nonhomologous end-joining (NHEJ) mechanism<sup>15</sup> by using little or no sequence homology. The NHEJ machinery requires a large number of factors (eg, Ku70/Ku80, DNA-PKcs, DNA ligase IV, Artemis and Cernunnos),<sup>16-20</sup> and defects in this mechanism lead to alternative pathways (eg, use of microhomology) in an attempt to repair DSBs at the S junctions, as shown in patients with primary immunodeficiencies involving defects in NHEJ genes.<sup>21,22</sup>

In this study we evaluated the capacity to perform SHM and CSR *ex vivo* and *in vitro* in a population of patients with pediatric-onset CVID whose immunologic and clinical data were previously reported,<sup>23</sup> allowing us to propose 3 different subsets of patients with CVID.

**METHODS****Patients and control subjects**

This study included 25 unrelated patients with CVID (12 male patients) with a mean age of onset of symptoms of 5.6 years (range, 1-14 years) and a mean age of diagnosis of 11.3 years (range, 4-16.1 years). Mutations in the *CD40L*, *CD40*, *AICDA*, *UNG*, *PMS2*, *DCLRE1C* (ARTEMIS), and *DNA LIG4* genes were excluded in patients presenting with normal or with increased IgM levels. Patients with decreased peripheral B-cell counts were also excluded from the study. We considered patients as belonging to the smB<sup>+</sup> (switched memory B cells >2%) or smB<sup>-</sup> (switched memory B cells <2%) subgroups, depending on their B-cell immunophenotype, according to the EUROclass CVID classification.<sup>6</sup> These patients were previously reported (Patients Part B),<sup>23</sup> and the main clinical and immunologic data were summarized in Tables I and II. Informed written consent was obtained from the patient or parental guardian before participation in accordance with the Declaration of Helsinki.

Twenty-two healthy donors matched for age, sex (11 male donors), and ethnic background were included in the study and provided written consent under a separate ethics protocol for healthy donors. Five cord blood samples

were included as negative controls in the restriction enzyme hotspot mutation assay (IgκREHMA) and were donated after informed consent was obtained from the delivering women. The research protocol was approved by the internal ethics review board of the Hospital Garrahan.

**Total RNA preparation and cDNA synthesis**

Total RNA was extracted from PBMCs by using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif), and cDNA was prepared with a first-strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions.

RNA from memory and naive B-cell subsets was obtained by using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), whereas cDNA was prepared with SuperScript III (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

**Human cell isolation**

PBMCs were isolated by means of density centrifugation over a Ficoll-Hypaque Plus (Amersham) gradient. B cells from 7 patients and 4 healthy donors were purified from PBMCs by means of negative selection with the MACS B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Memory and naive B-cell subsets were purified from total B cells obtained by using the FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, Calif) with CD27-fluorescein isothiocyanate, IgD-phycoerythrin, and CD19-phycoerythrin-Cy7 (all from eBioscience, San Diego, Calif). All fractions were obtained with a purity of greater than 95%.

**Cell cultures and reagents**

Culture of PBMCs or naive B cells from patients with CVID or healthy donors was performed in complete RPMI medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS (Gibco, Grand Island, NY). In the T-dependent (TD) stimulation cells were incubated with 500 ng/mL CD40 ligand (CD40L; PeproTech, Rocky Hills, NJ) and 200 U/mL IL-4 (Schering-Plough, Kenilworth, NJ). CD40 was cross-linked with 1 μg/mL mouse 89 mAb (Schering-Plough). Mouse IgG<sub>1</sub> mAb with irrelevant binding activity (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex) was used as a control. In the T-independent (TI) stimulation cells were incubated with 5 μg/mL phosphorothioate-modified 5'-tcgtcgttttcgttttcgtt-3' oligodeoxynucleotide-2006 (Operon Technologies, Olive Branch, Miss) and 50 ng/mL IL-10 (PeproTech).

**RT-PCR and quantitative RT-PCR**

Quantification of human Iγ1-Cγ1 or Iα-Cα germline transcripts (GLT), switched Iγ1-Iγ2-Cμ or Iα-Cμ circle transcripts (CTs), AICDA transcript, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was performed from total RNA extraction in 2- or 4-day cultures with TRIzol (Invitrogen). cDNA was generated by mean of reverse transcription with Superscript II RT (Invitrogen). PCR primers and conditions used for standard or quantitative RT-PCR analysis were performed, as previously reported.<sup>24-26</sup> Results of qRT-PCR were normalized to *ACTB* mRNA and presented as relative expression compared with that of B cells incubated with control antibody.

**Characterization of SHM**

The IgκREHMA was performed, as previously described.<sup>12</sup>

**Characterization of switch recombination junctions**

Genomic DNA was purified from peripheral blood cells from patients and healthy donors by using standard methods. Amplification of Sμ-Sα from *in vivo* switched cells was performed by using a previously described nested PCR assay.<sup>21</sup> The PCR-amplified switch fragments were gel purified (GE Healthcare, Fairfield, Conn) and cloned into pGEM-T vector (Invitrogen), and sequence analysis was performed with DNA Sequencing Analysis software (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif) on an ABI 3130 (Applied Biosystems). CSR junctions were determined by aligning the

