



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR
EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

YESENIA HERNÁNDEZ NICOLÁS



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUÍZ
VOCAL: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO
SECRETARIO: Profesor: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
1er. SUPLENTE: Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO
2° SUPLENTE: Profesor: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES BERNARDO SEPÚLVEDA EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. MARCELA ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE:

YESENIA HERNÁNDEZ NICOLÁS



ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 GENERALIDADES DE LAS INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.	4
2.2 INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE.....	5
2.2.1 Características clínicas.	5
2.2.2 Autoinmunidad en pacientes con IDCV.	6
2.2.3 Diagnóstico.....	7
2.2.4 Tratamiento.	7
2.2.5 Defectos genéticos.	8
2.2.6 Defectos en el sistema inmune adaptativo de los pacientes con IDCV.....	10
2.2.6.1 Inmunidad humoral.....	10
2.2.6.2 Inmunidad celular.	12
2.2.6.3 PD-1/PD-L1 y autoinmunidad.....	15
2.2.6.4 CTLA-4 y autoinmunidad.	16
2.2.7 Relevancia del estudio de la IDCV.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.	18
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO.	18
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	19
6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	19
6.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES	20
6.2.1 EQUIPOS.	20
6.2.2 REACTIVOS.....	20



6.2.3 SOLUCIONES.....	21
6.2.4 Citometría de flujo.....	21
6.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	23
6.3.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).	23
6.3.2 Fenotipificación de PBMC.....	23
6.3.3 Cultivos celulares.....	23
6.3.4 Tinción superficial de inmunofluorescencia.....	24
6.3.5 Detección de citocinas.	25
6.3.6 Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Identificación de las subpoblaciones celulares presentes en la sangre periférica de individuos sanos y pacientes con IDCV.....	27
7.2 Frecuencias de los linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en los pacientes con IDCV.....	28
7.3 Evaluación de la capacidad de proliferación de linfocitos T en pacientes con IDCV.....	30
7.4 Expresión de PD-1/PD-L1 en linfocitos T de pacientes con IDCV.....	33
7.5 Expresión de CTLA-4 en linfocitos T de pacientes con IDCV.....	36
7.6 Producción de citocinas proinflamatorias en los pacientes con IDCV.....	37
7.7 Producción de IL-10 (anti-inflamatoria) en los pacientes con IDCV.....	39
7.8 Producción de IL-2 en los pacientes con IDCV.....	40
7.9 Capacidad de diferenciación hacia el perfil Th1 en los pacientes con IDCV.....	41
7.10 Capacidad de diferenciación hacia el perfil Th2 en pacientes con IDCV.....	43
7.11 Capacidad de diferenciación hacia el perfil Th17 en pacientes con IDCV.....	45
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
9. CONCLUSIONES.....	58
10. REFERENCIAS.....	59



ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Análisis de linfocitos T presentes en sangre periférica.....	27
Figura 2. Frecuencias de los linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en los pacientes con IDCV.....	29
Figura 3. Histogramas representativos de la proliferación de linfocitos T de controles sanos y pacientes con IDCV.....	31
Figura 4. Capacidad de proliferación de los linfocitos T CD3+/CD4+ en pacientes con IDCV.....	33
Figura 5. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD2+/CD4+.....	34
Figura 6. Expresión de PD-L1 en linfocitos T CD2+/CD4+.....	35
Figura 7. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD2+/CD4+.....	36
Figura 8. Producción de citocinas proinflamatorias en los pacientes con IDCV.....	38
Figura 9. Producción de IL-10 en los pacientes con IDCV.....	39
Figura 10. Producción de IL-2 en los pacientes con IDCV.....	41
Figura 11. Diferenciación hacia Th1 en pacientes con IDCV.....	43
Figura 12. Diferenciación hacia Th2 en pacientes con IDCV.....	45
Figura 13. Diferenciación hacia Th17 en pacientes con IDCV.....	46



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.

APC	Célula presentadora de antígeno
BAFF	Factor activador de la célula B
BAFFR	Receptor de BAFF
BCR	Receptor de célula B
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CD	Célula dendrítica
CFSE	Carboxifluorescein-succidimilester
CMN	Centro Médico Nacional
Con A	Concanavalina A
CTLA-4	Antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico
IDCV	Inmunodeficiencia Común Variable
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IP	Inmunodeficiencia Primaria
LASID	Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer salino de fosfatos
PD-1	Muerte celular Programada
PD-L1	Ligando de muerte programada
PHA	Fitohemaglutinina



PWM	Mitógeno de hierba carmín
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i> .
TACI	Activador transmembranal y modulador de calcio y ligando de ciclofilina.
TCR	Receptor de célula T
TNF	Factor de necrosis tumoral
UIMIQ	Unidad de investigaciones médicas en inmunoquímica



RESUMEN.

En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune celular en 19 pacientes con inmunodeficiencia común variable (IDCV) con presencia o ausencia de enfermedades autoinmunes determinando la frecuencia de linfocitos T tanto CD4 como CD8 así como su capacidad de activación y diferenciación de acuerdo a la producción de citocinas. Para evaluar tales parámetros se utilizó un modelo de activación policlonal en respuesta a la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) y la co-estimulación con anti CD28. Además se evaluó la expresión de PD-1/PDL-1 y CTLA-4 en linfocitos T bajo el mismo modelo de activación.

Los resultados muestran que existe una disminución en la frecuencia de los linfocitos T CD4, mientras que la proliferación no se encuentra afectada e incluso es mayor en los linfocitos T CD4 de los pacientes con IDCV que presentan autoinmunidad. En cuanto a la expresión de PDL-1 y CTLA-4 no presentan alteraciones respecto a los controles y en el caso de PD-1, este se encuentra incrementado en los pacientes con IDCV y autoinmunidad.

Respecto a la capacidad de diferenciación hacia el perfil Th1 y Th2 se encontraron sin modificaciones respecto a los controles, en cambio el perfil Th17 sí mostró alteraciones hallándose una disminución significativa de IL-17 en los pacientes con IDCV, de igual manera se encontró una disminución en la producción de IL-2 e IL-10 todas estas de manera independiente de la presencia o no de enfermedades autoinmunes.



1. INTRODUCCIÓN.

La inmunodeficiencia común variable (IDCV), es un síndrome que comprende un amplio grupo de desórdenes, destacándose una hipoglobulinemia de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulina A (IgA) con niveles fluctuantes de inmunoglobulina M (IgM), y con variados números absolutos de linfocitos T y B. Es frecuente el hallazgo de desórdenes de tipo autoinmune en este tipo de pacientes (alrededor del 20-25% de los casos).

La IDCV es una enfermedad compleja debido a la variedad de defectos inmunológicos y de las manifestaciones clínicas asociadas, siendo el único parámetro unificador la pronunciada deficiencia de anticuerpos de tipo IgG e IgA.

Desde que fue reconocida por primera vez en 1953, se han realizado diversos estudios que abarcan la inmunidad celular y humoral de dichos pacientes. Sin embargo, hoy en día la causa de la IDCV en la mayor parte de los casos es desconocida, asociándose a defectos genéticos ya establecidos solo en menos del 15% de los pacientes.

Los datos generados hasta la fecha en cuanto a la inmunidad celular de los pacientes con IDCV no muestran un consenso en varios parámetros como la frecuencia, la capacidad de proliferación y la producción de citocinas (incluidas la IL-2, IL-10 e IFN γ) de los linfocitos T.

Por otro lado, la patogénesis que involucra la frecuente presencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes con IDCV sigue sin ser comprendida.

Debido al poco entendimiento que en la actualidad se tiene de esta enfermedad los tratamientos que se ofrecen a éstos pacientes se enfocan en la sustitución de inmunoglobulinas y en aquellos casos que presentan alguna enfermedad autoinmune el tratamiento incluye la administración de corticoesteroides.



El presente trabajo se enfoca en evaluar la inmunidad celular de un grupo de pacientes con IDCV, determinando la capacidad de proliferación y diferenciación a través de la producción de citocinas, aportando así mayor información acerca de la inmunidad celular en la IDCV y proporcionando por primera vez este tipo de datos en la población de pacientes del CMN siglo XXI del IMSS. Además se analizará el comportamiento de aquellos pacientes que presentan alguna enfermedad autoinmune con la finalidad de tratar de explicar ciertas discrepancias entre la población estudiada de acuerdo a éste parámetro. Por último se evaluarán tres moléculas ampliamente relacionadas con la presencia de autoinmunidad (PD-1, PD-L1 y CTLA-4), concluyendo así un estudio más completo que incluye un análisis de los pacientes que presentan enfermedades autoinmunes.



2. MARCO TEÓRICO.

2.1 GENERALIDADES DE LAS INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.

Las inmunodeficiencias primarias (IP) son desordenes genéticos relacionados con anomalías en el desarrollo y maduración de las células del sistema inmune.¹ Dichas anomalías tienen como consecuencia no solo una gran susceptibilidad a infecciones recurrentes, sino también a una predisposición a inflamación crónica, reacciones de hipersensibilidad, autoinmunidad y cáncer.^{2,3} La incidencia actual de las IP es desconocida pero se estima que puede ir de 1:10,000 a 1:1200^{4,5} niños nacidos vivos. En México se estima que cada año más de 4000 niños nacen con algún tipo de IP.²

El comité de expertos en IP de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) han clasificado a las IP en ocho grupos basados en el componente del sistema inmune afectado y el defecto genético detectado; estos grupos son: inmunodeficiencias combinadas de B y T, deficiencias predominantemente de anticuerpos, otros síndromes de inmunodeficiencias bien definidos, enfermedades con desregulación inmune, defectos congénitos cuantitativos o cualitativos de los fagocitos, defectos en la inmunidad innata, desórdenes auto-inflamatorios y deficiencias de complemento.⁶

La Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID) reporta que el 59.7% de los casos registrados de IP corresponden a deficiencias predominantemente de anticuerpos.⁷ Dentro de las deficiencias predominantemente de anticuerpos, se encuentra la inmunodeficiencia común variable (IDCV) la cual tiene una gran incidencia dentro de éste grupo de inmunodeficiencias.



2.2 INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE.

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) comprende un amplio grupo de desórdenes, destacándose una hipoglobulinemia de IgG e IgA con niveles fluctuantes de IgM, y con variados números absolutos de linfocitos T y B.⁹

La causa exacta de los bajos niveles de inmunoglobulinas séricas se desconoce. Es una forma relativamente común de inmunodeficiencia, por lo tanto, la palabra "común". El grado y tipo de deficiencia de inmunoglobulinas en el suero y el curso clínico de la enfermedad varía de paciente a paciente, por que se adoptó el término "variable". Afecta por igual a ambos sexos.⁸

2.2.1 Características clínicas.

La mayoría de pacientes presentan infecciones bacterianas de repetición, especialmente del aparato respiratorio y en menor número del tracto digestivo. Entre las infecciones más frecuentes se encuentran la sinusitis, otitis, bronquitis y neumonías. Los agentes patógenos son bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.^{9,10}

Las infecciones causadas por virus no suelen ser un problema y un número muy reducido de pacientes puede presentar infección por micobacterias y hongos. A pesar de que la enfermedad infecciosa de repetición puede iniciarse a cualquier edad, estudios realizados sobre una serie amplia de pacientes sitúan la edad media de inicio de los síntomas a los 28 años en las mujeres y a los 23 en los hombres.¹¹

En general, la incidencia de neoplasias en estos pacientes es alta; se estima que alrededor de un 11% a un 13% de los pacientes llega a presentar algún tipo de tumor maligno y que ocurre durante la quinta o sexta década de vida. Dentro de las más frecuentes se encuentran el carcinoma gástrico y linfoma no Hodgkin.^{11, 12}



2.2.2 Autoinmunidad en pacientes con IDCV.

Las enfermedades autoinmunes afectan aproximadamente al 20% de los pacientes con IDCV, y comúnmente son la primera manifestación de la deficiencia inmune. En un estudio realizado en 224 pacientes, la presencia de autoinmunidad se encontró previo al diagnóstico de IDCV en el 17.4% de los pacientes y dentro de éstos, el 2.3% solo presentaban esta manifestación clínica una vez diagnosticados como IDCV.¹³

La presencia de alguna enfermedad autoinmune parece afectar por igual a hombres y mujeres. Datos de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias reportan un aumento en la presencia de enfermedades autoinmunes en pacientes con IDCV provenientes del Reino Unido comparado con pacientes de Suecia, lo cual sugiere que pueden estar involucrados factores ambientales y genéticos que contribuyen a la presencia de la autoinmunidad.¹⁴

Las enfermedades autoinmunes de mayor incidencia son la anemia hemolítica, la púrpura trombocitopénica idiopática (con un 8% y 5% respectivamente), la artritis reumatoide aparece del 1% al 10% de los pacientes con IDCV, afectando una o varias articulaciones, comúnmente en rodillas, tobillos y manos. Existen otras enfermedades autoinmunes que ocurren con menos frecuencia como el lupus eritematoso sistémico que es muy poco frecuente aunque existen casos reportados. ¿Cómo se pueden producir autoanticuerpos contra los tejidos específicos en un estado de deficiencia de la producción de anticuerpos? La patogénesis de la autoinmunidad en IDCV sigue sin ser entendida.¹⁵



2.2.3 Diagnóstico.

Se puede sospechar de la presencia de IDCV en cualquier paciente con infecciones bacterianas severas o recurrentes del tracto respiratorio superior o inferior; por lo tanto estos pacientes deben ser evaluados para detectar la causa de la predisposición a dichas infecciones, como pueden ser alergias, anomalías anatómicas o algún tipo de inmunodeficiencia.²⁴

El criterio de laboratorio más importante para establecer el diagnóstico de la IDCV es la concentración sérica de IgG, que van desde niveles muy reducidos (<100 mg / dl) hasta justo por debajo del intervalo normal para adultos, que es de 500-1200 mg / dL. Se deben descartar otras inmunodeficiencias primarias como la agammaglobulinemia ligada a X o la deficiencia selectiva de IgA. Para completar el diagnóstico, es posible realizar otros estudios de laboratorio como la concentración de IgA e IgM, la cuantificación de linfocitos B a través de una tecnología sensible y específica, como es la Citometría de Flujo y la baja respuesta ante la vacunación.^{10, 25,26}

2.2.4 Tratamiento.

El tratamiento de elección en los pacientes con IDCV es la administración de gammaglobulina humana. En la actualidad se utilizan preparaciones de aplicación intravenosa, con alto grado de seguridad, buena tolerancia y una vida media aproximada de 21 días. La preparación estándar contiene aproximadamente 15 % de inmunoglobulinas, de las cuales 85 % es IgG, 10 % es IgM y 5 % es IgA.²⁷

Las dosis recomendadas oscilan entre los 200-400 mg/kg de peso cada 2-4 semanas; los niveles de IgG sérica entre dos dosis nunca deben ser inferiores a 500 mg/dL.¹⁰ Para tratar las infecciones bacterianas recurrentes se utilizan antibióticos de amplio espectro. En el caso de presentarse alguna enfermedad autoinmune, usualmente se administran corticoesteroides aunque se ha



demostrado que el tratamiento con la gammaglobulina intravenosa humana también ayuda a combatir estos padecimientos dado que producen un bloqueo temporal de los receptores Fc en el sistema reticuloendotelial.^{28, 29} Por lo tanto el tratamiento para la presencia de autoinmunidad incluye altas dosis de inmunoglobulinas, corticoesteroides, inmunosupresores selectivos y otros moduladores inmunes.¹⁵

A pesar de que estos tratamientos no son curativos, su correcta aplicación junto a un diagnóstico temprano de la enfermedad han conseguido mejorar notablemente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con IDCV.

La tasa de mortalidad de los pacientes con IDCV es de aproximadamente 27% durante periodos de seguimiento de diez años tras el diagnóstico de la enfermedad, con una edad media de 40 años siendo las principales causas de muerte los linfomas y las infecciones crónicas de vías respiratorias.¹¹

2.2.5 Defectos genéticos.

Actualmente se sabe que una fracción de los pacientes con IDCV presentan esta enfermedad debido a defectos genéticos de uno o varios genes que afectan la función inmune humoral. Aproximadamente del 10% al 20% de los pacientes con IDCV se ha identificado una causa genética que ocasiona este trastorno.

