



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B EN PACIENTES
CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (CVID), PARA UNA
CLASIFICACIÓN FENOTÍPICA Y CLÍNICA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA**

PRESENTA:

NIDIA CAROLINA MORENO CORONA

ASESORES

DRA. LAURA BERRON RUIZ

DR. SALVADOR FONSECA CORONADO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 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.

DEDICATORIA

A mi Madre...

Por ser mi motivación, mi fuente de inspiración en todo momento, mi ejemplo a seguir, por ser esa voz en mi interior que me alentó a seguir adelante.

Porque a pesar de que hoy no estas conmigo tus enseñanzas, valores y principios me han acompañado a lo largo del camino y hoy son el motivo de estar aquí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi **Padre Eduardo Moreno Peñaloza** por su guía, su apoyo incondicional, por su ejemplo de perseverancia, principalmente por no dejarme caer en el camino.

A mi **hermana Magali Moreno Corona** por ser mi cómplice, mi esperanza, por su ayuda incondicional y sobre todo por soportarme en los momentos en que nadie más lo hacía.

A mis hermanos, tíos, primos, abuelos y amigos por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A la **Dra. Laura Berrón Ruíz** por sus enseñanzas, consejos y por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al **Dr. Salvador Fonseca Coronado** por sus enseñanzas, consejos principalmente su apoyo, motivación y paciencia.

A mis compañeros y amigos por su apoyo, amistad y ánimo a lo largo del camino.

Índice

Índice de tablas	ii
Índice de figuras	iii
Lista de abreviaturas	iv
Resumen	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1	Immunodeficiencias primarias. 1
1.2 Inmunodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos ...	4
1.3 Desarrollo de las células B:.....	6
1.4 Inmunodeficiencia Común Variable (CVID).....	9
1.4.1 Manifestaciones clínicas	9
1.4.2 Diagnóstico	11
1.4.3 Etiología.....	12
1.5 Clasificación de CVID	13
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVO GENERAL.....	20
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	20
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
5.1 Población de estudio	21
5.2 Criterios de inclusión	21
5.3 Criterios de exclusión.....	21
5.4 REACTIVOS	21
5.5 Equipo	22
5.6 Plan general de trabajo	23
5.7 Obtención de muestras	23
5.8 Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica:	24
5.9 Análisis de la expresión de subpoblaciones de células B en PBMC's:.....	25
5.10 Adquisición y análisis	26
5.11 Análisis estadístico e interpretación de los datos	26
VI. Resultados	26
6.1 Características clínicas de los pacientes.....	27
6.2 Análisis de poblaciones de leucocitos	31
6.3 Análisis de subpoblaciones de linfocitos.....	31
6.5 Análisis de las subpoblaciones de células B	47
VII. Análisis y discusión de resultados	68
VIII. Conclusiones.....	75

X. Anexo 1	76
Anexo 2	78
X. Referencias	79

Índice de tablas

Tabla 1. Las ocho categorías de Inmunodeficiencias primarias según IUIIS (International Union of Immunological Societies).....	2
Tabla 2. Clasificación de las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos	5
Tabla 3 Combinaciones de anticuerpos empleadas para el análisis de poblaciones leucocitarias.	24
Tabla 4 Combinaciones de anticuerpos empleadas para el análisis de subpoblaciones de células B.....	25
Tabla 5 Lista de pacientes, edades y género.	27
Tabla 6 Historia clínica de los pacientes estudiados.	28
Tabla 7 Relación de enfermedades presentadas por los diferentes grupos de pacientes.....	28
Tabla 8 Concentración de Inmunoglobulinas en niños y jóvenes	30
Tabla 9 Concentración de Inmunoglobulinas en adultos	30
Tabla 10 Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias en pacientes niños y jóvenes.....	35
Tabla 11 Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias en testigos niños y jóvenes.....	36
Tabla 12 Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias en pacientes adultos..	37
Tabla 13 Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias en testigos adultos....	38
Tabla 14 Valores absolutos de linfocitos en pacientes niños y jóvenes.....	41
Tabla 15 Valores absolutos de linfocitos en testigos.....	42
Tabla 16 Valores absolutos de linfocitos en pacientes adultos.....	43
Tabla 17 Valores absolutos de linfocitos en testigos adultos.....	44
Tabla 18 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en pacientes niños y jóvenes.	50
Tabla 19 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en pacientes adultos..	51
Tabla 20 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en pacientes adultos..	52
Tabla 21 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en testigos adultos.....	53
Tabla 22 Valores absolutos y relativos de células B CD21 ^{low} en pacientes niños y jóvenes.....	60
Tabla 23 Valores absolutos y relativos de células B CD21 ^{low} en testigos niños y jóvenes.....	60
Tabla 24 Valores absolutos y relativos de células B CD21 ^{low} en pacientes adultos..	61
Tabla 25 Valores absolutos y relativos de células B CD21 ^{low} en testigos adultos....	61
Tabla 26 Clasificación de Warnatz de los pacientes estudiados.	63