**TABLE I.** SHM measured by using IgκREHMA and its correlation with clinical and immunologic data

	No.*	IgκREHMA: % SHM†	Switched memory B cells‡	Nonswitched memory B cells§	EUROclass	Noninfectious complications	Age at the time of the sample (y)	Immunoglobulin serum levels#		
								IgG	IgA	IgM
Patient group A	1 (27)	2.8	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM	15.8	115	<7	18
	2 (6)	3.3	↓ (0%)	↓ (3%)	smB-		8.2	12	<7	10
	3 (13)	3.5	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	AI (T1D)	15.0	62	<7	33
	4 (15)	3.8	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-		12.9	220	<7	49
	5 (17)	4.0	↓ (0%)	↓ (7%)	smB-		13.5	193	<7	15
	6 (25)	5.8	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM	15.7	42	<7	10
	7 (10)	8.6	↓ (0%)	↓ (6%)	smB-		10.7	135	24	26
	8 (28)	8.7	↓ (2%)	Norm (15%)	smB-	AI (ITP/AIHA) and SPM	17.3	29	<7	145
	9 (21)	10.7	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-		15.1	352	<7	17
	10 (26)	10.8	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	GR and SPM	15.8	162	<7	32
	11 (7)	11.2	↓ (3%)	Norm (9%)	smB+		7.8	302	<7	13
	12 (9)	11.7	↓ (3%)	↑ (19%)	smB+		9.7	293	<7	28
	13 (20)	12.2	↓ (1%)	↓ (2%)	smB-	AI (ITP) and SPM	13.4	391	22	30
	14 (8)	12.6	↓ (1%)	↓ (3%)	smB-		7.2	456	<7	19
	15 (14)	13.1	↓ (0%)	↓ (1%)	smB-		12.7	495	<7	38
	16 (11)	14.8	↓ (2%)	↓ (2%)	smB-		10.9	75	<7	12
Patient group B	17 (22)	18.5	↓ (3%)	↓ (7%)	smB+		15.0	536	<7	43
	18 (18)	19.1	↓ (5%)	Norm (14%)	smB+		13.0	342	<7	18
	19 (23)	19.2	↓ (3%)	Norm (10%)	smB+		14.9	293	<7	25
	20 (5)	19.7	↓ (5%)	↓ (5%)	smB+		5.9	372	21	9
	21 (19)	20.6	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	GR	13.4	315	19	83
	22 (12)	22.1	↓ (2%)	Norm (9%)	smB-		11.1	452	12	36
	23 (4)	25.6	Norm (10%)	↓ (7%)	smB+		4.0	312	15	28
	24 (24)	26.0	↓ (2%)	↓ (0%)	smB-	AI (ITP)	14.9	435	11	33
	25 (16)	50.5	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	AI (ITP)	12.5	462	20	23
		<b>No.</b>	<b>IgκREHMA: mean % SHM†</b>			<b>Mean age at the time of the sample (y)</b>				
Healthy donors	22	45.9 ± 9.0 (range, 30.3-63.1)			10.5 (range, 2.2-17.4)					
Patients	25	14.5 ± 10.3 (range, 2.8-50.5)			12.3 (range, 4.0-17.3)					

‡ and §: ↓, decreased number; ↑, increased number; Norm, within normal range.

AI, Autoimmunity; AIHA, autoimmune hemolytic anemia; GR, granulomas; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura; SPM, splenomegaly; T1D, type 1 diabetes.

\*Patient number in a previous report<sup>20</sup> is shown in parentheses.

†Percentage of mutated fraction.

‡Switched memory B cells = CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> cells.

§Nonswitched memory B cells = CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> cells.

||smB+ indicates less than 2% of switched memory B cells, and smB- indicates 2% or less switched memory B cells.

#Immunoglobulin serum levels at the time of the sample (in milligrams per deciliter).

switched fragment sequences with Sμ (X54713) and Sα1 (L191219) or Sα2 (AF030305). Analysis of microhomology use and mutation patterns at CSR junctions was performed, as described previously.<sup>21,27</sup>

## Statistical analysis

Statistical analysis of results was performed with Student 2-tailed *t* tests by using Prism software (GraphPad Software, La Jolla, Calif), Spearman 2-tailed tests, or 1-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparison posttest. Frequencies of noninfectious complications among the groups were compared by using the  $\chi^2$  test. Other statistical analyses were performed with  $\chi^2$  tests with SPSS 15.0 software for Windows (IBM, Armonk, NY).

## RESULTS

### B cells of patients with CVID carry significantly diminished SHM

To evaluate the SHM levels in peripheral cells from our patients, we performed an assay developed by Andersen et al.<sup>12</sup> This assay is based on cleavage by using a restriction enzyme of a hotspot in the rearranged VκA27 transcripts (IgκREHMA).

Briefly, somatic mutations in the restriction sites of the most commonly used light chain gene (κA27) abrogate cutting with a specific enzyme. The variability observed in our healthy control group remained within the levels previously reported (Fig 1, A and B),<sup>12</sup> which did not seem to be modified by donor age greater than 2 years.

The comparison of our CVID patient group with the healthy donor group revealed a significant difference in mutations of the VκA27 gene ( $P < .0001$ , Student 2-tailed *t* test; Fig 1, A and B). At the same time, a heterogeneous behavior in undergoing SHM could be observed in the pediatric population with CVID (Fig 1, A and B), and this heterogeneity correlates with the percentage of switched memory B cells (Spearman  $r = 0.68$ ,  $P = .0002$ ; Fig 1, C) but not with total memory B cells or nonswitched memory B cells (data not shown).

Almost all of the patients (24/25) had decreased SHM values (Table I). Based on these results, a relevant cutoff could optimize the distinction of patients with clinical complications, reduced switched memory B-cell counts, or both. Thus we established 2 subgroups of patients with altered SHM: group A with

TABLE II. S $\mu$ -S $\alpha$  junction microhomology analysis and their correlation with clinical and immunologic data

No.	S $\mu$ -S $\alpha$ perfectly matched short homology*	No. of S $\mu$ -S $\alpha$ fragments analyzed	Switched memory B cells†	Nonswitched memory B cells‡	EUROclass§	Noninfectious complications
6	12.50 $\pm$ 2.65	11	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM
13	10.70 $\pm$ 6.38	10	↓ (1%)	↓ (2%)	smB-	AI (ITP) and SPM
4	9.71 $\pm$ 7.67	8	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	
7	9.17 $\pm$ 5.34	9	↓ (0%)	↓ (6%)	smB-	
10	8.93 $\pm$ 6.33	10	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	GR and SPM
25	8.75 $\pm$ 6.41	8	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	AI (ITP)
15	8.33 $\pm$ 6.75	10	↓ (0%)	↓ (1%)	smB-	
14	7.57 $\pm$ 5.08	10	↓ (1%)	↓ (3%)	smB-	
16	7.57 $\pm$ 2.15	8	↓ (2%)	↓ (2%)	smB-	
11	7.56 $\pm$ 3.68	9	↓ (3%)	Norm (9%)	smB+	
9	7.10 $\pm$ 4.48	11	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	
21	7.00 $\pm$ 3.92	8	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	GR
2	6.60 $\pm$ 5.46 (ns)	9	↓ (0%)	↓ (3%)	smB-	
3	6.43 $\pm$ 1.99 (ns)	9	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	AI (TID)
1	6.22 $\pm$ 4.38 (ns)	9	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM
24	4.89 $\pm$ 4.70 (ns)	10	↓ (2%)	↓ (0%)	smB-	AI (ITP)
17	4.71 $\pm$ 5.28 (ns)	8	↓ (3%)	↓ (7%)	smB+	
8	4.09 $\pm$ 4.37 (ns)	21	↓ (2%)	Norm (15%)	smB-	AI (ITP/AIHA) and SPM
18	3.92 $\pm$ 5.53 (ns)	9	↓ (5%)	Norm (14%)	smB+	
23	1.50 $\pm$ 1.76 (ns)	7	Norm (10%)	↓ (7%)	smB+	
Control subjects	2.28 $\pm$ 3.52	53				
Patients	6.95 $\pm$ 5.32¶	194				

† and ‡: ↓, Decreased number; ↑, increased number; *Norm*, within normal range.