Se han encontrado defectos en los genes que codifican para TACI, ICOS, CD19 y BAFFR.³⁰

TACI (activador transmembranal y modulador de calcio y ligando de ciclofilina) es miembro de la familia de receptores TNF (factor de necrosis tumoral), se expresa en la superficie de las células B y la unión con su ligando APRIL o BAFF favorece el cambio de isotipo hacia IgG e IgA; por lo tanto las células B procedentes de individuos con mutaciones en TACI, logran expresar TACI, pero no producen IgG e IgA en respuesta al ligando de TACI.³¹



El co-estimular inducible ICOS solo se expresa en los linfocitos T activados induciendo la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α e IFN γ y es esencial para la inducción de IL-10. Este patrón de expresión de citocinas inducidas por ICOS indica la importancia de la interacción ICOS-ICOSL durante la cooperación de célula T-célula B promoviendo la diferenciación terminal hacia células de memoria y células plasmáticas. Por lo tanto una mutación en ICOS impide esta diferenciación terminal que se ve reflejada en la característica hipogammaglobulinemia de los pacientes con IDCV.³²

CD19 es una molécula de superficie de los linfocitos B que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas, la cual aparece de forma temprana durante la diferenciación de la célula B en la médula ósea y permanece hasta su diferenciación a célula plasmática. Cuatro proteínas de superficie de la célula B forman el complejo CD19; estas son: CD19, CD21, CD81 y CD225, las cuales en conjunto con el receptor de célula B (BCR) favorecen la señalización para la activación y diferenciación de la célula B. La mutación en el gen que codifica para CD19 ocasiona una hipogammaglobulinemia dado que las células B son incapaces de responder ante la estimulación con un antígeno y diferenciarse hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos.³³

La supervivencia de los linfocitos B depende de la señalización inducida por la unión de BAFF (factor activador de la célula B) con su receptor BAFFR. BAFFR es un receptor miembro de la familia de receptores TNF. Las mutaciones en BAFFR afectan fuertemente el desarrollo y homeostasis de las poblaciones de células B.³⁴

En el siguiente cuadro se resumen las principales características de los genes alterados en la IDCV.



Tabla 1. Causas genéticas de la IDCV.³⁵

% individuos con IDCV	Tipo de herencia	Nombre de la enfermedad	Símbolo del gen	Locus cromosómico	Nombre de la proteína
≤10%-15%	AD	IDCV asociada a TACI	<i>TNFRSF13B(TACI)</i>	17p11.2	Miembro 13B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral.
≤1%	AR	Deficiencia de ICOS	ICOS	2q33	Co-estimulador inducible de célula T
≤1%	AR	Deficiencia de CD19	CD19	16p11.2	Antígeno CD19 de linfocito B
≤1%	AR	Deficiencia de BAFFR	<i>TNFRSF13C (BAFFR)</i>	22q13.1-q13.3	Miembro 13 C de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral.
75%-80%		Desconocido			

Sin embargo, del 75% al 80% de los casos de pacientes con IDCV no se logran explicar por estos defectos genéticos, por lo que el estudio de otros componentes del sistema inmune resulta de gran relevancia.

2.2.6 Defectos en el sistema inmune adaptativo de los pacientes con IDCV.

2.2.6.1 Inmunidad humoral.

La activación y diferenciación de células B depende de las interacciones entre célula T-célula B que implican varios tipos de receptores y ligandos en ambos tipos de células y por supuesto la producción de citocinas.



Dentro de las principales interacciones se encuentra la unión del TCR al MHCII, CD28 con B7.1/B7.2, CD40/CD40L, ICOSL/ICOS. La insuficiente colaboración de estas moléculas podría explicar las bajas concentraciones de las inmunoglobulinas en suero de los pacientes con IDCV, dado que estas interacciones favorecen respuestas inmunes humorales eficaces de larga duración en los seres humanos.⁴²

Varios estudios indican una función alterada en las células B en los pacientes con IDCV, estos desordenes implican una diferenciación tardía de los linfocitos B, lo que conduce a una regulación alterada de CD27⁴³, CD86⁴⁴ y CD70⁴⁵, una reducida maduración de la afinidad e hipermutación somática, una señalización deficiente y la falta de células B de memoria.

La mayoría de los estudios concuerdan en que los niveles circulantes de linfocitos B se encuentran dentro de los niveles normales o ligeramente inferiores respecto a los controles, sin embargo; se han observado que las células B de memoria se encuentran notablemente disminuidas e incluso ausentes en los pacientes con IDCV. Estos defectos en las células B de memoria podrían ser los responsables del fallo en la diferenciación hacia células plasmáticas y por ende en la producción de anticuerpos de alta afinidad de diferentes isotipos.⁴⁶ Basados en esta disminución de las células B de memoria, algunos autores han propuesto la clasificación de los pacientes con IDCV en subgrupos más homogéneos. Piqueras y colaboradores clasificaron en tres grupos a pacientes con IDCV: pacientes con niveles normales de células B de memoria (MB2), pacientes con células B de memoria *switched* (IgD⁻ CD27⁺) pero niveles normales de células B de memoria *non-switched* (IgD⁺ CD27⁺) (MB1) y pacientes sin células B de memoria (MB0). Los pacientes del grupo MB0 mostraron una mayor prevalencia de esplenomegalia y enfermedad granulomatosa.⁴⁷

Por otro lado, se sabe que la hipermutación somática es esencial para la generación de anticuerpos de alta afinidad. Se ha detectado que en algunos



pacientes con IDCV, la IgG secretada carece de hipermutación somática en la cadena pesada; lo cual indica que la IgG producida en estos pacientes es de una calidad inferior y con una baja afinidad.^{48, 49}

Por último, como se mencionó anteriormente, existen diversos defectos genéticos que influyen directamente en la maduración y diferenciación de los linfocitos B, sin embargo; existe una gran lista creciente de genes que están siendo considerados en el estudio de ésta enfermedad, tal es el caso de CD40, *CD81* y *STAT3* entre otros.^{42, 50}

2.2.6.2 Inmunidad celular.

En una gran proporción de los pacientes con IDCV se han observado anomalías en la inmunidad celular, que van desde defectos en la activación y proliferación de los linfocitos T hasta una producción de citocinas alterada.

Diversos estudios se han realizado a lo largo de los años para lograr entender a fondo esta enfermedad.

En 1986 Grabstein KS y colaboradores realizaron un estudio donde observaron la relación de la expresión de IFN γ e IL-2 en linfocitos T de pacientes con IDCV. Cuando examinaron la expresión de IFN γ , se encontró que aunque las células T de los pacientes tenían niveles normales de ARNm de IFN γ a las 6 horas (lo que sugiere que la activación inicial del gen de IFN γ era normal) los niveles de ARNm a las 24 horas disminuían significativamente, así como los niveles de la proteína en los sobrenadantes de cultivo. En las células T de individuos control, inicialmente (1 a 6 horas) aumentaba la expresión del ARNm de IFN γ tras la activación por mitógenos, y este aumento es independiente de la presencia de IL-2. Sin embargo; en las últimas etapas de la activación, el ARNm y la producción de IFN γ se ven aumentadas en presencia de IL-2. Este hallazgo sugiere que la deficiencia en la producción de interferón gamma en los pacientes con IDCV no representa una anomalía primaria en la activación del gen de IFN γ , sino más bien es una consecuencia secundaria de la deficiente producción de IL-2.³⁶



En 1993 Eli M. Eisenstein, Jonathan S. Jaffe y Warren Strober publicaron un estudio enfocado en la producción de IL-2 en pacientes con IDCV. Para poder evaluar este parámetro evaluaron a 4 pacientes con IDCV cuyas células fueron estimuladas con iomicina + PMA, PHA, anti CD3, anti CD2, SEB y SEB+ anti CD28. Como primer hallazgo se reportó que la proliferación no se encontraba alterada en ningún paciente e incluso era mayor respecto a los controles sanos. La producción de IL-2 fue significativamente menor cuando las células fueron estimuladas con anti CD3, SEB, anti CD2 y PHA; sin embargo, al estimular con anti CD3+ anti CD28 o con iomicina + PMA se logró una producción de IL-2 a niveles normales respecto a los controles.

El hecho de que no se haya observado ningún defecto en la producción de IL-2 cuando los linfocitos de los pacientes con IDCV fueron estimulados con la combinación de ionomicina + PMA demuestra que la falla en la producción de IL-2 observada con la estimulación con la lectina PHA es debido a un defecto de señalización celular, en vez de una anomalía en la transcripción de genes de IL-2. La estimulación con SEB o anti CD3 sugiere que existe un problema de señalización vía TCR. En cambio, cuando se estimulo con la combinación anti CD3+ anti CD28 la producción de IL-2 se recuperó, lo cual indica que la vía de señalización mediante CD28 parece estar intacta. Este estudio concluye que de acuerdo a los hallazgos antes mencionados, el defecto de producción de IL-2 en estos pacientes no es absoluto, sino que más bien, es un defecto que se puede superar con estímulos apropiados.³⁷

En 1999 se publicó un estudio realizado por Charlotte Cunningham-Rundles y Carol Bodian en 248 pacientes con IDCV en los cuales las anomalías en las células T fueron un factor común. En dicho estudio se reporta que el 40% de los pacientes tuvieron una respuesta proliferativa por debajo de lo normal, respecto a los controles sanos, tras la estimulación con PHA, Con A y PWM. En cuanto a la frecuencia de los linfocitos T se encontró que solo en un 20% de los pacientes había una disminución de los linfocitos TCD4+.¹¹



En 2004, un estudio realizado por Anthony David B. Webster en 150 pacientes con IDCV reportó que un 25% de los mismos presentaba una ligera linfopenia de T CD4+ y el 30% de los pacientes tenía niveles elevados de linfocitos T CD8+. En el 10% se observó una muy baja proliferación tras la estimulación con PHA e incluso con la co-estimulación con anti CD3 y anti CD28.³⁸

Giovannetti A. y colaboradores en 2007 publicaron un estudio realizado en 60 pacientes con IDCV en el que se reportan diversos hallazgos en la inmunidad celular. La frecuencia de los linfocitos T CD4+ se encontró significativamente reducida en comparación con los controles sanos, en cambio; la frecuencia de los linfocitos T CD8+ se reportó significativamente incrementada. Aunado a este dato se observó que la generación tímica de los linfocitos T CD4 *naive* esta significativamente reducida en comparación con los controles. Tras la estimulación con ionomicina y PMA en presencia de brefeldina A, se midieron los niveles de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2. La producción de IFN- γ se encontró significativamente incrementada en los pacientes, mientras que la IL-10 estaba significativamente disminuida. Se observó que tanto IL-4 como IL-2 se mantienen en los valores normales respecto a los controles en todos los pacientes con IDCV. En cuanto a la proliferación, ésta se encontró incrementada tanto en los linfocitos T CD4+ como en los linfocitos T CD8+, sin embargo; se observó un incremento significativo en la expresión de anexina- V lo cual indica un aumento en la apoptosis de los linfocitos T CD4+ y CD8+.³⁹

Rezaei N, Aghamohammadi A y colaboradores, en 2010 analizaron la producción de citocinas en 27 pacientes con IDCV tras la estimulación con PHA. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 respecto a los controles sanos. La producción de IFN- γ fue significativamente mayor en los pacientes.⁴⁰

A pesar de que existen una serie de investigaciones sobre la naturaleza de la IDCV desde que fue reconocida por primera vez en 1953,⁴¹ las causas



fundamentales de esta enfermedad siguen siendo desconocidas; por lo que resulta de suma importancia continuar estudiando a profundidad esta patología.

2.2.6.3 PD-1/PD-L1 y autoinmunidad.

El receptor de muerte celular programada (PD1) y su ligando (PD-L1) tienen una importante función inhibitoria que juegan un papel sumamente relevante en la regulación y homeostasis de la respuesta inmune.

Las moléculas PD-1/PD-L1 pertenecen a la familia B7/CD28. La expresión de PD1 se induce en linfocitos T CD4+, T CD8+, células NKT, linfocitos B y monocitos tras la activación, aunque en los linfocitos T *naive* se expresa de manera constitutiva en niveles muy bajos. PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD274) se expresa en linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas y macrófagos, siendo mayormente expresado después de la activación.¹⁶

En las células T activadas, PD-1 se encuentra proximal a la membrana plasmática y cerca del aparato de Golgi y la red trans-Golgi. Durante la co-estimulación con la CD, PD-1 interactúa con PD-L1 y conduce a la célula T a la señalización. La interacción de PD-1 y PD-L1 da como resultado la fosforilación de los motivos basados en tirosina con función inhibitoria del inmunoreceptor (ITIM) y los motivos *switch* basados en tirosina del inmunoreceptor (ITSM) en la cola citoplasmática, que promueve el reclutamiento de la tirosin-fosfatasa que contiene el dominio de homología con SRC 2 (SHP2) y conlleva a la defosforilación del fosfatidilinositol 3-cinasa (PIK3). PIK3 defosforilada es incapaz de activar Akt, una protein-cinasa de treonina/serina que promueve la activación, proliferación y supervivencia de la célula T. Akt activa *NFκB*, un factor de transcripción que aumenta la expresión de *Bcl-2* (una proteína de membrana anti-apoptótica mitocondrial) y *c-Myc* (un factor de transcripción promotor del crecimiento), e induce la expresión de IL-2. Akt también inactiva *Bad* (una proteína de membrana mitocondrial proapoptótico) y miembros de la Caja de Forkhead (FH) una familia de factores de transcripción, que inducen la



muerte celular. Además, la señalización por PD-1 impide directamente la señalización por el TCR ya que bloquea por fosforilación a CD3, Zap70, y PKC θ . Por lo tanto, el efecto de PD-1 es la inducción de un estado anti-proliferativo y pro-apoptóticos en las células T.¹⁷

La vía de señalización por PD-1/PD-L1 es muy importante para numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo de la tolerancia central y periférica. Diversos experimentos demuestran que la deficiencia genética de PD-1 conlleva al desarrollo espontáneo de enfermedades autoinmunes con manifestaciones que dependen del fondo genético de los ratones empleados: glomerulonefritis en ratones C57BL / 6 y cardiomiopatía en ratones BALB / c.^{18,19} Por otro lado, utilizando anticuerpos que bloquean PD-1 y PD-L1 se han inducido en ratón encefalomiелitis y enteritis autoinmune.²⁰ En los seres humanos, se ha detectado que polimorfismos en PD-1 están asociados con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes tipo 1. Lo anterior indica que la interacción de PD-1/PD-L1 ayuda a inhibir la activación de células T autoinmunes.¹⁷

2.2.6.4 CTLA-4 y autoinmunidad.

El antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico (CTLA-4 ó CD152) es una molécula de superficie que se expresa exclusivamente en linfocitos T CD4 y CD8 activados y se une a los mismos ligandos de CD28: B7-1 y B7-2, pero con una afinidad de 20 a 50 veces mayor. Sin embargo, mientras que CD28 provee una señal co-estimuladora para el desarrollo de una respuesta inmune, la evidencia sugiere que CTLA-4 inhibe la activación de las células T. CTLA-4 regula la tolerancia periférica a través de diferentes mecanismos. En primer lugar inhibe la activación de células T patogénicas mediante la modulación del sistema de señalización del TCR, específicamente con la fosforilación de su cadena ξ . Sin embargo el mecanismo exacto de la señalización a través de la cola citoplasmática de CTLA-4 y el papel que juega PIK-3 cinasa y SHP-2 es aún desconocido.²¹



Diversos estudios demuestran que el bloqueo de CTLA-4 con anticuerpos monoclonales, aumenta la proliferación celular, la producción de IL-2 y la velocidad del ciclo celular.²² En general se ha observado en modelos animales que el bloqueo de CTLA-4/B7 interfiere con el progreso de enfermedades autoinmunes como diabetes, lupus, encefalomiелitis y artritis reumatoide. De igual modo ratones *knockout* de CTLA-4 desarrollan enfermedades autoinmunes espontáneas.²³

El papel de CTLA4 se ha investigado en diversas enfermedades autoinmunes humanas. Originalmente, la asociación entre CTLA4 y las enfermedades autoinmunes se demostró en un estudio que abarcó pacientes con enfermedad de Graves, actualmente CTLA-4 se relaciona con la esclerosis múltiple, diabetes tipo 1 y lupus eritematoso sistémico.²¹

En conjunto, estas observaciones sugieren que la interacción de CTLA-4/B7 juega un papel crítico en la regulación de la tolerancia y por lo tanto en la susceptibilidad de la presencia de enfermedades autoinmunes.