Índice de figuras

Figura 1 Distribución de Inmunodeficiencias primarias en Europa de acuerdo al registro de pacientes 2010 de la ESID (European Society for Immunodeficiencies), imagen modificada de Vries, 2011	3
Figura 2 Grafica de poblaciones leucocitarias.	31
Figura 3 Grafica de linfocitos NK.....	32
Figura 4 Análisis de Linfocitos T y B.	33
Figura 5 Análisis de Linfocitos T cooperadores CD3 ⁺ CD4 ⁺ y los linfocitos T citotóxicos CD3 ⁺ CD8 ⁺	34
Figura 6 Gráficas de poblaciones leucocitarias en los dos grupos estudiados niños y jóvenes y adultos.....	40
Figura 7 Gráficas de poblaciones de linfocitos en los dos grupos estudiados niños y jóvenes y adultos.....	46
Figura 8 Subpoblaciones de células B.	48
Figura 9 Subpoblaciones de células B, células transicionales y plasmablastos.	49
Figura 10 Gráficas de células B naive CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺	54
Figura 11 Gráficas de células B memoria sin cambio de isotipo CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ e.	55
Figura 12 Gráficas de células B memoria con cambio de isotipo CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻	56
Figura 13 Gráficas de células B transicionales (CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺⁺)	57
Figura 14 Gráficas plasmablastos (CD19 ⁺ CD24 ⁻ CD38 ⁺⁺).....	58
Figura 15 Poblaciones de células B CD21 ^{low}	59
Figura 16 Gráficas de células B CD21 ^{low} CD19 ⁺ CD21 ^{LOW} CD38 ^{LOW}	62
Figura 17 Grafica de % de células B en los diferentes grupos de acuerdo a la clasificación de Warnatz.	64
Figura 18 Grafica de % de células B de memoria en los diferentes grupos de acuerdo a la clasificación de Warnatz.....	65
Figura 19 Grafica de % de células B CD21 ^{low} en los diferentes grupos de acuerdo a la clasificación de Warnatz.	65
Figura 20. Grafica de las características clínicas. De los grupos I y II de Warnatz acuerdo a la clasificación de Warnatz.	66
Figura 21 Clasificación clínica de acuerdo a la clasificación de Warnatz.....	67

Lista de abreviaturas

PID	Inmunodeficiencias primarias
ESID	Sociedad Europea de Inmunodeficiencias por sus siglas en inglés: European Society for immunodeficiencies
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa por sus siglas en inglés: Severe Combined Immunodeficiency
IUIIS	Unión internacional de Sociedades Inmunológicas por sus siglas en inglés: International union for immunological societies
CVID	Inmunodeficiencia común variable por sus siglas en inglés: Common Variable Immunodeficiency
GC	Centro germinal por sus siglas en inglés: Germinal Center
SHM	Hipermutación somática por sus siglas en inglés: Somatic hypermutation
PBMC's	Células mononucleares de sangre periférica por sus siglas en inglés: Peripheral blood mononuclear cells
Ig	Inmunoglobulinas
XL	Herencia ligada al X
BTK	Tirosina cinasa de Bruton por sus siglas en inglés: Bruton Tyrosine kinase
AR	Herencia autosómica recesiva
ICOS	Co-estimulador inducible de células T
TACI	Activador transmembranal y modulador de calcio por sus siglas en inglés: Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand activator.
Ag	Antígeno
MZ	Zona Marginal por sus siglas en inglés Marginal zone
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad por sus siglas en inglés: Major histocompatibility complex

LNH	Linfoma no Hodgkin
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
PAGID	Grupo Pan-americano de Inmunodeficiencias
Ab	Anticuerpo
HLA	Antígeno leucocitario humano por sus siglas en inglés: Human leucocitary antigen
SAC	Cowan <i>staphilococcus aureus</i>
PBL	Linfocitos de sangre periférica sus siglas en inglés: Peripheral Blood lymphocytes
TNFRSF	Receptor del factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés: Tumor necrosis factor receptor superfamily
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos por sus siglas en inglés: Phosphate buffer solution
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
PE	Ficoeritina
APC	Alofocianina
PerCp	Peridininchlorophyllprotein
GEPI	Gastroenteritis por infección
BAFF-R	Receptor del factor de activación de células B por sus siglas en inglés: B-cell activating factor receptor

Resumen

Las inmunodeficiencias primarias (IDP's) son un grupo heterogéneo de desordenes que afectan distintos componentes del sistema inmune innato y adquirido. Las Inmunodeficiencias humorales son las más comúnmente reportadas en el mundo. Una de las inmunodeficiencias humorales es la inmunodeficiencia común variable (CVID) se caracteriza por una afectación en la síntesis de anticuerpos. Utilizando como marcadores de memoria a CD27, CD21 y CD19 Warnatz y colaboradores en el 2002 establecieron la clasificación de Freiburg donde: Grupo I: incluye pacientes que poseen células B CD27+ menos de 0.5% (77% de los pacientes estudiados). Este grupo se subdivide en dos grupos: tipo I a con un número incrementado de las células B CD19+CD21- (células inmaduras); tipo 1b: los pacientes que presentan un número normal de células B CD19+, CD21+ y el Grupo Tipo II: Incluye pacientes con un alto porcentaje de células B, con CD27+ mayor al 0.05%.