AI, Autoimmunity; AIHA, autoimmune hemolytic anemia; GR, granulomas; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura; ns, not significant; SPM, splenomegaly; TID, type I diabetes.

\*Means and SDs from patients and control subjects.

†Switched memory B cells = CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> cells.

‡Nonswitched memory B cells = CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> cells.

§smB+ indicates less than 2% of switched memory B cells, and smB- indicates 2% or less switched memory B cells.

¶ $P < .0025$ , 2-tailed Student *t* test with the Bonferroni correction for multiple comparisons (the same was obtained by applying 1-way ANOVA, followed by the Dunnett multiple comparison posttest with the control treatment as statistical control in Dunnett comparisons).

¶¶ $P < .005$ , 2-tailed Student *t* test.

less than  $-3$  SDs with respect to the healthy control group ( $<18\%$  of the mutated fraction of V $\kappa$ A27) and group B with values ranging between  $-2$  and  $-3$  SDs compared with the healthy control group ( $\geq 18\%$  and  $<28\%$  of the mutated fraction, Table I). Only 1 patient (P25) had values greater than the reference interval of our healthy control group.

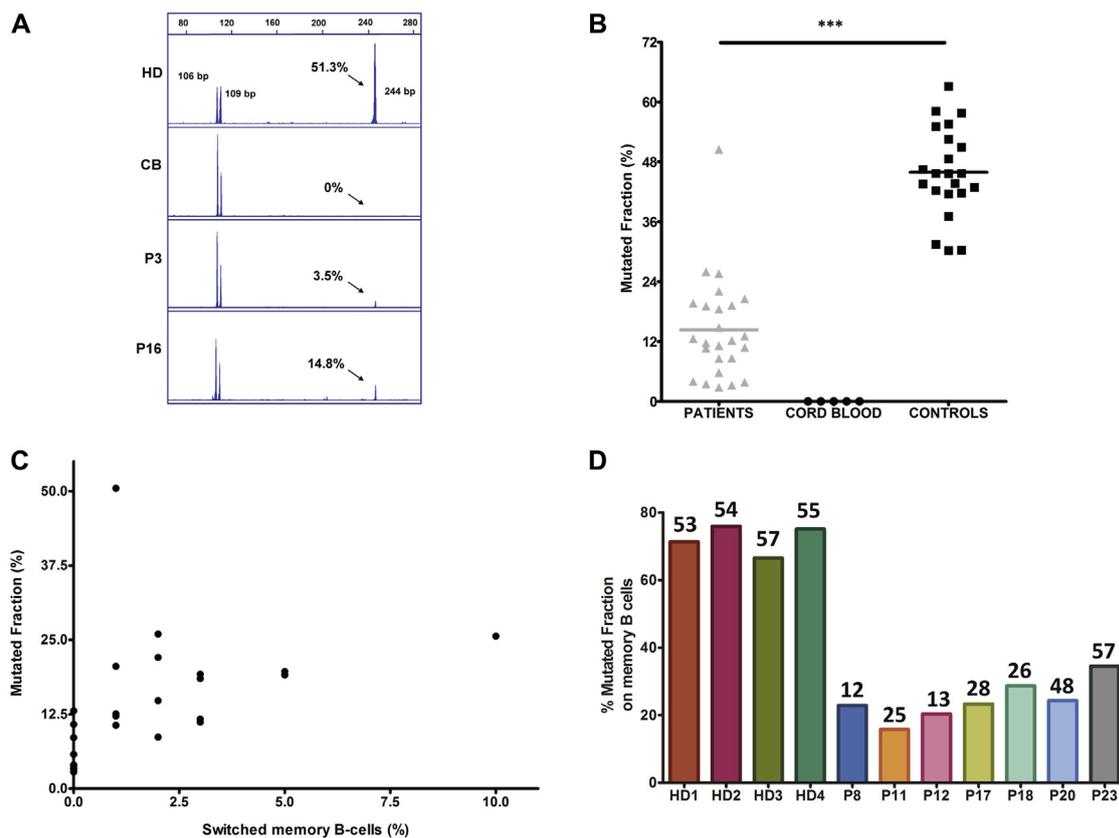
We can see that 88% (14/16) of the patients in group A had a low number of switched memory B cells ( $<2\%$ ) belonging to the so-called smB- group of EUROclass (see the Methods section), who also showed clinical complications or more severe presentation of the disease (ie, 6/9 patients with autoimmunity, splenomegaly, or granulomas fell into this group; Table I). On the other hand, 7 of the 8 patients in group B presented with CD27<sup>+</sup> B cell counts (total memory B cells) of greater than 5% of peripheral B lymphocytes, and 6 of them have remained thus far free of noninfectious complications (Table I). Interestingly, we found a significant association between patients of group A and the presence of noninfectious complications with respect to patients of group B ( $P < .05$ ,  $\chi^2$  test).

In spite of this strong correlation between SHM, the B-cell immunophenotype, and clinical presentation, patient 25 had reference values for the mutated fraction of V $\kappa$ A27, had autoimmunity, and presented switched memory B cells of less than 2% (Fig 1, B, and Table I). An important issue is whether the values of hotspot mutations obtained from PBMCs are comparable with those from particular B-cell subsets (ie, memory

B cells). For this purpose, we used fluorescence-activated cell sorting to sort CD27<sup>+</sup> B cells and performed IgkREHMA analysis from 7 patients (P8, P11, P12, P17, P18, P20, and P23) presenting with more than 2% of switched memory B cells or more than 10% of total memory B cells and also from 4 healthy donors. The analysis showed that these patients, who initially had reduced levels of mutated fractions of V $\kappa$ A27 on total B cells, continued with reduced level of mutations on memory B cells (Fig 1, D). Even though the mutation rate could be higher in the switched memory B-cell population with respect to nonswitched memory B cells, even patients with switched memory B-cell counts comparable with those in healthy donors (P20 and P23) had a marked decrease in SHM frequency (Fig 1, D). Overall, SHM frequencies ranged to less than the reference interval in patients with CVID, even when the analysis was performed specifically in memory B cells.