2.2.7 Relevancia del estudio de la IDCV.

A pesar de los importantes avances logrados en la comprensión de la IDCV, incluidos las alteraciones de algunos genes y la detección de disfunciones de diversos componentes del sistema inmune, en la mayoría de los pacientes con IDCV se desconoce la causa exacta de la presencia de esta enfermedad.

La dificultad en el estudio de estos pacientes probablemente está relacionada con la heterogeneidad en las características clínicas e inmunológicas, que van desde las infecciones recurrentes hasta la presencia de enfermedades autoinmunes.

Aun con la creciente acumulación de conocimientos, varias preguntas fundamentales siguen sin respuesta en la IDCV, como lo son: la capacidad de



activación y proliferación de los linfocitos T, las alteraciones precisas en la producción de citocinas, la función de las diversas moléculas co-estimuladoras, la función de las APC, entre otras. Por lo tanto es necesario abordar a profundidad todas estas incógnitas con la finalidad de comprender a fondo esta patología y en un futuro implementar nuevos tratamientos que brinden a los pacientes una mejor calidad de vida.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los resultados de estudios previos demuestran que no existe un consenso acerca de la frecuencia, capacidad de proliferación y diferenciación de los linfocitos T en los pacientes con IDCV. En vista de la alta incidencia de autoinmunidad en dichos pacientes, es posible que estas discrepancias puedan explicarse de acuerdo a la presencia o ausencia de enfermedades autoinmunes que acompañan la inmunodeficiencia. Por lo anterior, resulta de suma importancia realizar estudios que proporcionen mayor información acerca de la inmunidad celular en pacientes con IDCV.

4. HIPÓTESIS.

La frecuencia, capacidad de activación y diferenciación de los linfocitos T en los pacientes con IDCV dependerá de la presencia o ausencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes

5. OBJETIVO.

Evaluar la frecuencia, capacidad de activación y diferenciación de los linfocitos T en pacientes con IDCV con presencia o ausencia de enfermedades autoinmunes.



5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar la frecuencia de linfocitos T tanto CD4 como CD8 en sangre periférica de pacientes con IDCV.
- Determinar la capacidad de proliferación de los linfocitos T de pacientes con IDCV.
- Evaluar la capacidad de diferenciación de los linfocitos T de pacientes con IDCV a través de la producción de citocinas.
- Evaluar la expresión de moléculas involucradas con el freno de la activación celular (PD1, PDL-1 y CTLA-4) en pacientes con IDCV.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Sangre periférica de pacientes con IDCV. Se trabajó con un grupo de 19 pacientes con diagnóstico de IDCV. Las muestras de sangre periférica de los pacientes fueron obtenidas por punción venosa en la Clínica de Alergia e Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Cabe señalar que todos los pacientes se encontraban bajo tratamiento de gammaglobulina humana sin ningún otro tratamiento adicional a este; y las muestras se tomaron al día 30 después de la administración de dicho tratamiento con la finalidad de que éste no influyera en las determinaciones realizadas, recordando que el tiempo la vida media de las gammaglobulinas es de aproximadamente 21 días.²⁷



Sangre periférica de individuos sanos. Se trabajo con un grupo de 16 controles sanos. La sangre de individuos sanos se obtuvo a partir de concentrados leucocitarios de donadores del banco central de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

6.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES

6.2.1 EQUIPOS.

- ✓ Campana de flujo laminar Forma Scientific®
- ✓ Centrífuga Hettich®
- ✓ Incubadora Nuair®
- ✓ Sistema de purificación de agua Mili-Q® Millipore®
- ✓ Citómetro de flujo FACS ARIA®
- ✓ Citómetro de flujo FACS CALIBUR®

6.2.2 REACTIVOS.

- ✓ Azul tripano.
- ✓ 5-carboxifluorescein-succidimilester (CFSE), Fluka®
- ✓ Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*. (SEB), Toxin Technology®
- ✓ Anti humano CD2 conjugado con PE, BD Pharmingen®
- ✓ Anti humano CD3 conjugado con PE, eBioscience®
- ✓ Anti humano CD4 conjugado con PECy7, BD Pharmingen®
- ✓ Anti humano CD8 conjugado con APCH7, BD Pharmingen®
- ✓ Anti humano PD1 conjugado con FITC, BD Pharmingen®
- ✓ Anti humano PDL-1 conjugado con PE, BD Pharmingen®
- ✓ Anti humano CTLA-4 conjugado con PECy5, BD Pharmingen®
- ✓ “Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix”, eBioscience®.



6.2.3 SOLUCIONES.

- ✓ PBS 10X: 82g/L NaCl, 1.56g/L KCl, 11.5g/L Na₂HPO₄, 3.42g/L KH₂PO₄.
- ✓ PBS 1X: dilución 1:10 a partir del PBS 10X y ajustando volumen con agua Mili-Q, pH 7.4.
- ✓ PBS/BSA 0.1% filtrado.
- ✓ Buffer de FACS: PBS 1X, 2% de suero de caballo, 5mM EDTA.
- ✓ Medio RPMI 1640 suplementado: aa no esenciales, L-glutamina, piruvato de sodio, SFB, 2-β-MeOH, penicilina/estreptomicina.
- ✓ Suero fetal bovino, HyClone®

6.2.4 Citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de estudio y detección rápida y sencilla de determinados parámetros de células (o partículas) cuando fluyen a través de un punto donde se cruzan con un laser. Mientras esto sucede se pueden hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales: una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.

Sistema de flujo

El sistema de flujo posee un capilar a través del cual se hace pasar un líquido isotónico, a manera de una funda, con una velocidad y presión constante; estas características son necesarias para la formación de un flujo laminar (sin turbulencia). Al mismo tiempo, por el centro del capilar se hace pasar la suspensión celular, con aproximadamente de 5×10^5 a 2×10^7 células/mL y a una presión mayor que la del flujo acarreador. Este enfoque



hidrodinámico asegura de que las células permanezcan centradas y viajen una tras otra en el chorro de inyección.

Sistema óptico

La fluorescencia y la luz dispersada se producen cuando una célula contenida en el líquido inyectado pasa por el rayo enfocado de un láser. La luz dispersada hacia el frente es colectada por un detector que capta la luz difractada entre 1 y 10° arriba o abajo del punto de incidencia del láser. La luz dispersada lateralmente y la fluorescencia son colectadas por un lente que está a 90° del eje de incidencia del láser. Esta luz lateral y la fluorescencia son divididas por un “beamsplitter” (Divisor del rayo) para separar entre la luz difractada y la fluorescencia. La luz dispersada hacia delante (*Forward scatter*) provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados (*Side scatter*) provee información sobre la granularidad y morfología celular. La fluorescencia es a su vez dividida por un espejo dicróico que permite distinguir entre diferentes longitudes de onda; si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro. Cada detector de fluorescencia tiene otros filtros ópticos para excluir la luz del láser dispersada y para dejar pasar la luz con la longitud de onda deseada para ese detector.

Obtención de los datos e interpretación.

El citómetro va acompañado por una computadora que adquiere los datos proporcionados por el sistema eléctrico y hace una presentación gráfica. La computadora produce un histograma o un despliegue de dos parámetros (dot plot o contour plot) a partir de la luz dispersada por las células o a partir de la fluorescencia.⁵¹



6.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

6.3.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Tanto el concentrado leucocitario de individuos sanos como la sangre periférica de pacientes con IDCV se diluyó 1:1 en PBS. Posteriormente se purificaron las células mononucleares por un gradiente Ficoll-Hypaque y se sometieron a centrifugación a 2000 rpm por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se colectaron las células y se lavaron con PBS, a 1500 rpm durante 3 minutos, posteriormente se realizó un lavado a 700 rpm durante 10 minutos y finalmente un tercer lavado a 1500 rpm durante 10 minutos. Enseguida se resuspendió el botón celular en PBS y se contaron las células empleando azul tripano en una cámara de Neubauer.

6.3.2 Fenotipificación de PBMC.

Una vez obtenidas las PBMC se realizó una fenotipificación para observar las frecuencias de linfocitos T utilizando los anticuerpos CD3-PE, CD4-PECy7 y CD8-APCH7. La incubación se realizó por 20 minutos en completa protección de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación se efectuaron 2 lavados a 1500 rpm durante 3 minutos con buffer de FACS. Por último las células fueron resuspendidas en 200µL de buffer de FACS para ser analizadas por citometría de flujo (FACS ARIA).

6.3.3 Cultivos celulares.

- **Cultivo celular (proliferación).**

Marcaje con CFSE. Las células fueron resuspendidas a 1×10^7 cel/ml PBS/BSA 0.1 %, posteriormente se adicionó CFSE (1µl CFSE/ml suspensión celular) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción de marcaje agregando suero fetal bovino en la misma



proporción que el PBS/BSA 0.1%. Por último se lavaron las células con PBS/BSA 0.1% a 1500 rpm durante 3 minutos y se resuspendieron en medio RPMI.

En una placa de cultivo celular de 12 pozos, se colocó en cada pozo un millón de células previamente marcadas con CFSE en un mililitro de medio RPMI. En el primer pozo sólo se colocaron las células resuspendidas (condición sin estimular), en el segundo pozo se adicionó 1µl de SEB y en el tercer pozo se agregó 1µl de SEB y 1µl de anti- CD28.

La placa se incubó durante 6 días a 37°C y 5% de CO₂.

- **Cultivo celular (expresión de receptores de co-inhibición).**

En una placa de cultivo celular de 12 pozos, se colocó en cada pozo un millón de células en un mililitro de medio RPMI. En el primer pozo sólo se colocaron las células resuspendida (condición sin estimular), en el segundo pozo se adicionó 1µl de SEB. La placa se incubó durante 2 días a 37°C y 5% CO₂.

6.3.4 Tinción superficial de inmunofluorescencia.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del cultivo celular, se recuperaron las células centrifugando a 1500 rpm durante 3 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados y almacenados a -70°C para su posterior empleo.

Las células fueron colocadas en una placa de fondo cónico e incubadas con la mezcla de anticuerpos correspondiente. Para el cultivo de proliferación los anticuerpos fueron CD3-PE, CD4-PECy7 y CD8-APCH7. Cabe señalar que la proliferación celular fue seguida a través de la CFSE que es detectada en el canal correspondiente a FITC.

Para el cultivo de expresión de receptores de co-inhibición se utilizó CD2-PE, CD4-PECy7, CD8-APCH7, PD1-FITC, PDL-1-PE y CTLA-4 -PECy5.

La incubación se realizó por 20 minutos en completa protección de la luz.

Transcurrido el tiempo de incubación se efectuaron 2 lavados a 1500 rpm durante 3 minutos con buffer de FACS. Por último las células fueron



resuspendidas en 200 μ L de buffer de FACS para ser analizadas por citometría de flujo (FACS ARIA).

6.3.5 Detección de citocinas.

Una vez seleccionados los sobrenadantes previamente preservados a -70°C , se descongelaron a temperatura ambiente. Inicialmente se reconstituyeron las 13 proteínas estándar que contiene el kit “Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix” para posteriormente a partir de estas preparar la mezcla estándar con 10 μ l de cada proteína. Esta mezcla representa la concentración más alta de las 13 citocinas y por medio de siete diluciones seriales se construyó una curva decreciente de concentración. Esta curva permite determinar la cantidad de cada citocina presente en las muestras. En seguida se preparó la mezcla de perlas de acuerdo al número de muestras a tratar; de igual manera se preparó la mezcla de anticuerpos conjugados con biotina.

En una placa de fondo cónico de 96 pozos se colocaron las muestras (25 μ l) y a continuación se les agregó a cada pozo 8.5 μ l de la mezcla de perlas y 17 μ l de la mezcla de anticuerpos conjugados con biotina. Se incubaron durante 2 horas en total protección de la luz a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó cada pozo con 200 μ l de Buffer de Ensayo a 200 xg durante 5 minutos y en seguida se adicionaron 17 μ l a cada pozo de la solución de Estreptavidina-PE y se incubó a temperatura ambiente por una hora en total protección de luz. Terminado el tiempo de incubación se realizó un lavado bajo las mismas condiciones antes mencionadas y finalmente se agregaron 400 μ l de Buffer de Ensayo para proceder al análisis por citometría de flujo (FACS CALIBUR).



6.3.6 Análisis estadístico.

Todo el análisis estadístico y las representaciones gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism 6 para Windows. Para comparar varios grupos se utilizó la prueba de Krustal-Wallis, mientras que para la comparación de dos grupos se empleó la prueba Mann-Whitney de dos colas.



7. RESULTADOS.

7.1 Identificación de las subpoblaciones celulares presentes en la sangre periférica de individuos sanos y pacientes con IDCV.

Se realizó una tinción de superficie con una mezcla de anticuerpos marcados con distintos fluorocromos los cuales se analizaron por citometría de flujo. Inicialmente se descartaron los detritus celulares (**Figura 1A**), después se eliminaron las células agregadas que pudieran estar presentes en el momento de pasar la suspensión celular en el citómetro de flujo (**Figura 1B**), y a partir de estas se seleccionaron aquellas positivas para el marcador CD3 (**Figura 1C**) presente en los linfocitos T; por último para poder identificar a los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se incluyeron estos dos últimos marcadores y se seleccionaron las regiones positivas respectivas para cada marcador (**Figura 1D**).

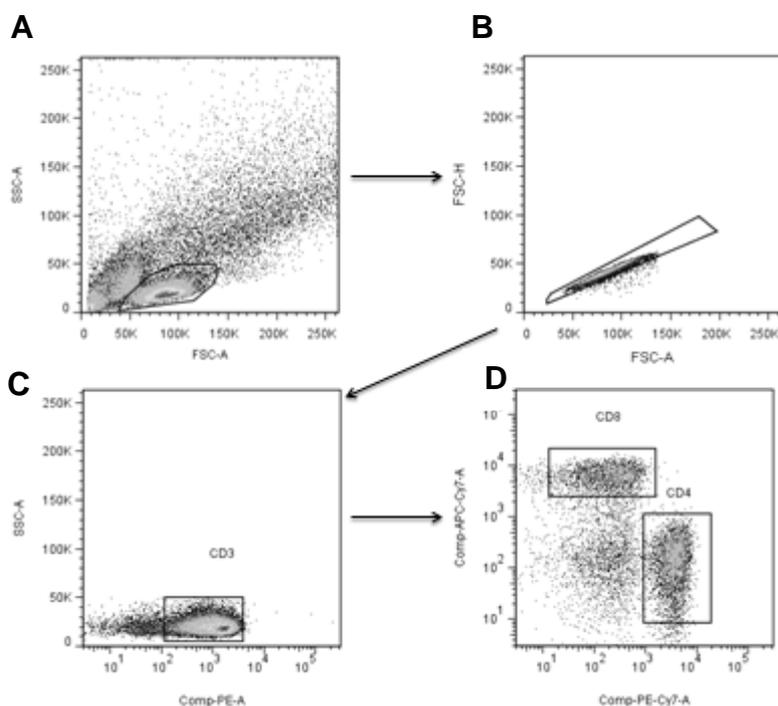


Figura 1. Análisis de linfocitos T presentes en sangre periférica. Gráficas de puntos representativas de la secuencia de análisis realizado para identificar las subpoblaciones de linfocitos T. A) Exclusión de detritus celulares, B) Región sin células agregadas, C) Región de linfocitos T, D) Subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.



7.2 Frecuencias de los linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en los pacientes con IDCV.

En diversos trabajos se ha estudiado cómo se encuentra la frecuencia tanto de los linfocitos B como de los linfocitos T en grupos de pacientes con IDCV. En general se ha observado que en los pacientes existe una linfopenia de T CD4+ y en algunos trabajos se reporta un incremento de los linfocitos TCD8+. En cuanto a los linfocitos B se sabe que estos se encuentran en niveles normales respecto a los controles o ligeramente disminuidos. Inicialmente se determinó la frecuencia de los linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en los 19 pacientes y 16 controles, hallándose una disminución significativa ($p < 0.05\%$) en la frecuencia de los linfocitos B en los pacientes con IDCV respecto a los controles sanos, sin embargo; en ningún caso existe ausencia de linfocitos B, lo que coincide con las características del diagnóstico de IDCV de cada uno de los pacientes incluidos en este estudio (**Figura 2A**).