## Studies of CSR

**Patients with CVID demonstrate increased microhomology use.** To investigate the quality of the DSB repairs in *in vivo* CSR, we amplified S $\mu$ -S $\alpha$  regions from genomic DNA of patients and control subjects by using a previously described nested PCR.<sup>21</sup> Despite the low levels of serum IgA in our patients, S $\mu$ -S $\alpha$  fragments could be amplified, even if with decreased intensity than in healthy donors (data not shown). Therefore, to



**FIG 1.** A, IgκREHMA: fragment length analysis using capillary electrophoresis of cut VκA27 PCR products. CB, Cord blood; HD, healthy donor. Peaks of 106 and 109 bp represent the quantity of VκA27 fragments cleaved in one of the 2 hotspot Fnu4HI restriction sites, respectively. The peaks of 244 bp represent the quantity of VκA27 fragments cleaved in the signal peptide Fnu4HI site but not cleaved in the hot spot as a consequence of 1 or 2 mutations, eliminating the Fnu4HI sites. B, SHM values obtained through the IgκREHMA as a percentage of the mutated fraction in patients with CVID (*patients*) and healthy donors (*controls*). Comparison of means and SDs for the Student 2-tailed *t* test: \*\*\**P* < .0001. C, Correlation between the percentage of mutated fraction and the proportion of switched memory B cells in patients with CVID. D, Mutated fractions of purified CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells from 7 patients with CVID (*P*) and 4 healthy donors (*HD*). Numbers at the top of the bars represent the proportion of switched memory B cells.

assess the nature of switched junctions, we cloned and sequenced 194 Sμ-Sα fragments from 20 patients with pediatric CVID (Table II) and 53 fragments from 10 healthy control subjects (Fig 2). All of the switched fragment sequences were unique and thus represented independent CSR events. Fig 2, A, shows some of the more representative aligned sequences from patients and control subjects.

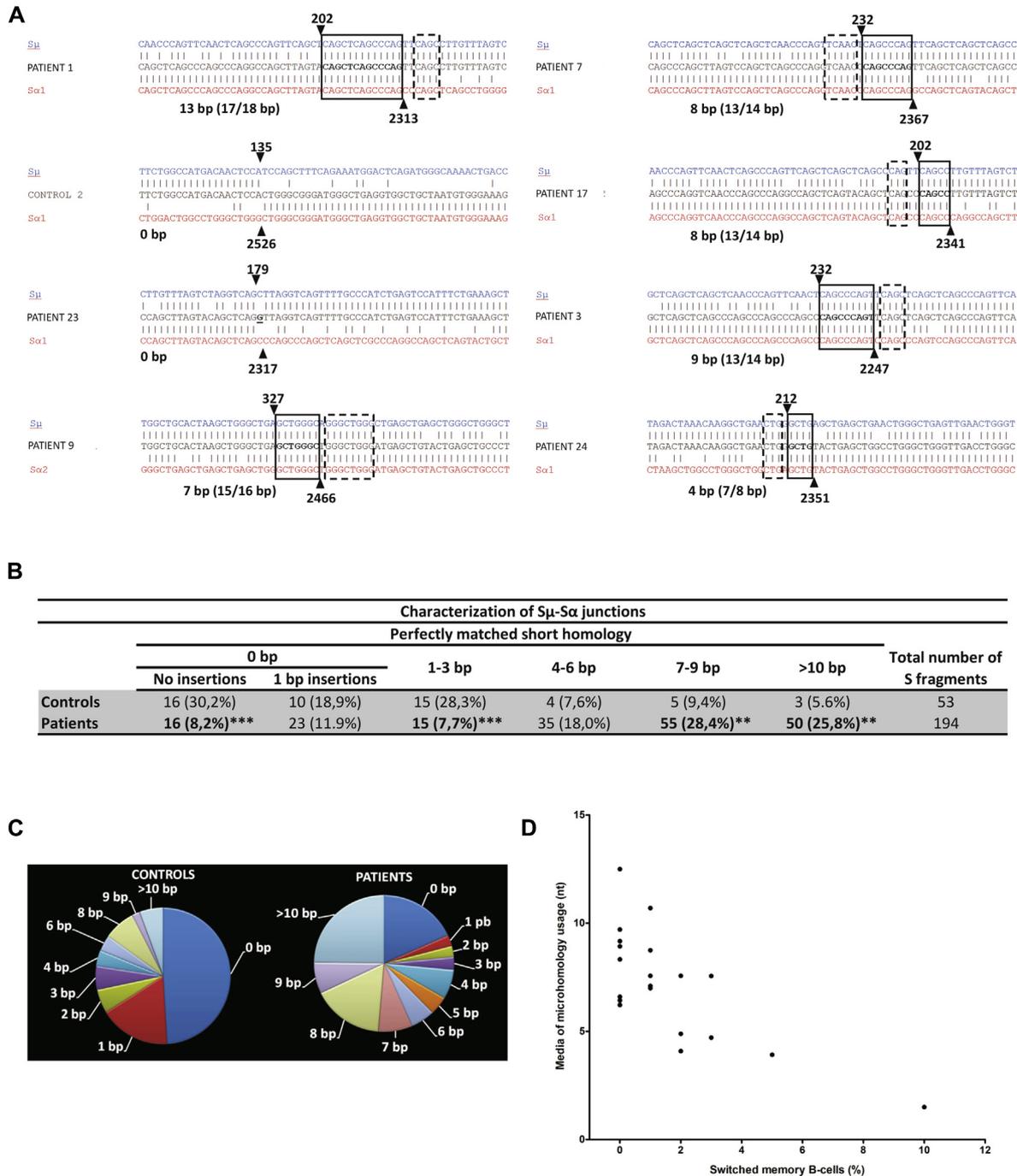
Globally, we observed a clear decrease in the proportion of blunt junctions (0 bp of homology) in our CVID cohort in comparison with control subjects. Indeed, a significant increase of sequences presenting 7 to 9 bp of microhomology use was observed in patients, even those with more than 10 bp of homology, on the junction repair compared with healthy donors (*P* < .001 and *P* < .01, respectively,  $\chi^2$  test; Fig 2, B).