En cuanto a los linfocitos T se encontró una disminución significativa de los linfocitos T de los pacientes con IDCV (**Figura 2B**) observada mediante el marcador CD3+. Dicha disminución en la frecuencia de linfocitos T es debida a una disminución de los linfocitos T CD4+ (**Figura 2C**) donde de igual manera se observa una disminución significativa de la frecuencia de los mismos respecto a los controles. Por otro lado, los linfocitos T CD8+ no se encuentran afectados y su proporción no presenta diferencias respecto a los controles (**Figura 2D**). Debido a que los linfocitos T CD8+ no tienen alteraciones notables, los siguientes estudios realizados en este trabajo se enfocaran en los linfocitos T CD4+.

En todas las gráficas los triángulos negros señalan a los 6 pacientes que presentan enfermedades autoinmunes, mientras que en círculos grises se muestran a los demás pacientes que no presentan enfermedades autoinmunes.



De acuerdo a este parámetro, en la Figura 2 se puede observar que tanto la disminución de la frecuencia de los linfocitos B como de los linfocitos T CD3+/CD4+ es independiente a la presencia o ausencia de autoinmunidad.

▲ Pacientes con autoinmunidad
● Pacientes sin autoinmunidad

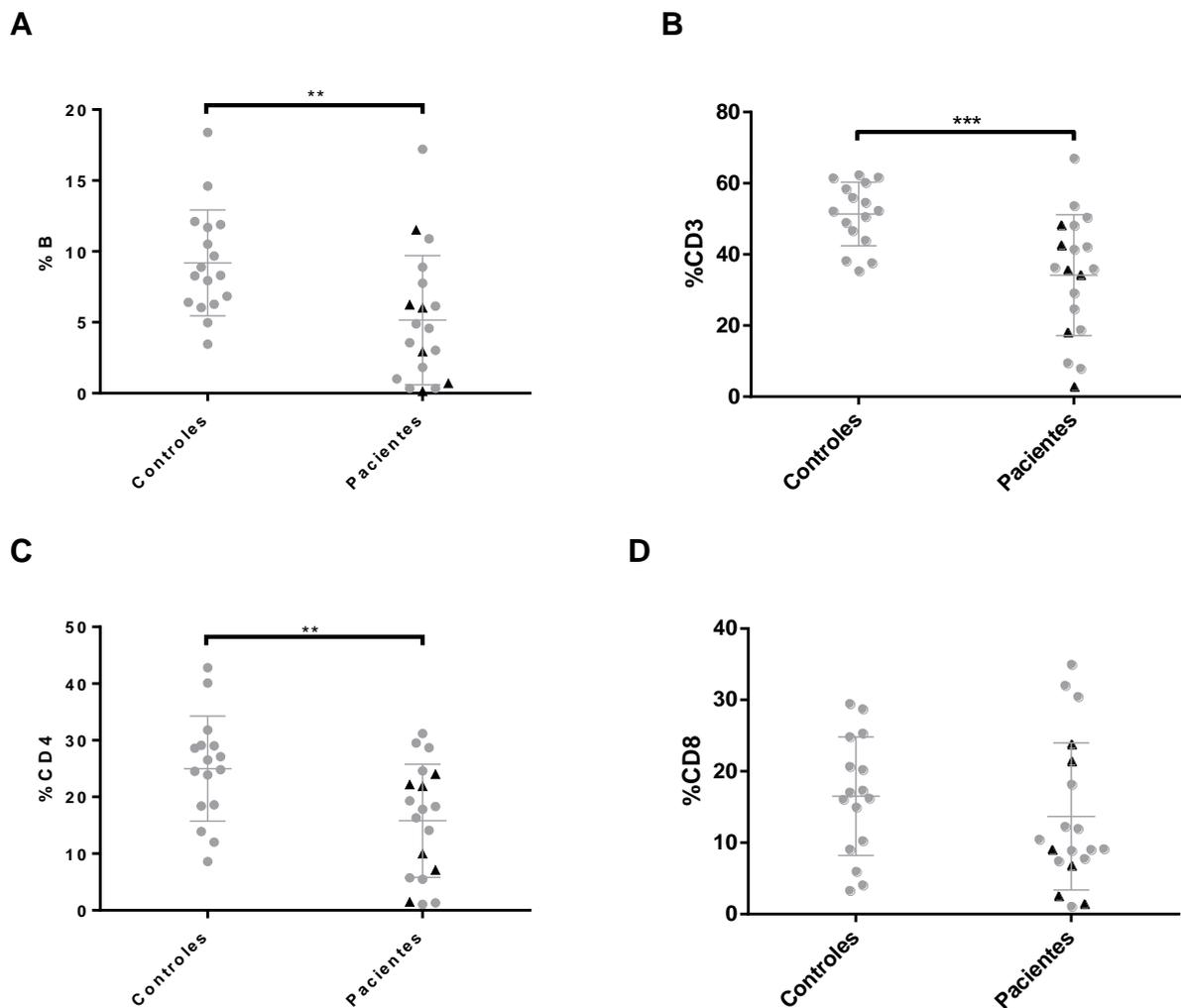


Figura 2. Frecuencias de los linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en los pacientes con IDCV. En las gráficas se muestran tanto a los controles como a los pacientes: A) Frecuencia de linfocitos B, B) Frecuencia de linfocitos T CD3+, C) Frecuencia de linfocitos T CD4+, D) Frecuencia de linfocitos T CD8+. * = $P < 0.05$



7.3 Evaluación de la capacidad de proliferación de linfocitos T en pacientes con IDCV.

Una vez que se obtuvieron las células mononucleares tanto de los pacientes con IDCV como de los controles sanos, se procedió a realizar un cultivo por seis días estimulado por un lado con SEB (Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*) y por otro lado con SEB más anti-CD28. Esto se realizó con la finalidad de determinar si los linfocitos T de los pacientes eran capaces de ser activados vía TCR-MCH II (dado que es la manera en la que actúa el superantígeno) y si la señalización por esta vía era suficiente o requería la co-estimulación adicional; para lo que se adicionó anti-CD28; de tal manera que como consecuencia se observara la proliferación de los linfocitos T.

En la **Figura 3** se muestra un histograma representativo de la proliferación observada tanto en los controles como en los pacientes tras el análisis de la muestra por citometría de flujo. Todas las células del cultivo fueron marcadas con CFSE (5-carboxifluorescein-succidimilester) y a través de la fluorescencia emitida por este compuesto fue posible determinar la capacidad de proliferación de los linfocitos T debido a que con cada división celular se observa una menor fluorescencia como consecuencia de la división equitativa del compuesto. Como se muestra en la figura, la intensidad de fluorescencia emitida tras la estimulación en ambas condiciones es mucho menor en comparación con el cultivo sin estimular, lo cual indica que los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ han proliferado.

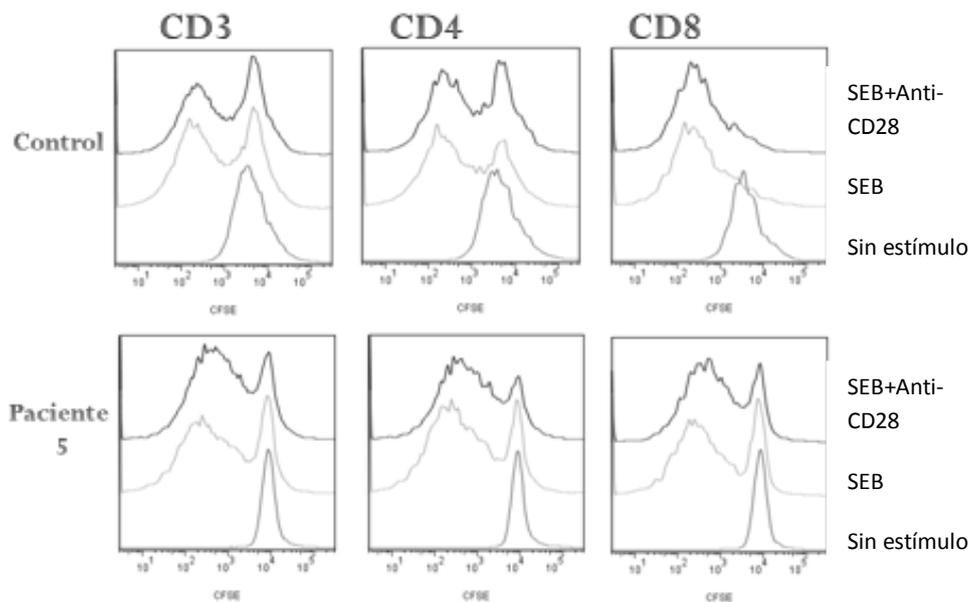


Figura 3. Histogramas representativos de la proliferación de linfocitos T de controles sanos y pacientes con IDCV. Los histogramas muestran la proliferación de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ tras la activación con SEB y SEB+ anti-CD28.

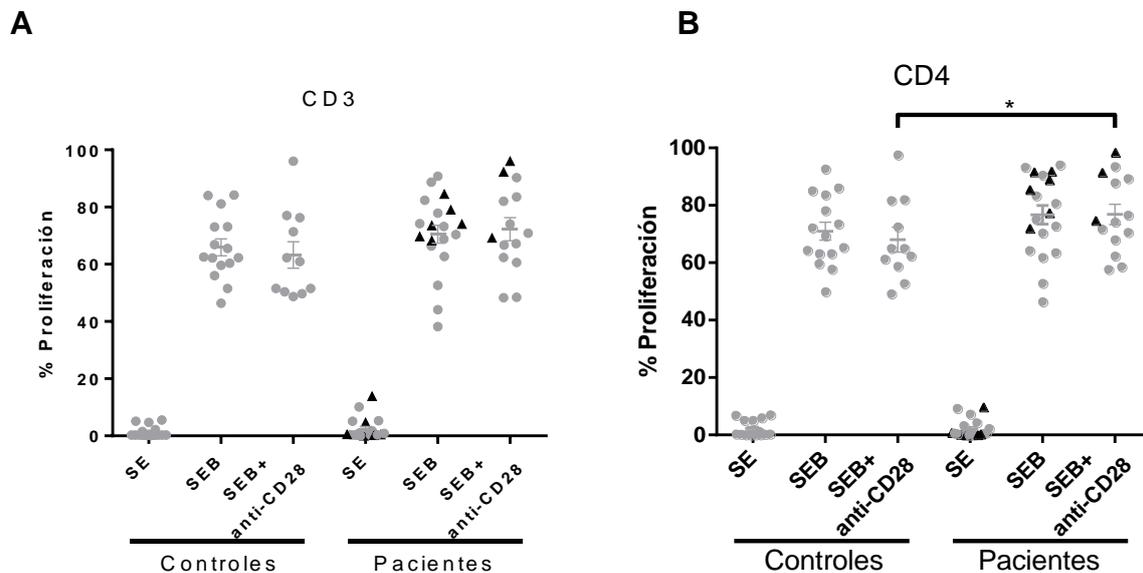
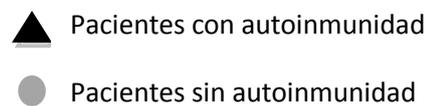
El análisis mostrado anteriormente fue realizado para cada paciente y control sano. Los datos recopilados se muestran en la **Figura 4**.

Evidentemente tras la estimulación en ambas condiciones la capacidad de proliferación es bastante alta tanto en los controles como en los pacientes. Al ser el superantígeno un activador policlonal dicha proliferación resulta entendible dado que la única restricción para la activación es el reconocimiento de alguno de los $V\beta$ que SEB reconoce (3, 12, 14, 15, 17, 20). Interesantemente no se encontró diferencia en la capacidad de proliferación de los linfocitos T en general (**Figura 4A**), sin embargo; aquellos pacientes que presentan alguna enfermedad autoinmune se sitúan en los porcentajes más altos de proliferación tras la activación en ambas condiciones. De la misma manera, en el caso específico de los linfocitos T CD4+ (**Figura 4B**) la proliferación tras la estimulación con SEB no muestra diferencias respecto a los controles e incluso con la estimulación de SEB más anti-CD-28 existe un incremento significativo, en dónde una vez más los pacientes con alguna



enfermedad autoinmune son los que se encuentran situados en los mayores porcentajes de proliferación.

Para corroborar si en efecto el incremento estadísticamente significativo en la proliferación se debía a los pacientes que presentan enfermedades autoinmunes, en la **Figura 4C** se dividió a los pacientes en: pacientes sin enfermedades autoinmunes (S/A) y pacientes con enfermedades autoinmunes (C/A), y se aplicó la prueba estadística correspondiente, encontrándose que efectivamente el incremento significativo en la proliferación se observa solamente en los pacientes con enfermedades autoinmunes.



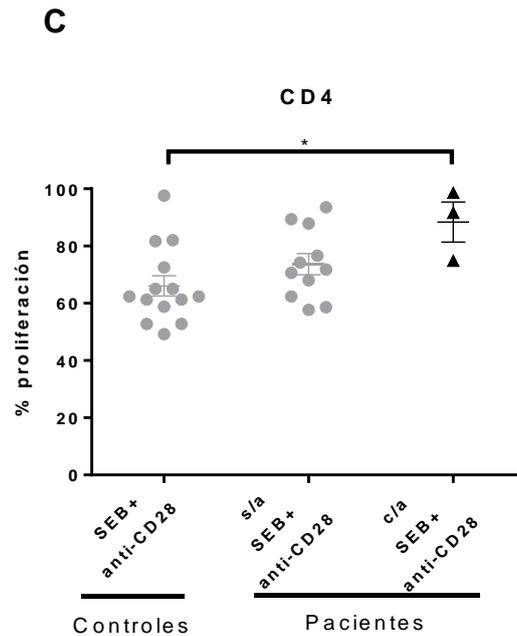


Figura 4. Capacidad de proliferación de los linfocitos T CD3+/CD4+ en pacientes con IDCV. A) Proliferación en linfocitos T CD3+, B) Proliferación en linfocitos T CD4+, C) Aumento en la proliferación en linfocitos T CD4+ de pacientes con IDCV y autoinmunidad. *= P<0.05

7.4 Expresión de PD-1/PD-L1 en linfocitos T de pacientes con IDCV.

Debido a que diversos estudios demuestran una relación estrecha entre la presencia de enfermedades autoinmunes y la expresión de PD-1 y PD- L1; en este estudio se evaluaron a estas moléculas tras la estimulación por 48 horas con SEB.

En la **Figura 5A** se observa que tras la estimulación con SEB, los linfocitos T de los pacientes con IDCV tienen un incremento significativo en la expresión de PD-1, a diferencia de los controles donde a pesar de la estimulación el incremento en la expresión de PD-1 no es estadísticamente significativo. Dicho incremento en la expresión de PD-1 en los pacientes se ve reflejado directamente en sus linfocitos T CD4+ (**Figura 5B**), donde al parecer los pacientes con enfermedades autoinmunes logran expresar niveles más altos de ésta molécula. Para corroborar este dato en la **Figura 5C** se dividió a los pacientes sin enfermedades autoinmunes (s/a) y con enfermedades



autoinmunes (c/a) y posteriormente se aplico la prueba estadística correspondiente la cual reveló que en efecto son los pacientes con alguna enfermedad autoinmune los que expresan mayormente PD-1 en sus linfocitos T CD4+ tras la estimulación con SEB; en cambio, los pacientes sin enfermedades autoinmunes mantienen una expresión de PD-1 baja parecida a la de los controles tras la estimulación.

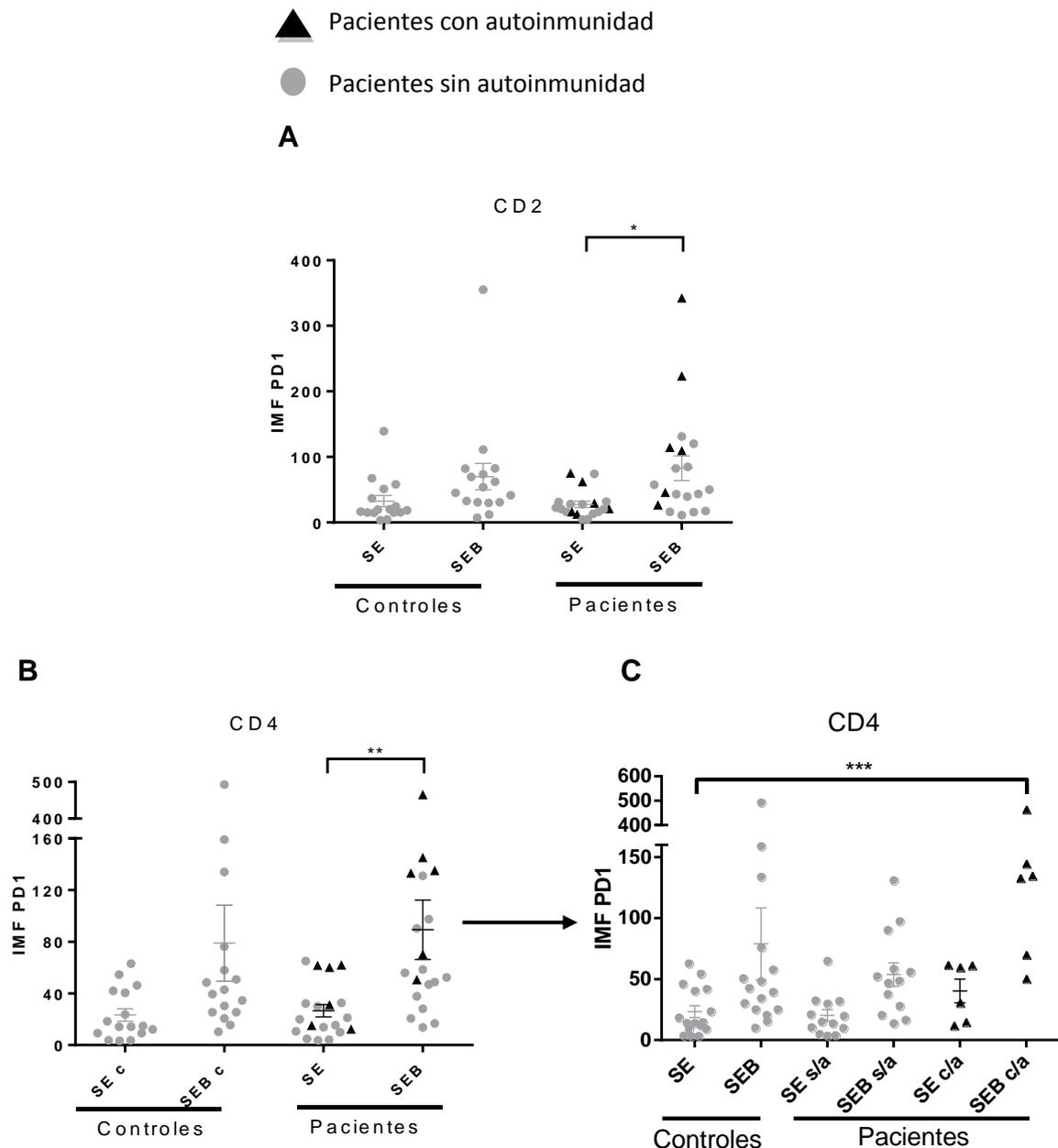


Figura 5. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD2+/CD4+. A) Expresión de PD-1 en linfocitos T CD2+. B) Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+. C) Aumento en la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ de pacientes con IDCV y autoinmunidad. * = $P < 0.05$



De igual manera, tras 48 horas de estimulación con SEB se evaluó la expresión de PD-L1 en los linfocitos T mediante citometría de flujo, hallándose un incremento significativo tanto en los controles como en los pacientes (**Figura 6A**). Sin embargo, al observar a los pacientes que presentan autoinmunidad, estos se encuentran situados a lo largo de la escala de IMF, lo cual indica que el incremento en la expresión de PD-L1 es independiente de la autoinmunidad. En cuanto a los linfocitos T CD4+ presentan el mismo comportamiento que los linfocitos T totales, corroborando el dato de que el incremento de PD-L1 es independiente de la autoinmunidad (**Figura 6B**).

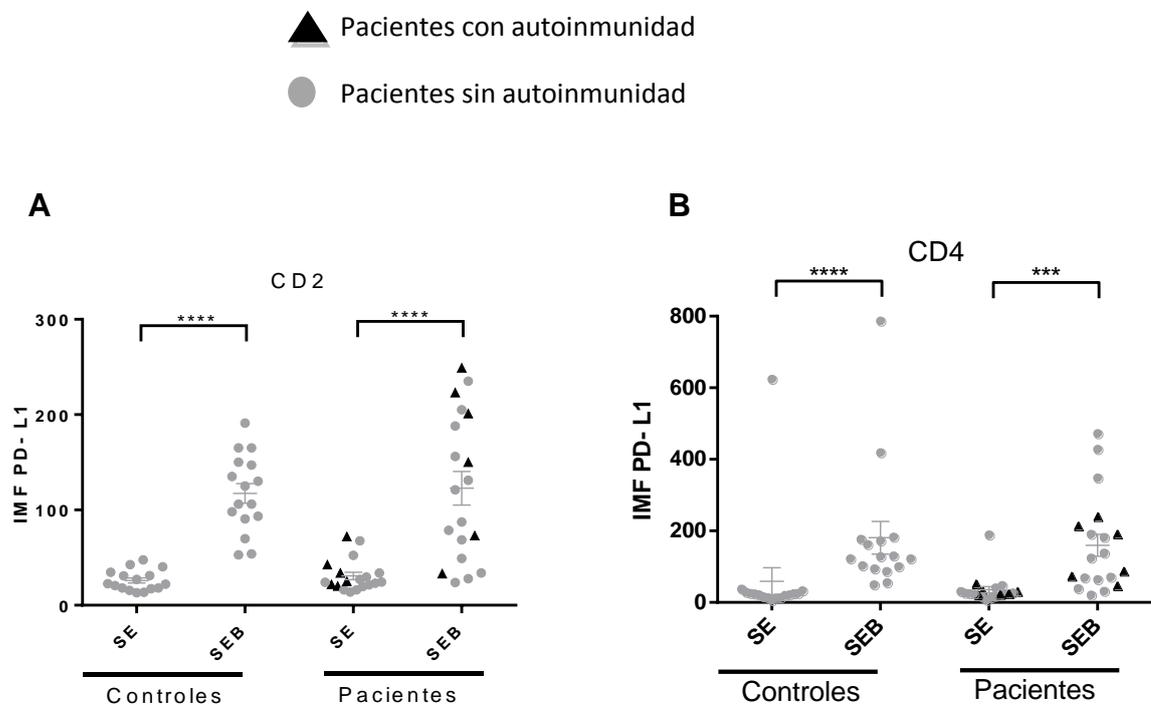


Figura 6. Expresión de PD-L1 en linfocitos T CD2+/CD4+. A) Expresión de PD-L1 en linfocitos T CD2+. B) Expresión de PD-L1 en linfocitos T CD4+. * = $P < 0.05$



7.5 Expresión de CTLA-4 en linfocitos T de pacientes con IDCV.

La relación entre la expresión de CTLA-4 y la presencia de enfermedades autoinmunes ha sido estudiada en diversos trabajos en donde se ha demostrado su papel fundamental en la generación de tolerancia central y periférica. Por lo anterior se evaluó la expresión de esta molécula en los pacientes con IDCV y su posible relación con la presencia o no de alguna enfermedad autoinmune.

Tras 48 horas de cultivo celular estimulado con SEB se determinó mediante citometría de flujo la expresión de CTLA-4. En la **Figura 7A** se observa que existe un incremento significativo en la expresión de dicha molécula en los linfocitos T tanto de los controles como de los pacientes, y este incremento recae en los linfocitos T CD4+ (**Figura 7B**). De acuerdo a la clasificación de la presencia o ausencia de autoinmunidad, es evidente que el incremento en la expresión de CTLA-4 es independiente de la autoinmunidad y en general todos los pacientes con IDCV son capaces de expresar esta molécula de co-inhibición.

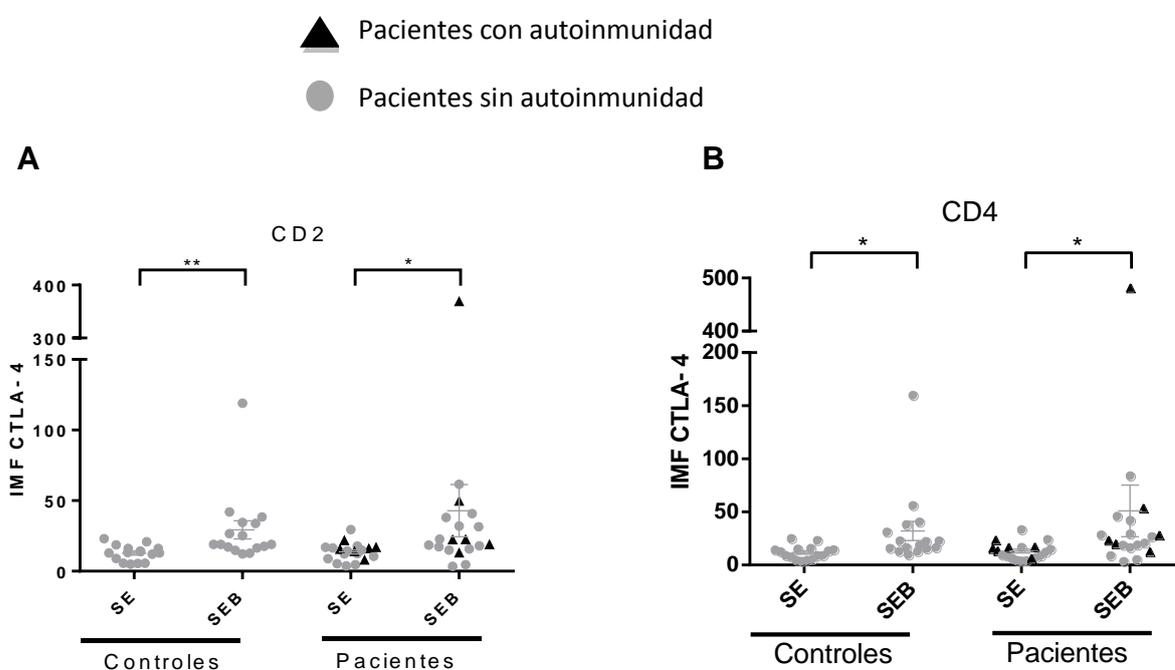


Figura 7. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD2+/CD4+. A) Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD2+. B) Expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4+. * = $P < 0.05$



7.6 Producción de citocinas proinflamatorias en los pacientes con IDCV.

Ante la estimulación con una gran variedad de agentes, incluidas las endotoxinas, los linfocitos T son capaces de expresar citocinas proinflamatorias. Dentro de las citocinas proinflamatorias por excelencia se encuentran la IL-1 y la IL-6, parte de sus efectos proinflamatorios se debe a que inducen la liberación de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. La IL-6 cumple funciones muy parecidas a la IL-1 β , aunque en el caso de la IL-6 también contribuye a la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos⁵⁵.

Las citocinas proinflamatorias tienen un papel relevante en los pacientes con IDCV, ya que su correcta producción es fundamental en el combate a las recurrentes infecciones que presentan. Es por esto que se evaluaron estas citocinas en el grupo de pacientes con IDCV de éste estudio tras la estimulación por 6 días con SEB y con SEB más anti CD-28 con la finalidad de observar cómo se encuentra su producción respecto a los controles y si la co-estimulación puede favorecer o no la producción de las mismas.

En la **Figura 8A** se muestran los resultados para la IL-1 β , donde tanto los pacientes como los controles logran producir cantidades de IL-1 β similares tras la estimulación con ambas condiciones, por lo que no existen diferencias significativas entre grupos. La capacidad de síntesis de ésta citocina en los pacientes con IDCV no se encuentra alterada.

En la **Figura 8B** se observa que la producción de IL-6 tampoco se encuentra alterada en los pacientes con IDCV respecto a los controles, e incluso los pacientes logran incrementar significativamente la cantidad de IL-6 producida tras la estimulación con SEB en comparación de cuando no están estimulados, por lo que la vía de señalización y síntesis para la IL-6 es adecuada.



Cabe señalar que en la evaluación de ambas citocinas, no se observa un patrón característico para los pacientes con IDCV y autoinmunidad, por lo que en general la producción de las citocinas proinflamatorias determinadas es independiente de la autoinmunidad.

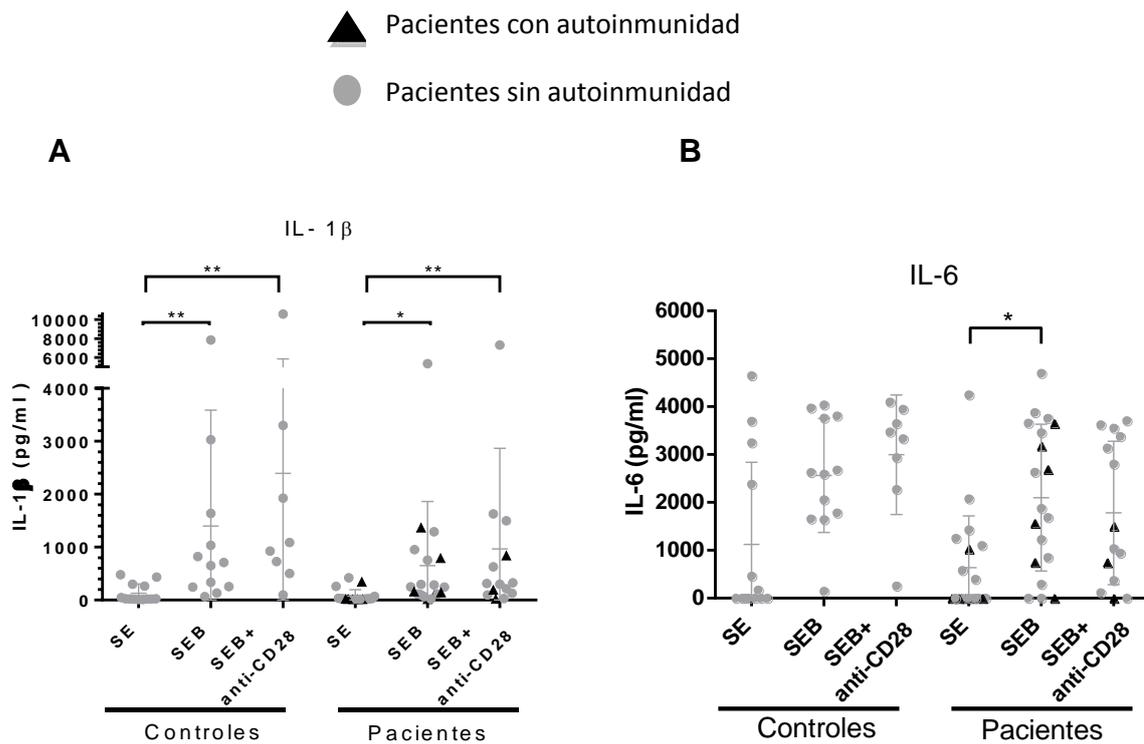


Figura 8. Producción de citocinas proinflamatorias en los pacientes con IDCV. A) Producción de IL-1 β , B) Producción de IL-6. * =P< 0.05



7.7 Producción de IL-10 (anti-inflamatoria) en los pacientes con IDCV.

La IL-10 es capaz de ser producida por linfocitos del tipo Th1 y Th2 y es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar al IFN- γ , TNF- α , IL-2 y IL-1 β . La IL-10 ejerce múltiples actividades inmunomoduladoras necesarias para evitar estados de activación crónicos e incluso respuestas de tipo autoinmune.

Tras la activación por 6 días con SEB y SEB más anti-CD28 se evaluó la producción de IL-10 (**Figura 9**) hallándose en los pacientes con IDCV una disminución significativa respecto a los controles en la producción de esta citocina tras la estimulación con SEB e incluso con la co-estimulación no es posible elevar los niveles de IL-10. Dicha disminución resulta ser independiente de la presencia o ausencia de autoinmunidad.

Es posible observar que en los pacientes a diferencia de los controles, no se logra un incremento significativo respecto a sí mismos en las cantidades de IL-10 tras la activación; esto sugiere que los pacientes con IDCV tienen una alteración en la síntesis de esta citocina a través de la vía señalización MHC II - TCR.