Overall, our results showed a significant increase in the extent of donor-acceptor homology on Sμ-Sα joints in patients with CVID with respect to healthy control subjects, with a mean perfect sequence homology of  $6.9 \pm 5.3$  bp in patients with CVID versus  $2.3 \pm 3.5$  bp in healthy control subjects (*P* < .0001, 2-tailed Student *t* test; Fig 2, B and C). The increase in microhomology use was found in 12 (60%) of the 20 evaluated patients (Table II), and most of the Sμ-Sα joints from these patients were flanked by

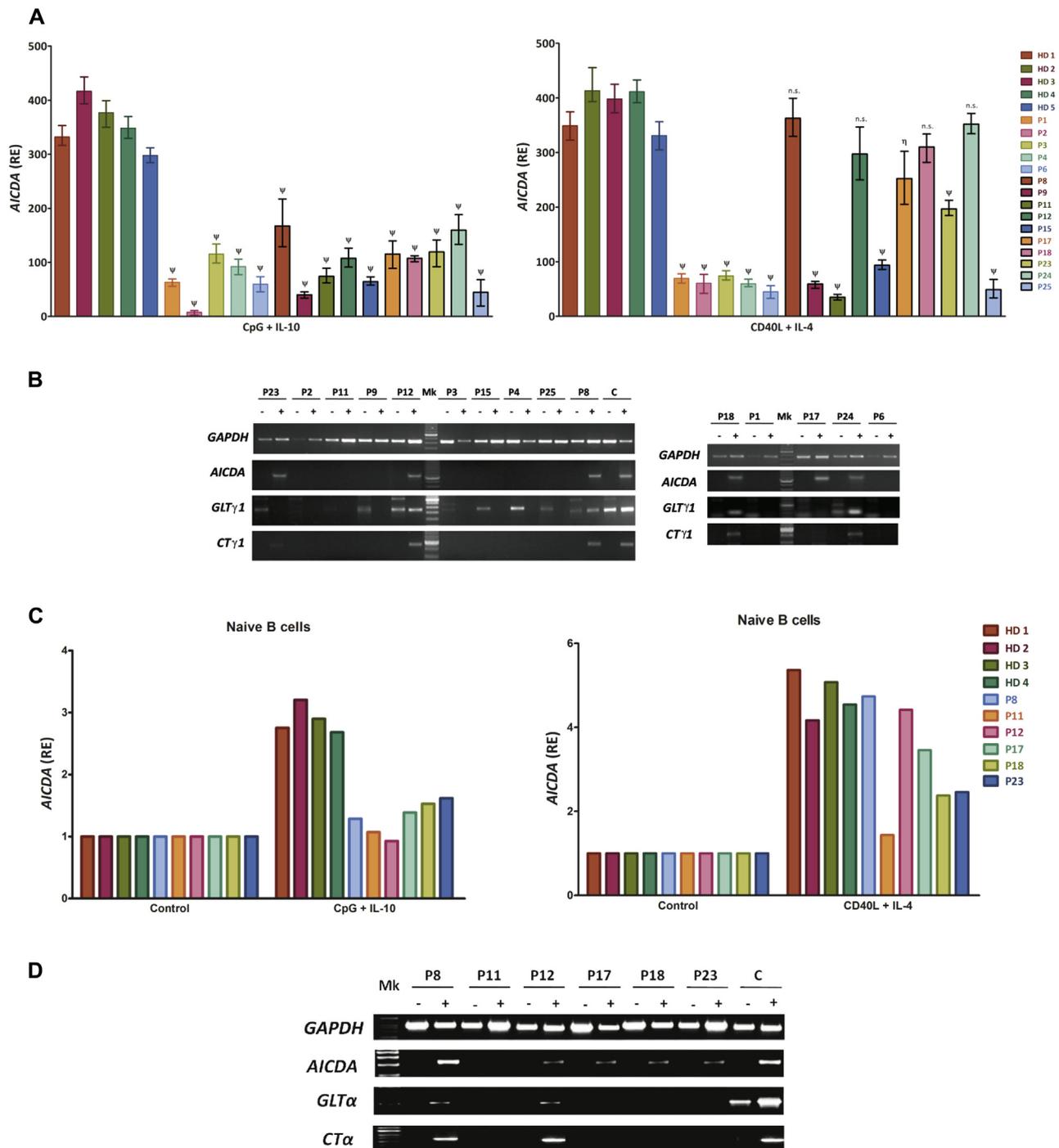
imperfect repeats (see the dashed line boxes in Fig 2, A). Eleven of the 12 patients displaying abnormal microhomology use had less than 2% of switched memory B cells (Table II). The remaining 8 patients had no statistical differences with respect to the control group, and 4 of them presented with more than 10% total memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, Table II). Despite this increased microhomology use, no significant association with clinical noninfectious complications was observed between abnormal and normal microhomology use subgroups of patients (*P* = .26,  $\chi^2$  test).

Altogether, we found a significant correlation between the media of microhomology use in each patient and the proportion of switched memory B cells (Spearman *r* = -0.72, *P* = .0003; Fig 2, D), a significant difference that was not noted when compared with IgG or IgA serum levels before substitution with intravenous gammaglobulin (data not shown). These results indicate CSR deficiency in an important group of patients likely associated with a defective repair of switch junctions.

**Analysis of TD and TI stimulation further characterizes patient subgroups.** In an attempt to localize the precise step of the CSR defect, we tested the ability to generate GLT (IH-CH), CTs (IH-Cμ), and transcripts and to upregulate AICDA in



**FIG 2. A**, Selected sequence of Sμ-Sα junctions from patients and control subjects. Recombination junction sequences are aligned with Sμ (above) and Sα or Sα2 (below) reference sequences. Microhomology (perfectly matched sequence homology) is indicated by a box (solid lines). The imperfect repeat was determined by identifying the longest overlap region near the switch junction by allowing 1 mismatch on either side of the breakpoints (dashed line box). The Sμ and Sα breakpoints for each switch fragment are indicated as ▲ and ▼, respectively, and their positions in the reference sequences are indicated above or below the arrowheads. The number of base pairs involved in microhomology and imperfect repeats for each joint are shown in the bottom of each sequence. **B**, Sμ-Sα switch junctions from patients with CVID were compared with those from healthy donors. Statistical analysis was performed by using the  $\chi^2$  test: \*\* $P < .01$  and \*\*\* $P < .001$ . **C**, Pie charts demonstrating microhomology use at Sμ-Sα junctions in patients and control subjects. Proportion of switch junctions with a given size of perfectly matched short homology is indicated by the size of the slices. **D**, Correlation between the media of microhomology use and the proportion of switched memory B cells.



**FIG 3.** **A**, qRT-PCR analysis of AICDA in cells of patients and control subjects cultured for 2 or 4 days with anti-CD40 and IL-4 or CpG and IL-10, respectively. Bars represent means  $\pm$  SEMs of 3 independent experiments. Data were analyzed by using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with *ACTB* as a reference gene, considering the relative expression (RE) of AICDA mRNA from the control culture as 1. Statistical analysis was performed by using 1-way ANOVA, followed by the Dunnett multiple comparison posttest.  $\Psi P < .001$ ;  $\eta P < .05$ . HD, Healthy donors; P, patients. **B**, Expression of AICDA, I $\gamma$ -C $\gamma$ 1 (GLT $\gamma$ 1), I $\gamma$ 1-C $\mu$  (CT $\gamma$ 1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; charge control) transcripts by using RT-PCR in PBMCs from patients and control subjects before (–) and after (+) stimulation with CD40L and IL-4. C, Control subject; P, patient. **C**, qRT-PCR analysis of AICDA in purified naive B cells from 6 patients with CVID and 4 healthy donors cultured for 2 or 4 days with anti-CD40 and IL-4 or CpG and IL-10, respectively. Data were analyzed, as described above. **D**, Expression of AICDA, I $\alpha$ -C $\alpha$  (GLT $\alpha$ ), I $\alpha$ -C $\mu$  (CT $\alpha$ ), and GAPDH (charge control) transcripts by using RT-PCR in purified naive B cells from 6 patients with CVID and 1 healthy donor before (–) and after (+) stimulation with CD40L and IL-4. C, Control subject; P, patient.

PBMCs before and after being activated *in vitro* with TD (CD40L and IL-4) and TI (CpG and IL-10) stimuli in 15 patients (P1, P2, P3, P4, P6, P8, P9, P11, P12, P15, P17, P18, P23, P24, and P25) and 5 healthy donors.

Healthy donors' PBMCs showed an increase in the expression of GLT $\gamma$ 1 (I $\gamma$ 1-C $\gamma$ 1) and CT $\gamma$ 1 (I $\gamma$ -C $\mu$ ; Fig 3, B) along with an upregulation of AICDA measured by using RT-PCR and qRT-PCR (Fig 3, A and B) after TD stimuli (similar results were observed by means of TI stimulation, data not shown). By contrast, none of the patients with CVID showed GLT $\gamma$ 1, CT $\gamma$ 1, and AICDA transcript upregulation by TI stimuli, and they behaved heterogeneously in terms of responsiveness to TD stimuli (Fig 3, A and B).

Naive B cells obtained from 6 patients with more than 10% of total memory B cells (P8, P11, P12, P17, P18, and P23) and 4 healthy donors were activated *in vitro* to limit possible effects on transcript induction caused by the presence of memory B cells, as previously described (Fig 3, C and D). We observed similar results through TI stimulation in naive B cells with respect to that observed in PBMCs. However, through TD stimuli, patients 23 and 18 showed less upregulation of AICDA along with a lack of expression of GLT $\alpha$  and CT $\alpha$  transcripts (Fig 3, D), as well as GLT $\gamma$ 1 and CT $\gamma$ 1 expression (data not shown).

Taking these results into account, 3 subgroups were delineated: subgroup 1, lacking response to TD stimulation (P1, P2, P3, P4, P6, P9, P11, P15, and P25); subgroup 2, no expressing GLTs but retaining AICDA activation (P17, P18, and P23); and subgroup 3, showing a similar behavior to the healthy control subjects (P8, P12, and P24).

## DISCUSSION

In recent years, analysis of several immunoglobulin deficiencies has made it possible to describe molecular mechanisms underlying the CSR and SHM pathways, which are key elements in the maturation of antibody responses.<sup>28</sup> However, functional defects in the ability to perform CSR might or might not be associated with a defect in SHM.<sup>22,29,30</sup> Among the genetic alterations found causing defects on CSR and SHM are those causing hyper-IgM syndromes, such as deficiencies of *CD40* and *CD40L*,<sup>31,32</sup> *AICDA*,<sup>33</sup> or *UNG*<sup>34</sup> genes, which helped us understand the essential role of these molecules in B cells for both mechanisms. Thus the study of the ability of B cells to perform SHM and CSR in patients with primary immunodeficiencies could help to identify new proteins involved either in 1 or both pathways.<sup>7,35-40</sup>

In the present study, by evaluating the qualitative aspects of the antibodies produced by patients with CVID, we described SHM and/or CSR defects in our cohort of pediatric patients. Indeed, even if in our cohort, as reported,<sup>6,7</sup> low or absent switched memory B cells have mainly been associated with secondary complications, this does not seem consistently related to the ability to trigger CSR. Thus intrinsic CSR events remained unaffected in both patients presenting (P12 and P18) and those lacking (P24) switched memory B cells and noninfectious clinical complications. Likewise, by pointing out specific impairments in antibody production, we can attempt to categorize patients with CVID to guide the search for new genetic targets and correlate treatment based on the clinical course of each category.

The results obtained by analyzing the SHM pathway showed that to a greater or lesser extent, almost all patients with CVID had

altered SHM of the antibody light chain, making it possible to group them into 2 categories: (1) severe defect in SHM (group A in the I $\gamma$ kREHMA) and (2) moderate defect in SHM (group B in the I $\gamma$ kREHMA, Table I). This assay allows analysis of the frequency of mutated I $\gamma$ k transcripts in a CDR mutation hotspot. It is important to note that mutations in this hotspot seem to be positively selected,<sup>41</sup> and the levels of mutated transcripts correlate highly with the percentage of memory B cells.<sup>12</sup> Indeed, in our cohort heterogeneity of SHM correlated with the percentage of switched memory B cells. This correlation could indicate that the light chain mutation levels might relate on the absence of memory subpopulations; however, as previously observed by Andersen et al,<sup>12</sup> we also found a reduced proportion of the mutated fraction on memory B cells sorted from patients with CVID. Furthermore, even patients with a similar fraction of switched memory B cells as healthy donors (P20 and P23) showed a marked decrease in SHM frequency (Fig 1, D). Thus because a low number of memory B cells cannot fully explain the results of the I $\gamma$ kREHMA in our cohort of patients with CVID, an intrinsic defect in the SHM machinery should not be ruled out, at least in some of them.

By analyzing the clinical aspect of patients in each group of altered SHM, we observed that 6 of 9 patients in group A (severe defect in SHM) presented with autoimmunity, splenomegaly, or granulomas (Table I). On the other hand, 6 of the 8 patients in group B remained thus far free of noninfectious complications (Table I). As an important clinical tool, we found a significant association between patients of group A and the presence of noninfectious complications with respect to patients of group B ( $P < .05$ ,  $\chi^2$  test). This could potentially make clinicians more aware of noninfectious complications that are more likely to arise in a particular group of patients with CVID and not exhaust valuable resources monitoring patients who are less likely to have noninfectious complications.