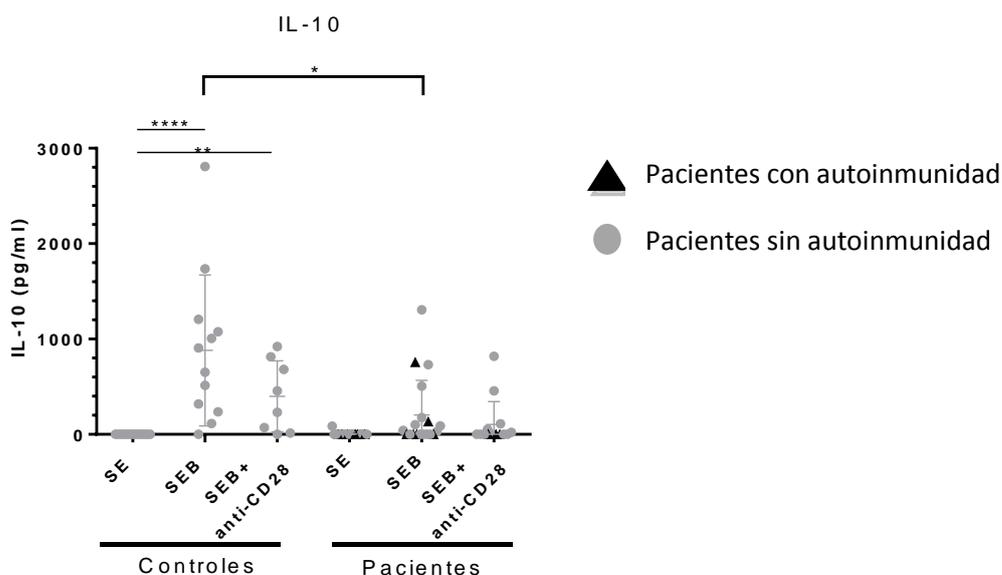


Figura 9. Producción de IL-10 en los pacientes con IDCV. *= $P < 0.05$



7.8 Producción de IL-2 en los pacientes con IDCV.

La IL-2 es secretada por linfocitos T activados por un estímulo antigénico. Es un factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación.

En diversos estudios con pacientes con IDCV esta citocina es una de las más estudiadas, sin embargo, los resultados obtenidos son muy diversos hallándose desde niveles normales de producción hasta niveles sumamente disminuidos respecto a los controles. Es por ello que en el presente estudio se evaluó la producción de IL-2 tras el estímulo por 6 días con SEB y con SEB+ anti-CD28.

En la **Figura 10** se observa que ni los linfocitos T de los controles ni de los pacientes son capaces de producir IL-2 solo con la estimulación con SEB; en cambio, cuando se adiciona anti-CD28 los controles logran incrementar significativamente sus niveles de IL-2, mientras que en los pacientes con IDCV también se observa un incremento significativo aunque un poco menos fuerte respecto a sí mismos sin estimular. Además en presencia de anti CD28, se observa en los pacientes una disminución estadísticamente significativa en la producción de IL-2 respecto a los controles.

Interesantemente en los pacientes con IDCV se logra observar que existe un grupo bien definido de pacientes que con la co-estimulación del anti-CD28 logran recuperar la producción de IL-2 e incluso asemejan la producción de los controles, por otro lado con el resto de los pacientes no se logra esta recuperación. La producción de IL-2 es independiente de la presencia de autoinmunidad.

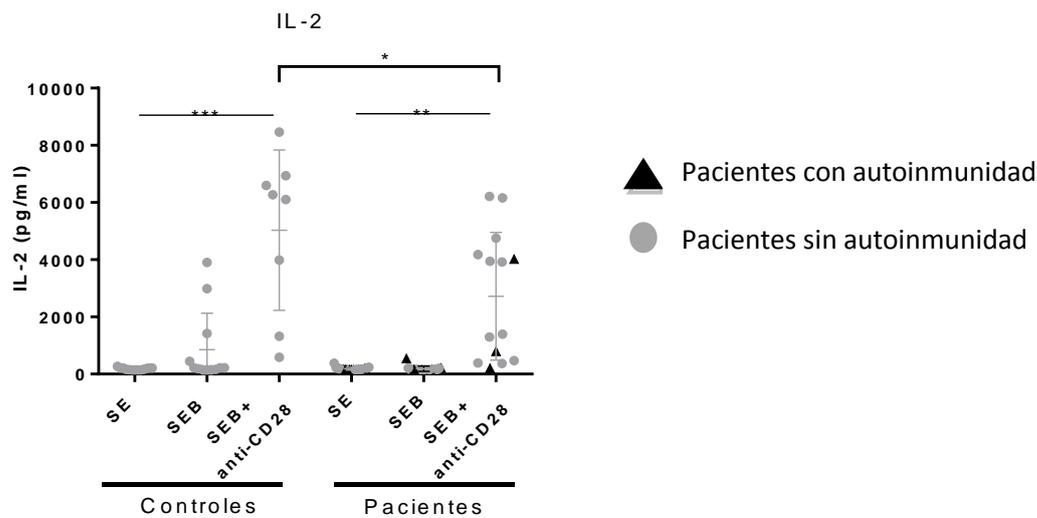


Figura 10. Producción de IL-2 en los pacientes con IDCV. *=P<0.05

7.9 Capacidad de diferenciación hacia el perfil Th1 en los pacientes con IDCV.

Al reconocer el antígeno, las células T indiferenciadas se diferencian en varias clases funcionales de células T efectoras que se especializan en diferentes actividades. Las células T CD4 indiferenciadas pueden diferenciarse por distintas vías que generan subgrupos efectoras con diferentes funciones inmunitarias. Los principales subgrupos efectoras CD4 que se han descubierto a la fecha son los TH1, TH2 y TH17.

Las células Th1 CD4 colaboran en la activación clásica de los macrófagos ya que los Th1 segregan fundamentalmente IFN γ . Los Th1 son importantes en la defensa frente a los microorganismos intracelulares. También ayudan a las células B para la producción de anticuerpo de tipo IgG2.

El IFN- γ es la citocina característica producida por células Th1, que junto con TNF- α , que también es secretada por células Th1 en sitios de infección, cambian las propiedades de superficie de las células endoteliales de modo que



los fagocitos se adhieran a ellas. Debido a la gran importancia que tiene la diferenciación Th1 en el combate a infecciones, es sumamente relevante analizar cómo se encuentra esta diferenciación en los pacientes con IDCV.

En la **Figura 11**, se muestra la producción de las dos citocinas antes mencionadas que nos ayudan a identificar la polarización hacia el perfil Th1. La **Figura 11A** muestra a la citocina característica de perfil Th1, el IFN γ , el cual se encuentra producido en cantidades comparables a las de controles y sin diferencia estadística. También se observa que su producción es independiente de la presencia de enfermedades autoinmunes y existe un incremento significativo bastante alto respecto a sí mismos sin estimular tras la activación con SEB y SEB más anti-CD28, el cual no se observa tan fuertemente en los controles.

Aunado a lo observado con el IFN γ , en la **Figura 11B** se muestra la producción de TNF α , la cual tampoco se encuentra afectada en los pacientes con IDCV, es decir; no existen diferencias respecto a los controles. De igual manera su producción es independiente de la presencia de enfermedades autoinmunes y se observa un incremento significativo en presencia de anti-CD28 respecto a sí mismos sin estimulación, en cambio los controles muestran niveles estadísticamente superiores incluso solo con la estimulación con SEB respecto a sí mismos sin estimular.

De acuerdo a estos resultados, todos los pacientes con IDCV tienen una capacidad de diferenciación Th1 adecuada dado que no hay diferencias estadísticas entre éstos y los controles.

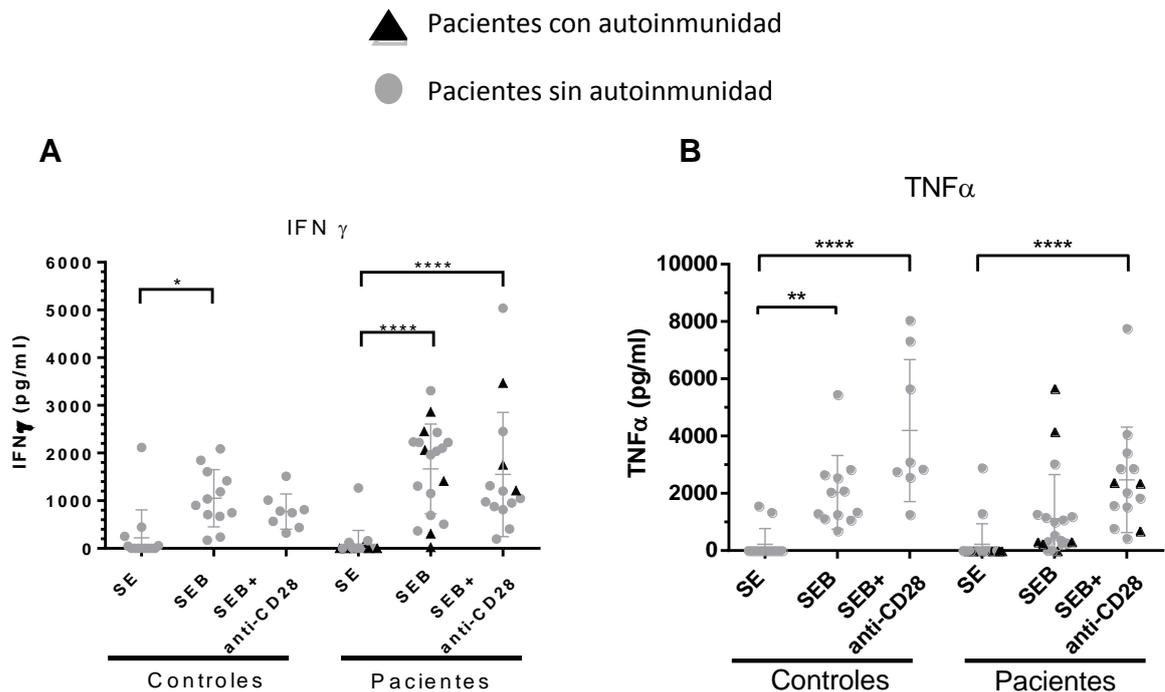


Figura 11. Diferenciación hacia Th1 en pacientes con IDCV. A) Producción de IFN γ , B)Producción de TNF α . * =P< 0.05

7.10 Capacidad de diferenciación hacia el perfil Th2 en pacientes con IDCV.

Las células Th2 CD4, producen principalmente IL-4 (que estimula la secreción de IgE), IL-5 (que activa eosinófilos) e IL-13 (homóloga de IL-4 que comparte varias funciones biológicas como la estimulación de la secreción de IgE). Los Th2 son importantes en las reacciones alérgicas y en la defensa frente a parásitos.

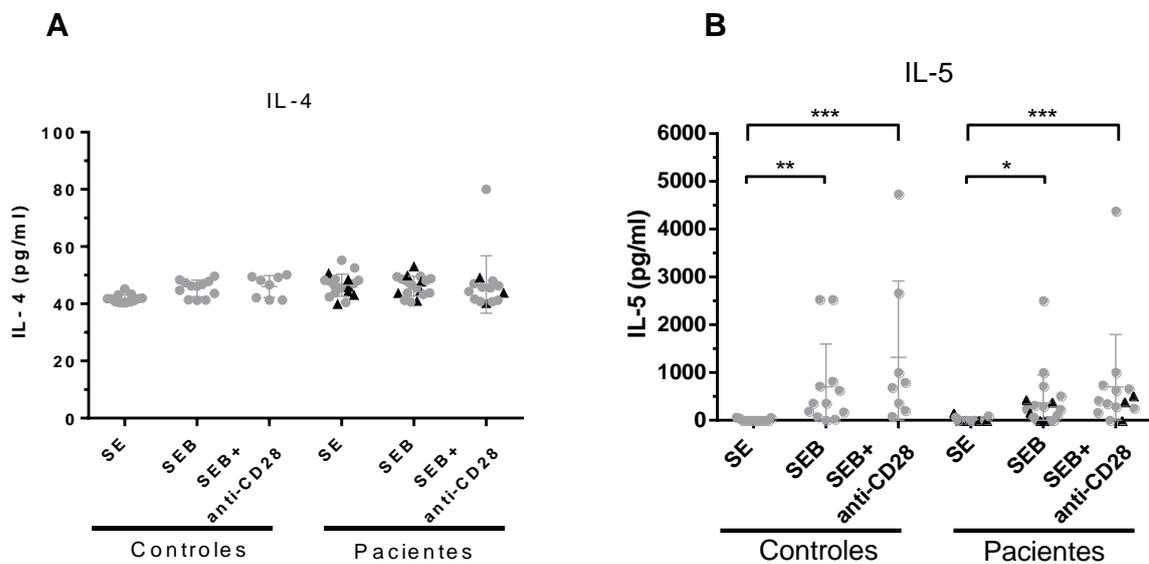
Como se muestra en la **Figura 12**, los pacientes con IDCV no presentan una diferenciación alterada hacia Th2. Tanto la IL-4 (**Figura 12A**), IL-5 (**Figura 12B**) e IL-13 (**Figura 12C**), se producen en cantidades normales respecto a los controles tras la estimulación con SEB y SEB más anti-CD28. Tampoco se observa que los pacientes que presentan enfermedades autoinmunes tengan



un patrón específico en la producción de dichas citocinas, por lo que en general todos los pacientes tienen una capacidad de diferenciación Th2 adecuada.

Interesantemente a pesar de no haber diferencias significativas en la producción de IL-13 en los pacientes con IDCV respecto a los controles, se observa que en presencia de la co-estimulación con anti CD-28 se producen cantidades significativamente mayores de ésta citocina respecto a sí mismos sin estimular, por lo que la co-estimulación favorece una mejor síntesis de IL-13.

▲ Pacientes con autoinmunidad
● Pacientes sin autoinmunidad



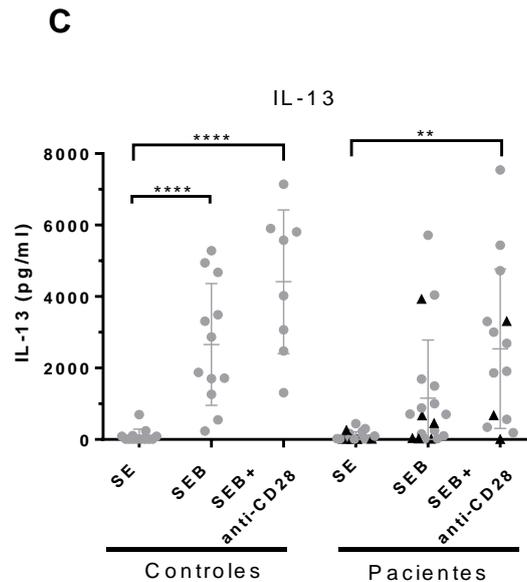


Figura 12. Diferenciación hacia Th2 en pacientes con IDCV. A) Producción de IL-4, B) Producción de IL-5, C) Producción de IL-13. * = $P < 0.05$

7.11 Capacidad de diferenciación hacia el perfil Th17 en pacientes con IDCV.

Las células T denominadas Th17, son el tercer tipo de células colaboradoras y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos.⁵⁷ Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite funcionar como puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Las células Th17 producen IL-17, la cual actúa sobre un amplio panel de células, y las estimula a secretar potentes mediadores de la inflamación como IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, prostaglandina E2, quimiocinas y metaloproteasas. Además de actuar sobre las células del tejido, la IL-17 es esencial en el reclutamiento, activación y migración de otras células del sistema inmune.⁵¹

Una de las principales manifestaciones clínicas de los pacientes con IDCV son las infecciones recurrentes a causa de bacterias extracelulares^{9, 10}. Por lo tanto



la polarización hacia Th17 resulta sumamente importante en estos pacientes para poder combatir estas infecciones de manera eficaz.

Dada la importancia de la diferenciación hacia Th17, en el presente estudio se evaluó la producción de IL-17 tras la estimulación por 6 días con SEB y SEB más anti CD-28 en los pacientes con IDCV y su comportamiento respecto a los controles.

En la **Figura 13** se muestran los resultados obtenidos, en donde claramente se observa una disminución significativa en la producción de IL-17 en los linfocitos T de los pacientes con IDCV respecto a los controles. Dicha disminución es más drástica cuando solo se estimula con SEB y tras la co-estimulación con anti-CD28 se logra incrementar ligeramente la producción de IL-17, sin embargo; no logra equiparar los niveles alcanzados por los controles y continúa siendo estadísticamente menor.

De acuerdo al parámetro de presencia o ausencia de autoinmunidad, la producción de IL-17 resulta independiente de la presencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes con IDCV tras la estimulación en ambas condiciones.

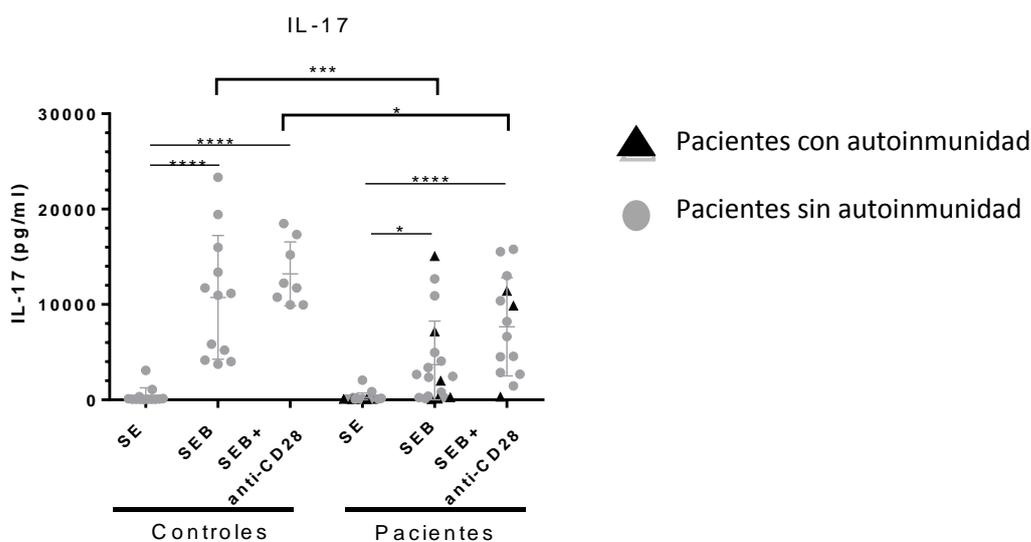


Figura 13. Diferenciación hacia Th17 en pacientes con IDCV. * =P< 0.05



8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Desde que la IDCV fue identificada por primera vez en 1953, ha sido objeto de diversos estudios que han tratado de entender esta enfermedad para poder proporcionar a los pacientes un tratamiento adecuado. Sin embargo, a pesar de las investigaciones realizadas, la etiología de esta enfermedad sigue sin ser bien comprendida. Uno de los mayores obstáculos para el estudio de la IDCV es la gran heterogeneidad de los pacientes, debido a que los defectos inmunológicos y las manifestaciones clínicas son muy diversos.

La IDCV es una inmunodeficiencia humoral en la que las distintas clases de Igs están severamente disminuidas. Sin embargo, existen distintos reportes en donde la inmunidad celular parece estar afectada también. A la fecha no existe un consenso de la frecuencia y función de los linfocitos T en esta enfermedad, debido a que los datos hallados en varios estudios son contradictorios entre sí.³⁶⁻⁴⁰ Aunado a esto, no se ha estudiado a detalle la causa de la presencia de enfermedades autoinmunes las cuales se presentan en aproximadamente el 20% de los pacientes con IDCV ni se han evaluado la participación de moléculas que podrían estar involucradas en la falla de la regulación de la respuesta inmune celular lo que podría resultar en autoinmunidad.

De esta manera en este trabajo se evaluó la inmunidad celular en un grupo de pacientes con diagnóstico de IDCV que presentaran o no manifestaciones de autoinmunidad. Inicialmente se determinó la frecuencia de linfocitos B la cuál se encontró disminuida en los pacientes con IDCV respecto a los controles. Se sabe que la frecuencia de linfocitos B es uno de los criterios del diagnóstico de IDCV en el cual suele estar en niveles normales o disminuidos pero sin llegar a tener total ausencia de linfocitos B; de ser así la patología hallada no correspondería a la IDCV sino a otro tipo de inmunodeficiencia primaria como por ejemplo la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. Con esta determinación se comprobó que en efecto los 19 pacientes fueron



diagnosticados de manera correcta y podían incluirse en los estudios posteriores.

A continuación se determinó la frecuencia de los linfocitos T, hallándose una disminución significativa de los mismos en comparación con los controles. Dicha disminución recae específicamente en los linfocitos T CD4, ya que los T CD8 se encontraron en proporciones normales. Este resultado concuerda con la linfopenia de T CD4 observada en algunos estudios como el de Giovannetti A. y colaboradores; sin embargo, los linfocitos T CD8 no se encontraron aumentados como se reporta en otros trabajos. Es posible que el incremento en la frecuencia de linfocitos T CD8 observado en otros estudios solo sea perceptible al incrementar el número de pacientes analizados, ya que en el caso de Giovannetti A. y colaboradores³⁹ se analizaron 60 pacientes con IDCV o en el caso del estudio de Anthony David B Webster donde de igual forma se reporta un incremento de linfocitos T CD8 se analizaron 150 pacientes con IDCV.³⁸ Es importante señalar que es posible también que la cohorte de pacientes con los que se está trabajando en este estudio no arroje exactamente los mismo resultados observados en otros trabajos debido a la gran heterogeneidad de los defectos inmunológicos que pueden ser la causa de esta patología. Por otra parte la mayoría de los estudios en esta patología han sido con pacientes de origen caucásico, por lo que genéticamente existe una gran diferencia respecto a los 19 pacientes de origen mexicano de este estudio.

En cuanto a la capacidad de proliferación de los linfocitos T nuestros resultados mostraron que los linfocitos T de los pacientes con IDCV tienen una gran capacidad de división celular aun cuando las frecuencias iniciales de T CD4 son menores en los pacientes su capacidad de proliferación alcanza y supera los niveles observados en los controles, por lo tanto los pacientes con IDCV parecen tener una mayor activación y por ende mayor proliferación que los individuos sanos. Este dato concuerda con aquellos estudios como el de Eli M. Eisenstein y colaboradores³⁷, en donde de igual manera se observan



proliferaciones en niveles normales o aumentados respecto a los controles, sumándose cada vez más evidencia de que la capacidad de proliferación de los linfocitos T en los pacientes con IDCV no se encuentra afectada. Es importante destacar que los pacientes que presentan autoinmunidad mostraron una mayor capacidad de proliferación en sus linfocitos T CD4 en presencia de la co-estimulación. Este resultado sugiere que los linfocitos T de éstos pacientes posiblemente se encuentren en un estado de sobreactivación probablemente debido a la falta de regulación en los mecanismos de freno.

Debido a que los linfocitos T de los pacientes con IDCV y autoinmunidad parecieran tener una mayor activación, es importante hacer énfasis en que para la inducción de una respuesta autoinmune se requiere de la proliferación de alguna clona autoreactiva que haya escapado a los procesos de tolerancia, por lo tanto la proliferación excesiva en éstos pacientes resulta interesante dado que podría estarlos predisponiendo a la autoinmunidad.

Para evaluar más a fondo los mecanismos que pudieran estar participando en el control de la proliferación en los pacientes con IDCV, se evaluaron tres moléculas de co-inhibición nunca antes estudiadas en la IDCV y que han sido relacionadas con la presencia de enfermedades autoinmunes; estas fueron PD-1, PD-L1 y CTLA-4^{17-21,23}. De acuerdo con lo que se ha observado en otros estudios en relación a éstas moléculas y la presencia de enfermedades autoinmunes, era probable que en aquellos pacientes con IDCV y autoinmunidad se observara una disminución en la expresión de PD-1, PD-L1 o CTLA-4 tras la estimulación con SEB. Sin embargo, cuando se midió la expresión de PD-L1 y CTLA-4 en los linfocitos T de los pacientes con IDCV, ambas moléculas se expresaron en niveles similares a los controles, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas, e independientemente de la presencia o ausencia de autoinmunidad. Lo cual, hasta éste punto sugiere que los mecanismos de regulación que involucran estas moléculas parecieran no estar alterados.



En el caso de PD-1, contrario a lo que se mencionó para las otras dos moléculas de co-inhibición, se encontró un incremento significativo en la expresión de esta molécula en los linfocitos T CD4 de los pacientes con IDCV y autoinmunidad. Este incremento no concuerda con lo que se ha reportado en relación a PD-1 y autoinmunidad, los cuales indican que una baja expresión de PD-1 da lugar a la proliferación de clonas autoreactivas desencadenando enfermedades autoinmunes. El resultado del presente trabajo es un hallazgo nunca antes observado en pacientes con IDCV y autoinmunidad.

Reuniendo los datos discutidos hasta el momento pareciera que la posible sobreactivación de los linfocitos T no es consecuencia en la expresión alterada de PDL-1 y CTLA-4; sin embargo, es probable que a pesar de estar siendo expresadas estas moléculas de forma normal e incluso superior respecto a los controles, no tengan una correcta funcionalidad lo cual no fue evaluado en este trabajo. Por otra parte es posible que en los pacientes con IDCV la defosforilación de PIK3 no se este llevando a cabo y por lo tanto la translocación al núcleo de los factores de transcripción como NF-KB continúe favoreciendo una proliferación excesiva.¹⁷ Esta interpretación es consistente con el incremento en la expresión de PD-1 evaluado en este trabajo en los pacientes con IDCV ya que la expresión de PD-1 ha sido relacionada con un fenotipo exhausto por exceso de proliferación.⁵⁴ Lo anterior podría tener como consecuencia la linfopenia observada en la sangre periférica de los pacientes con IDCV. Sin embargo, los resultados muestran que la linfopenia es independiente de la presencia o ausencia de autoinmunidad, por lo que no es posible asegurar que sea producto del incremento de PD-1, dado que el aumento en la expresión de esta molécula solo se observó en los pacientes con autoinmunidad.

Cabe señalar que en aquellos estudios donde se ha determinado el incremento de la apoptosis en los linfocitos T de los pacientes con IDCV, solo se ha evaluado el incremento de anexina V al término de la activación, por lo que aún quedan otras posibilidades como el hecho de que los linfocitos tengan altos



niveles de apoptosis desde el inicio, reflejados en la linfopenia observada en sangre periférica, y que debido a esto el sistema trate de recuperar los niveles celulares normales incrementando los ciclos de proliferación, culminando con una mayor expresión de PD-1 como mecanismo de freno. Para evaluar esta posibilidad a fondo, es necesario realizar estudios de apoptosis antes de la activación y después de la misma para determinar cómo se encuentra a diversos tiempos.

Posteriormente se evaluó la capacidad de diferenciación de los linfocitos T CD4 de acuerdo a la producción de citocinas. Las primeras citocinas mostradas son la IL-1 β e IL-6 ambas de tipo proinflamatorio. Los resultados muestran que ambas citocinas son producidas en cantidades normales respecto a los controles tras la estimulación con SEB, por lo que la transducción de señales vía TCR funciona de manera correcta para la síntesis de estas citocinas.

La siguiente citocina evaluada fue la IL-10 la cual es de tipo anti-inflamatorio. El resultado indica que los pacientes con IDCV tienen una producción disminuida de IL-10 aun con la co-estimulación del anti CD28 y es independiente de la presencia o ausencia de autoinmunidad. Cabe señalar que la producción de IL-10 está relacionada con el cambio de isotipo hacia IgG4⁵⁵, lo cual concuerda con la hipoglobulinemia de IgG característica en los pacientes con IDCV.

Nuestros resultados que indican una menor expresión de IL-10 en los pacientes con IDCV concuerdan con estudios previos realizados por el grupo de Giovannetti A. y colaboradores³⁹, pero se contraponen a resultados como el de Razaeei N. y colaboradores⁴⁰ en el que se reportan niveles de producción de IL-10 normales respecto a los controles. Las diferencias en cuanto a la expresión de esta citocinas en los distintos estudios pueden ser explicadas por los distintos estímulos utilizados para la activación de los linfocitos ya que en el estudio de Giovannetti la activación se realizó con iomicina y PMA que funciona como un ionóforo incrementando los niveles de calcio del linfocito T y favoreciendo la translocación al núcleo de NFAT y la producción de diversas interleucinas.⁵² Por otro lado en el caso de Razaeei se realizó con PHA, la cual



se trata de una lectina y es un mitógeno de célula. Tanto la PHA como SEB actúan señalizando a través del TCR; en cambio, la activación con iomicina y PMA no requiere de los primeros pasos de fosforilación de la vía de activación. El trabajo de Giovannetti A. y colaboradores muestra que el decremento en la producción de IL-10 es un defecto a nivel de transcripción de genes y los resultados del presente estudio reafirman ese dato ya que incluso con la co-estimulación brindada por el anti-CD28 no se logra incrementar la cantidad de IL-10 descartando así que sea un problema de señalización inicial.

La menor expresión de IL-10 en los pacientes con IDCV podría ser consecuencia de la exposición continua a bacterias lo cuál podría favorecer la expresión de citocinas pro-inflamatorias lo que podría repercutir en una menor expresión de IL-10. La menor expresión de IL-10 podría tener además repercusiones importantes en la falta de regulación de la respuesta inmune celular.⁵³

Una de las citocinas más estudiadas e incluida en casi todos los estudios de la inmunidad celular de pacientes con IDCV es la IL-2. A pesar de las diversas investigaciones que se han realizado al respecto, a la fecha no existe un consenso de como se encuentran los niveles de esta citocina en los pacientes con IDCV. La IL-2 es el principal inductor de la proliferación en los linfocitos T.⁵³ Es por ello que al observar los niveles de proliferación tan altos alcanzados por los pacientes tras la estimulación con SEB y SEB más anti CD-28, se esperaba una gran producción de IL-2. Sorprendentemente al determinar la producción de ésta citocina se hallaron cantidades muy bajas en la mayoría de los controles y en todos los pacientes con IDCV tras la activación con SEB. Una posible explicación podría ser un rápido consumo de esta citocina por su receptor y por ende la baja detección de la misma. Por otro lado efectivamente es posible que no haya producción de IL-2 debido a que con la estimulación con SEB no exista la correcta co-estimulación necesaria para su síntesis y en este caso podría estar interviniendo otra citocina que favorezca la proliferación



como es el caso de la IL-15 la cual se sabe tiene una actividad muy similar a la IL-2.⁵³

Interesantemente cuando se adicionó anti-CD28, se incrementó drásticamente la producción de IL-2 en los controles sugiriendo así que era necesaria la coestimulación para la inducción de ésta citocina en un grupo de pacientes con IDCV. Este resultado apoya los datos encontrados por Eli M. Eisentein y colaboradores³⁷ en el cual se observa una disminución en la producción de IL-2 en los linfocitos T de pacientes con IDCV cuando fueron estimulados con SEB o PHA, pero al utilizar iomicina + PMA o en combinación anti CD3+anti CD28 la producción de IL-2 se eleva y alcanza los niveles normales respecto a los controles, debido a que aparentemente el problema de la baja producción de IL-2 es por falta de co-estimulación y defectos de señalización. Visto desde esta perspectiva el trabajo de Giovannetti A. y colaboradores, en donde reportan niveles normales de IL-2 respecto a los controles, se suma a los resultados que sugieren que estamos en presencia de un problema de señalización ya que en este caso la estimulación fue con iomicina y PMA, lo que demuestra que a nivel de transcripción de genes no hay problema.

Sin embargo, en este estudio se observó claramente que la mitad del grupo estudiado logró una recuperación en la producción de IL-2 tras la co-estimulación y la mitad restante no, pero aun en los pacientes que no lograron producir grandes cantidades de IL-2, la proliferación es muy alta, haciendo una vez más factible la probabilidad de un rápido consumo de IL-2 o la intervención de otra citocina con funciones similares a la IL-2. Para tener más información acerca de la producción de IL-2 deben realizarse experimentos adicionales como el bloqueo del receptor de IL-2 para evitar su consumo y poder medir los niveles reales de producción de esta citocina y la medición de la producción de IL-15.

Posteriormente, se evaluó la diferenciación hacia los diferentes tipos de células T efectoras comenzando por las Th1 CD4 a través de las citocinas características producidas, el IFN γ y TNF α . Diversos estudios han evaluado la



producción de IFN γ encontrándose datos contradictorios entre sí.^{36,39} De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto la producción de IFN γ como la de TNF α se encuentran en niveles muy similares a los controles y es independiente a la presencia o ausencia de autoinmunidad, por lo que la capacidad de diferenciación hacia Th1 en los pacientes con IDCV no se encuentra afectada. Es importante mencionar que a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de estudio y los controles, existe una clara tendencia de un incremento en la producción de IFN γ en los linfocitos T de los pacientes con IDCV tanto con SEB como con SEB mas antiCD28 y probablemente aumentando el número de pacientes llegue a ser un incremento estadísticamente significativo, sumándose así a lo reportado por Giovannetti A. y Razaei N.