To further characterize CVID, B-cell analysis of unique switch junctions representing independent CSR events leads us to distinguish 2 groups of patients: those with a significant increase in the extent of donor-acceptor homology (microhomology) at the S $\mu$ -S $\alpha$  regions and those with switch junctional sequences statistically comparable with healthy donors (Table II). Despite this increased microhomology use, no significant association with clinical noninfectious complications was observed between abnormal and normal microhomology use subgroups of patients ( $P = .26$ ,  $\chi^2$  test).

The mean microhomology use for each patient correlated with the percentage of switched memory B cells (Fig 2, D), suggesting that those patients triggering lower but measurable CSR *in vivo* have less donor-acceptor homology on S $\mu$ -S $\alpha$  joints. By contrast, we could not find any correlation between microhomology use and immunoglobulin serum levels, which seems to be in accordance with the poor predictive value of plasma IgG levels in patients with CVID because even patients with slightly decreased IgG levels can be highly susceptible to infections.<sup>8</sup>

In our attempt to stratify patients with CVID according to SHM or CSR analysis, no difference in infection control became evident. As previously reported, the most frequent clinical manifestation in this cohort of patients with CVID was respiratory tract infection, with 43% presenting with upper respiratory tract infections, namely sinusitis and otitis media, and as many as 79% of patients presenting with recurrent lower respiratory tract infections.<sup>23</sup>

Almost all of the patients in group A according to SHM assay performance presented with failures in CSR-evaluated mechanisms (P4, P6, P7, P9, P10, P11, P13, P14, P15, and P16).

The presence of microhomology and imperfect repeats are reminiscent of defects in the NHEJ repair pathway.<sup>35,42,43</sup> It is important to note that in our CVID cohort no patient presented with clinical or immunologic phenotypes reminiscent of those found in patients with known DNA repair defects. Nevertheless, normal expression of other DNA repair proteins involved in CSR<sup>42,44,45</sup> or in repairing AICDA-induced lesions<sup>38,46</sup> could not be excluded. Similarly, we cannot rule out a defect in a yet uncharacterized molecule involved in NHEJ (S regions in CSR), MMR (Mismatch repair; V regions in SHM), or both or in an alternative pathway of DNA repair involved in both late differentiation processes of B cells. It has been described that patients with mutations in *PMS2* with impaired S-region repair have an altered pattern of SHM.<sup>43</sup> However, this defect has been excluded by using *PMS2* sequencing in our cohort of patients with CVID. The improved DNA-sequencing technologies (ie, next-generation sequencing) should enable us to elucidate the possible gene defects underlying the observed changes in the near future.

In addition, a defect in proteins activated in response to DNA damage and suppressed in B cells through B-cell lymphoma 6 (Bcl-6) should also be considered.<sup>47</sup> Although, to date, no animal model can support this hypothesis, the identification of genes that are directly repressed by Bcl-6 has strengthened the idea of essential and specialized functions of this protein in germinal center formation.<sup>48,49</sup> Bcl-6 appears to be crucial for germinal center B cells undergoing the high rates of proliferation required for CSR and SHM. In fact, it has been shown that Bcl-6 suppresses the responses of cell-cycle arrest and apoptosis through suppression of either p53<sup>50</sup> or p21.<sup>47</sup> In this sense it would also be interesting to evaluate the forkhead box protein O1/AKT/phosphoinositide 3-kinase pathway, which is involved in regulation of apoptosis, cell-cycle arrest, differentiation, and longevity of B cells.<sup>51,52</sup>

On the other hand, patients of group B with moderated defect in SHM but correctly repairing S regions (P17, P18, P23, and P24), a defect in an AICDA cofactor exclusively involved in the activation or repair of the V regions, could be considered. The existence of such a cofactor of AICDA has been previously postulated, but no protein playing that role has been identified.<sup>53</sup> However, although P24 was able to activate CSR molecular events *in vitro* through TD stimuli, P17, P18, and P23 only conserved AICDA activation (Fig 3). Abnormalities involving a first step of CSR, namely GLT activation, could underlie this condition.

Finally, patients 21 and 25 presented with failure in CSR, with a mildly defective SHM evoking the phenotype caused by mutations in the AICDA C-terminal region.<sup>54,55</sup> A cofactor acting at the AICDA C-terminal region, which is specifically required for development of CSR and dispensable for SHM, has been also suggested but not yet identified.<sup>53,56</sup> As an example, defects in the 14-3-3 adapter protein, which is involved in AICDA recruitment to S regions, could be evaluated in these patients,<sup>57</sup> particularly in patient 21, who had an immunologic phenotype reminiscent of defects in genes known to be involved in CSR (ie, hyper-IgM syndromes). However, abnormalities in *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40L*, and *PMS2* were ruled out through sequence analysis. Furthermore, normal expression of the inducible

costimulator molecule was seen by using flow cytometry, ruling out this deficiency previously described in some patients with CVID.<sup>58,59</sup>

Altogether, molecular definitions of CSR and/or SHM defects in patients with CVID can guide future investigations aiming to further elucidate the complex mechanisms involved in B-cell differentiation pathways.<sup>29,60</sup> Moreover, clinicians could consider assessments of SHM in patients with CVID in view of the observed correlation between severe impairment and noninfectious complications in pediatric patients with CVID.

We thank Emma Prieto and Verónica Goris for technical assistance. We thank Dr Nicolas José Lavagnino from Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, for statistical assistance. We also thank Dr Patricia Lorenzo from the USC Medical Center for the English-language review. Finally, we also thank the patients with CVID who participated in this study.

**Clinical implications: Stratification of our CVID cohort according to their SHM capacity highlighted an inverse relationship with noninfectious clinical complications.**

## REFERENCES

- Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34-48.
- Wehr C, Peter HH, Warnatz K. Response: Improving classification in CVID. *Blood* 2008;112:446-7.
- Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008;112:277-86.
- Mellemkjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, 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.
- Wang J, Cunningham-Rundles C. Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *J Autoimmun* 2005;25:57-62.
- Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111:77-85.
- Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:261-71.
- Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:1001-4.
- Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, Sale J, Batista FD, Williams G, et al. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000;355:357-60.
- Sale JE, Bemark M, Williams GT, Jolly CJ, Ehrenstein MR, Rada C, et al. In vivo and in vitro studies of immunoglobulin gene somatic hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:21-8.
- Foster SJ, Dorner T, Lipsky PE. Targeting and subsequent selection of somatic hypermutations in the human V kappa repertoire. *Eur J Immunol* 1999;29:3122-32.
- Andersen P, Permin H, Andersen V, Schejbel L, Garred P, Svegaard A, et al. Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immunodeficiency. *Blood* 2004;105:511-7.
- Pan-Hammarstrom Q, Zhao Y, Hammarstrom L. Class switch recombination: a comparison between mouse and human. *Adv Immunol* 2007;93:1-61.
- Montamat-Sicotte D, Palacios F, Di Noia JM, Oppezio P. Origins and consequences of AID expression in lymphoid neoplasms. *Curr Immunol Rev* 2013;9:72-85.
- Schrader CE, Guikema JE, Linehan EK, Selsing E, Stavnezer J. Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair. *J Immunol* 2007;179:6064-71.

16. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 2008;283:1-5.
17. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 2003;23:31-9.
18. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:712-20.
19. Rolink A, Melchers F, Andersson J. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity* 1996;5:319-30.
20. Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H, et al. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* 1998;17:2404-11.
21. Pan Q, Petit-Frère C, Lähdesmäki A, Gregorek H, Chrzanowska KH, Hammarström L. Alternative end joining during switch recombination in patients with ataxia-telangiectasia. *Eur J Immunol* 2002;32:1300-8.
22. Kotnis A, Du L, Liu C, Popov SW, Pan-Hammarstrom Q. Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:653-65.
23. Almejun MB, Sajaroff E, Galicchio M, Oleastro M, Bernasconi A, Zelazko M, et al. Immunological characteristics and two novel mutations in TAC1 in a cohort of 28 pediatric patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012;32:89-97.
24. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 2007;26:812-26.
25. Xu W, Santini PA, Matthews AJ, Chiu A, Plebani A, He B, et al. Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J Immunol* 2008;181:276-87.
26. Bergqvist P, Gardby E, Stensson A, Bemark M, Lycke NY. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J Immunol* 2006;177:7772-83.
27. Pan-Hammarström Q, Dai S, Zhao Y, van Dijk-Hard IF, Gatti RA, Borresen-Dale AL, et al. ATM is not required in somatic hypermutation of VH, but is involved in the introduction of mutations in the switch mu region. *J Immunol* 2003;170:3707-16.
28. Durandy A, Taubenheim N, Peron S, Fischer A. Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Adv Immunol* 2007;94:275-306.
29. Kracker S, Gardes P, Durandy A. Inherited defects of immunoglobulin class switch recombination. *Adv Exp Med Biol* 2010;685:166-74.
30. de Miranda NF, Bjorkman A, Pan-Hammarstrom Q. DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1246:50-63.
31. Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghoniaum A, Soresina AR, Loubser M, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12614-9.
32. Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;361:539-41.
33. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000;102:565-75.
34. Imai K, Catalan N, Plebani A, Marodi L, Sanal O, Kumaki S, et al. Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic selective deficiency in Ig class-switch recombination. *J Clin Invest* 2003;112:136-42.
35. Péron S, Pan-Hammarström Q, Imai K, Du L, Taubenheim N, Sanal O, et al. A primary immunodeficiency characterized by defective immunoglobulin class switch recombination and impaired DNA repair. *J Exp Med* 2007;204:1207-16.
36. Durandy A. Immunoglobulin class switch recombination: study through human natural mutants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:577-82.
37. Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009;27:199-227.
38. Abolhassani H, Farrokhi AS, Pourhamdi S, Mohammadinejad P, Sadeghi B, Moazzeni SM, et al. Expression of activation-induced cytidine deaminase gene in B lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *Iran J Pediatr* 2013;23:451-7.
39. Duvvuri B, Duvvuri VR, Grigull J, Martin A, Pan-Hammarstrom Q, Wu GE, et al. Altered spectrum of somatic hypermutation in common variable immunodeficiency disease characteristic of defective repair of mutations. *Immunogenetics* 2011;63:1-11.
40. Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Ziemba B, de Vries SS, et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7193-8.
41. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJ. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med* 2007;204:645-55.
42. Pan-Hammarström Q, Jones AM, Lähdesmäki A, Zhou W, Gatti RA, Hammarström L, et al. Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *J Exp Med* 2005;201:189-94.
43. Peron S, Metin A, Gardes P, Alyanikian MA, Sheridan E, Kratz CP, et al. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2008;205:2465-72.
44. Pan-Hammarström Q, Lähdesmäki A, Zhao Y, Du L, Zhao Z, Wen S, et al. Disparate roles of ATR and ATM in immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation. *J Exp Med* 2006;203:99-110.
45. Offer SM, Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L, Harris RS. Unique DNA repair gene variations and potential associations with the primary antibody deficiency syndromes IgAD and CVID. *PLoS One* 2010;5:e12260.
46. van Zelm MC, Bartol SJ, Driessen GJ, Mascart F, Reisli I, Franco JL, et al. Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:135-44.
47. Phan RT, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 2005;6:1054-60.
48. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000;13:199-212.
49. Niu H, Cattoretti G, Dalla-Favera R. BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *J Exp Med* 2003;198:211-21.
50. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004;432:635-9.
51. Werner M, Hobeika E, Jumaa H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol Rev* 2010;237:55-71.
52. Dengler HS, Baracho GV, Omori SA, Bruckner S, Arden KC, Castrillon DH, et al. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol* 2008;9:1388-98.
53. Durandy A, Peron S, Taubenheim N, Fischer A. Activation-induced cytidine deaminase: structure-function relationship as based on the study of mutants. *Hum Mutat* 2006;27:1185-91.
54. Shinkura R, Ito S, Begum NA, Nagaoka H, Muramatsu M, Kinoshita K, et al. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 2004;5:707-12.
55. Doi T, Kato L, Ito S, Shinkura R, Wei M, Nagaoka H, et al. The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2758-63.
56. Ta VT, Nagaoka H, Catalan N, Durandy A, Fischer A, Imai K, et al. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* 2003;4:843-8.
57. Xu Z, Fulop Z, Wu G, Pone EJ, Zhang J, Mai T, et al. 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1124-35.
58. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003;4:261-8.
59. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 2006;107:3045-52.
60. Kracker S, Gardes P, Mazerolles F, Durandy A. Immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Clin Immunol* 2010;135:193-203.

**Análisis de diferentes factores de transcripción implicados en el desarrollo del linfocito B  
en la enfermedad de Inmunodeficiencia Común Variable**

**Dra. Virginia Patiño**

**Montevideo, 27 de diciembre de 2019**