Para analizar la diferenciación hacia Th2 CD4, se evaluaron las principales citocinas producidas, las cuales son IL-4, IL-5 e IL-13. La mayoría de los estudios concuerda en que la producción de IL-4 e IL-5 no se encuentran afectadas tras la estimulación con iomicina y PMA³⁹ o con PHA⁴⁰, en este trabajo tras la estimulación con SEB tampoco se observaron alteraciones, lo que indica que la vía de señalización a través del TCR funciona de manera adecuada y de igual forma la expresión génica es correcta para estas citocinas. Todos estos datos, incluidos los del presente trabajo indican que existe una correcta capacidad de diferenciación hacia el perfil Th2. Es importante resaltar que el perfil Th2 está involucrado en la producción de IgE, por lo que el hecho de que la diferenciación Th2 no esté afectada en los pacientes con IDCV concuerda perfectamente con que los pacientes tengan niveles de IgE dentro del intervalo normal y no estén dentro de las manifestaciones clínicas las infecciones parasitarias.^{9,10}

Por último se evaluó la diferenciación hacia el perfil Th17 a través de la producción de IL-17. En los diversos estudios realizados sobre la inmunidad celular en grupos de pacientes con IDCV, no existe alguno donde se reporte cómo se encuentra el perfil Th17. Cabe señalar que los estudios que podrían



incluir a esta citocina son aquellos posteriores al descubrimiento de las Th17 (2007); sin embargo, no hay reportes donde haya sido analizada, por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo son un aporte novedoso a la serie de datos con los que se cuenta en la actualidad acerca de la inmunidad celular en la IDCV.

Los resultados muestran que existe una disminución significativa en la producción de IL-17 en los pacientes con IDCV tras la estimulación con SEB, e incluso varios pacientes no logran producir IL-17 en absoluto. También se observa que tras la co-estimulación con anti CD-28 los linfocitos T de los pacientes con IDCV logran incrementar ligeramente las cantidades de IL-17; sin embargo, continúan produciendo cantidades estadísticamente inferiores a los controles. Esta disminución en la producción de IL-17 es independiente de presencia o ausencia de autoinmunidad. De acuerdo a este resultado los pacientes con IDCV tienen alteraciones en la diferenciación hacia el perfil Th17.

Es importante mencionar que el receptor para la IL-17 está presente en una amplia variedad de células y tejidos, tanto del sistema inmune (linfocitos B y T, monocitos, etc.) como extrínsecos (epiteliales, fibroblastos, endotelio, etc.) y se ha observado que la deficiencia congénita del receptor de IL-17 en ratones conlleva a que estos animales presenten una extrema sensibilidad a infecciones por gramnegativos y hongos,⁵⁸ por lo que bajo el mismo principio de no recibir cantidades suficientes de IL-17, la baja producción de ésta citocina podría estar contribuyendo a la poca eficiencia ante el combate contra las recurrentes infecciones bacterianas en los pacientes con IDCV.

Debido a que se han asociado a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes una elevada producción de IL-17, era probable que en el presente estudio se hallara que en los pacientes con IDCV y autoinmunidad la producción de IL-17 fuera muy alta; no obstante, el resultado obtenido es completamente opuesto, descartando que las Th17 estén contribuyendo al desarrollo de las enfermedades autoinmunes en éstos pacientes.



La deficiencia en la producción de IL-17 puede ser explicada a través del co-estimulador inducible ICOS, que hasta ahora solo ha sido relacionado en la IDCV debido a que mutaciones en ICOS han sido señaladas como las causantes de una ineficaz diferenciación hacia células plasmáticas. No obstante en el trabajo realizado por Chrystal M. Paulos y colaboradores⁵⁹ se encontró que el co-estimulador inducible ICOS es esencial para la diferenciación y expansión de las células Th17 en humanos. En este estudio diversos experimentos demuestran que sólo la co-estimulación con ICOS incrementa drásticamente la producción de IL-17 y la mantiene a través del tiempo. Por el contrario ninguna otra co-estimulación logra esto y en el caso específico de CD28 solo se logra un ligero incremento en la producción de IL-17 con un pico máximo entre los días 5-7 y posteriormente recae a niveles basales. Esto quiere decir en los linfocitos T de los pacientes con IDCV se observó la máxima cantidad de IL-17 producida ya que la determinación se realizó en los sobrenadantes del día 6 posterior a la estimulación con SEB y SEB más anti-CD28. Como se muestra en los resultados incluso con la co-estimulación de anti-CD28 no se incrementaron los niveles de IL-17, por lo que ligando estos datos, es muy probable que la deficiencia en la producción de IL-17 sea consecuencia de las mutaciones en ICOS ya identificadas en pacientes con IDCV, las cuales además de intervenir en la diferenciación hacia células plasmáticas también están impidiendo una correcta señalización y activación del factor transcripcional ROR γ t esencial para la diferenciación hacia las células efectoras Th17⁶⁰.

Para analizar a fondo la intervención de ICOS en la diferenciación Th17 es necesario realizar experimentos adicionales en donde se co-estimule con ICOS y se comparen los niveles de producción de IL-17 con los obtenidos con la co-estimulación con CD28.

Los resultados presentados en este estudio indican que aunque en términos generales la inmunidad celular parece ser adecuada se observaron diversas alteraciones tanto en la frecuencia como en la función de los linfocitos T de los



pacientes con IDCV con respecto a los individuos control, las cuales podrían ser importantes en la patogénesis de esta enfermedad. Los datos generados proporcionan mayor información acerca de la inmunidad celular en estos pacientes y representa el primer estudio de esta índole en un grupo de pacientes con IDCV del CMN Siglo XXI, donde además se evaluó el comportamiento de aquellos pacientes que presentan autoinmunidad.



9. CONCLUSIONES.

- Existe una disminución en la frecuencia de los linfocitos T CD3+/CD4+ en los pacientes con IDCV independiente de la presencia o ausencia de autoinmunidad.
- La proliferación de los linfocitos T CD3+ y T CD4+ en los pacientes con IDCV se encuentra incrementada, y los pacientes con autoinmunidad son los que muestran una mayor capacidad de proliferación.
- Los linfocitos T de los pacientes con IDCV, después de ser activados muestran una expresión de las moléculas PDL-1 y CTLA-4 en niveles similares a los expresados en los controles.
- Los pacientes con IDCV que presentan autoinmunidad tienen una mayor expresión de PD1 en sus linfocitos T CD4.
- Existe una disminución significativa de IL-2, IL-10 e IL-17 en los pacientes con IDCV independientemente de la presencia o ausencia de autoinmunidad.
- La evaluación celular de los pacientes con IDCV muestra alteraciones específicas en la frecuencia de linfocitos T CD4+, producción de IL-2, IL-10 y la diferenciación hacia el perfil Th17, aportando nuevos datos acerca de la inmunidad celular en esta patología.



10. REFERENCIAS.

1. Fred S. Rosen, M.D., Max D. Cooper, M.D., and Ralph J.P. Wedgwood, M.D. *The Primary Immunodeficiencies*. The new England Journal of Medicine; 1995; 333:431-440.
2. Paolo Ruggero Errante, Jos´e Luis Franco, Francisco Javier Espinosa-Rosales, et al. *Advances in primary immunodeficiency diseases in Latin America: epidemiology, research, and perspectives*. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 2012; 1250: 62–72.
3. A. Condino-Neto, J.L. Franco, C. Trujillo-Vargas, et al. *Critical issues and needs in management of primary immunodeficiency diseases in Latin America*. Allergol Immunopathol . 2011;39(1):45—51
4. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, et al. *Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency*. Ann Allergy Asthma Immunol. 2005; 94:S1—63.
5. Boyle JM, Buckley RH. *Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States*. J Clin Immunol. 2007;27:497—502.
6. Geha, R.S., L.D. Notarangelo, J.-L. Casanova, et al. *Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee*. J. Allergy. Clin. Immunol. 2007; 120: 776–794.
7. Leiva, L.E., L. Bezrodnik, M. Oleastro, et al. 2011. *Primary immunodeficiency diseases in LatinAmerica: proceedings of the second Latin America Society for Immunodeficiencies (LASID) Advisory Board*. Allergol. Immunopathol. 2011; 39: 106–110.
8. Bayry J, Hermine O, Webster DA, et al. *Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos*. TRENDS Mol. Med. 2005; 11(8):370-6.
9. Serra Horacio Marcelo, Barcelona Pablo, Collino César Juan Gerardo, Vettorazzi. *Inmunodeficiencia común variable: hallazgos recientes sobre anormalidades celulares*. Acta Bioquím Clín Latinoam 2004; 38 (4): 489-94.
10. Iglesias Alzueta, J; Matamoros Florí, N. *Inmunodeficiencia variable común*. Allergol Immunopathol. 2001; 29:113-5.



11. Cunningham-Rundles Ch, Bodian C. *Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients*. J Clin Immunol 1999; 92: 34-48.
12. H Abolhassani, A Aghamohammadi, A Imanzadeh, P Mohammadinejad, et al. *Malignancy Phenotype in Common Variable Immunodeficiency*. J Investig Allergol Clin Immunol 2012; 22(2): 133-153
13. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, et al. *Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency*. J Clin Immunol 2007;27:308–316
14. Chapel H, Lucas M, Lee M, et al. *Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes*. Blood 2008;112:277–286
15. Shradha Agarwal, and Charlotte Cunningham-Rundles. *Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency*. Curr Allergy Asthma Rep. 2009 September; 9(5): 347–352.
16. E Keir Mary, M Francisco Loise and H Sharpe Arlene. *PD-1 and its ligands in T-cell immunity*. Current Opinion in Immunology 2007, 19:309–314
17. Folkl A., Bienzle D. *Structure and function of programmed death (PD) molecules*. Veterinary Immunology and Immunopathology 2010; 134: 33–38
18. Nishimura, Nos, Hia, et al. *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity 1999 11,141–151.
19. Nishimura, Okazaki, Tanaka, et al. *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science 2001; 291, 319–322.
20. Reynoso, Elpek, Francisco L, et al. *Intestinal tolerance is converted to autoimmune enteritis upon PD-1 ligand blockade*. J. Immunol. 2009; 182, 2102–2112.
21. OP Kristiansen, ZM Larsen and F Pociot. *CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity?*. Genes and Immunity.2000; 1, 170–184
22. Krummel MF, Allison JP. *CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells*. J Exp Med 1996;183:2533-2540.



23. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN et al. *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.* Immunity 1995; 3: 541–547.
24. S. Jaffe Jonathan; and Cunningham-Rundles Charlotte. *New Insights into Common Variable Immunodeficiency.* Annals of Internal Medicine. 1993; 118 (9):720-730.
25. Grupo de Trabajo de Inmunología Pediátrica, Comité Nacional de Infectología y Subcomisión de Epidemiología. *Vaccines in primary immunodeficiencies patients.* Arch Argent Pediatr 2010;108(5):454-464
26. Al-Herz W, McGeady SJ. *Antibody response in common variable immunodeficiency.* Ann Allergy Asthma Immunol.2003;90:244–7
27. Romer JJ. *Characterization of various immunoglobulin preparations for intravenous application.* Vox Sang. 1981;42:62-9.
28. Bussel JB, Inman RD. *Use of intravenous gammaglobulin in patients with chronic ITP.* Blood 1983;62:480-86.
29. Kimberly RP, Salmon J E. *Modulation of mononuclear phagocyte function by intravenous gammaglobulin.* J Immunol 1984;132:745-50.
30. Salzer Ulrich, Unger Susanne, and Warnatz Klaus. *Common variable immunodeficiency (CVID): exploring the multiple dimensions of a heterogeneous disease.* Ann. N.Y. Acad. Sci.2012; 1250:41-9
31. Castigli Emanuela, A Wilson Stephen, Lilit Garibyan, et al. *TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency.* Nature Genetics. 2005; 37: 829 – 834
32. Salzer Ulrich, Maul-Pavicic Andrea , Cunningham-Rundles Charlotte, et al. *ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency.* Clinical Immunology. 2004; 113 : 234–240
33. C. van Zelm Menno, Reisli Ismail, van der Burg Mirjam. *An Antibody-Deficiency Syndrome Due to Mutations in the CD19 Gene.* N. Engl. J Med. 2004; 354(18):1901-1912
34. Warnatz Klaus, Salzer Ulrich, Rizzi Marta, et al. *B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans.* PNAS. 2009; 106(33): 13945–13950
35. RA Pagon, TD Bird, CR Dolan, et al. *Common Variable Immune Deficiency Overview.* GeneReviews, NCBI Bookshelf;2006.



36. Grabstein KS, Dower S, Gillis S, Urdal D, Larsen A. *Expression of interleukin 2 interferon-gamma and IL 2 receptor by human peripheral blood lymphocytes.* J Immunol. 1986;136:4503-8.
37. Eisenstein Eli M., S. Jaffe Jonathan y Strober Warren. *Reduced Interleukin-2 (IL-2) Production in Common Variable Immunodeficiency Is Due to a Primary Abnormality of CD4+ T Cell Differentiation.* Journal of Clinical Immunology, 1993; 13(4): 247-258
38. Webster ADB. *Clinical and immunological spectrum of common variable immunodeficiency (CVID).* Iran J Allergy Asthma Immunol. 2004;3:103-13.
39. Giovannetti Antonello, Pierdominici Marina, Mazzetta Francesca, et al. *Unravelling the Complexity of T Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency.* The Journal of Immunology, 2007, 178: 3932–3943
40. Rezaei N, Aghamohammadi A, et al. *Cytokine Production by Activated T Cells in Common Variable Immunodeficiency.* J Investig Allergol Clin Immunol 2010; Vol. 20(3): 244-251
41. Garvie J. M., Kendall A. C.. *Congenital agammaglobulinaemia.* British Medical Journal, 1961; 548-550.
42. G. Tangye Stuart, K. Deenick Elissa, Palendira Umaimainthan, et al. *T cell–B cell interactions in primary immunodeficiencies.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 2012; 1250: 1–13
43. Jacquot, S. et al. *B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients.* Int. Immunol. 2001; 13: 871–876
44. Denz, A. et al. *Impaired up-regulation of CD86 in B cells of 'type A' common variable immunodeficiency patients.* Eur. J. Immunol. 2000; 30: 1069–1077
45. Groth, C. et al. *Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27K) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID).* Clin. Exp. Immunol. 2002; 129, 133–139
46. Agematsu, K. et al. *Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency.* Clin. Immunol. 2002; 103: 34–42



47. Piqueras, B. et al. *Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects*. J. Clin. Immunol. 2003; 23: 385–400
48. Levy, Y. et al. *Defect in IgV gene somatic hypermutation in common variable immuno-deficiency syndrome*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998; 95, 13135–13140
49. Bonhomme, D. et al. *Impaired antibody affinity maturation process characterizes a subset of patients with common variable immunodeficiency*. J. Immunol. 2000; 165, 4725–4730
50. Mullighan, C.G. et al. *Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency*. Genes Immun. 1999; 1: 137–148
51. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf> consultado por última vez el 3 de enero 2013.
52. Montalvo Mimbbrero Gema Beatriz. (2009). *Regulación Mitocondrial De Los Canales Ca²⁺ Crac En Linfocitos T*. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense De Madrid
53. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. *Th17: The third member of the effector T cell trilogy*. Curr Opin Immunol. 2007;19:652–7
54. Haymake Carar, Wu Richard Wu, et al. *PD-1 and BTLA and CD8⁺ T-cell “exhaustion” in cáncer*. Oncoimmunology. 2012 August 1; 1(5): 735–738.
55. Borish Larry C and Steinke John. *Cytokines and chemokines*. J Allergy Clin Immunol. 2003; 11(2): 460-473
56. Korn T, Oukka M, et al. *Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties*. Semin Immunol. 2007;19:362-71
57. Shigeo Koyasu and Kazuyo Mor. *Role of innate lymphocytes in infection and inflammation*. Frontiers in immunology. 2012 : (3)101
58. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis. 2004;190:624–31.
59. Chrystal M. Paulos, et al. *The Inducible Costimulator (ICOS) Is Critical for the Development of Human Th17 cells*. Sci Transl Med. 2010: (2)55



60. Ivaylo I. Ivanov, et al. *The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells.* *Cell.* 2006; 126: 1121–1133.