En este trabajo de investigación se estudiaron 20 pacientes con diagnóstico de CVID, estos presentaron una disminución en linfocitos T cooperadores, linfocitos NK y monocitos. Así mismo presentaron una disminución en las poblaciones de células B en especial las subpoblaciones de células B de memoria tanto en sus células B de memoria con cambio de isotipo, como sin cambio de isotipo. Con la identificación anterior se aplicó la clasificación de Freiburg, encontrándose que los pacientes del grupo 1a y 1b presentan una disminución en el porcentaje de sus células B; mientras los pacientes del grupo 2 tienen un porcentaje normal.

Así mismo, los pacientes del grupo 1 tienen un porcentaje mayor en eventos de neumonías, otitis, GEPI, Sinusitis, complicaciones autoinmunes y esplenomegalias en comparación con el grupo 2, por lo que los pacientes pertenecientes al grupo 1 presentan un fenotipo clínico más grave. Por lo tanto la evaluación de las poblaciones leucocitarias, como subpoblaciones de células B, así como una clasificación fenotípica y clínica aportan nuevos datos acerca de la inmunidad humoral y celular en esta patología en pacientes mexicanos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunodeficiencias primarias.

Las inmunodeficiencias primarias (PID) se caracterizan por defectos congénitos en el desarrollo y función del sistema inmune humano, como resultado, hay una mayor susceptibilidad a las infecciones. Hasta la fecha, se han encontrado más de 150 defectos moleculares y este número está aumentando rápidamente. Las PID se pueden separar en ocho categorías, dependiendo de qué parte del sistema inmune es disfuncional (Tabla 1). Una visión general de la frecuencia de diagnósticos de PID en la base de datos de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) muestra que las deficiencias primarias de anticuerpos constituyen más de la mitad de los diagnósticos reportados. (Figura 1). La prevalencia estimada varía considerablemente en el diagnóstico individual de PID, de aproximadamente 1:500 para la deficiencia de IgA, siendo la más frecuente, pero a menudo asintomática a > 1:100,000 para las formas muy graves de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndromes de desregulación inmune, y deficiencias del complemento (Vries, 2011).

Tabla 1. Las ocho categorías de Inmunodeficiencias primarias según IUIIS (International Union of Immunological Societies) modificada de Vries, 2011

Categoría	Inmunodeficiencias ^a
Inmunodeficiencias combinadas de células B y T (preferentemente de células T)	Inmunodeficiencia Combinada (Severa), (S)CID por sus siglas en inglés Severe Combined Immunodeficiency Deficiencia CD40L
Deficiencias predominantemente de anticuerpos	Agammaglobulinemia ligada al X o autosómica recesiva Inmunodeficiencia común variable (CVID) por sus siglas en inglés: Common Variable Immunodeficiency Deficiencias específicas de anticuerpos Deficiencias de subclases de IgG Deficiencia selectiva de IgA
Síndromes de inmunodeficiencias bien definidos	Síndrome Wiskott-Aldrich Ataxia-telangectasia y otros desórdenes de reparación de DNA Síndrome Hiper-IgE
Desregulación Inmune	Inmunodeficiencias con hipo-pigmentación Síndrome linfoproliferativo ligado al X Síndrome autoinmune linfoproliferativo
Defectos congénito del número de fagocitos, función o ambos	Neutropenia congénita severa Neutropenia cíclica Enfermedad granulomatosa crónica ligada al X o autosómica recesiva
Defectos en la inmunidad innata	Displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia Deficiencia de la cinasa-4 asociado al receptor de interleucina-1
Desórdenes autoinflamatorios	Candidiasis mucocutánea crónica Fiebre mediterránea familiar Fiebres periódicas asociadas al receptor TNF Síndrome Hiper-IgD
Deficiencias del complemento	Síndromes periódicos asociados a criopirina Angiodema hereditario Espectro amplio de inmunodeficiencias de factores de la vía clásica y alterna del complemento

^a Existen mas de 150 inmunodeficiencias primarias, para ver la lista completa de inmunodeficiencias consultar: PID 2009 update, J AllergyClinImmunol 2009

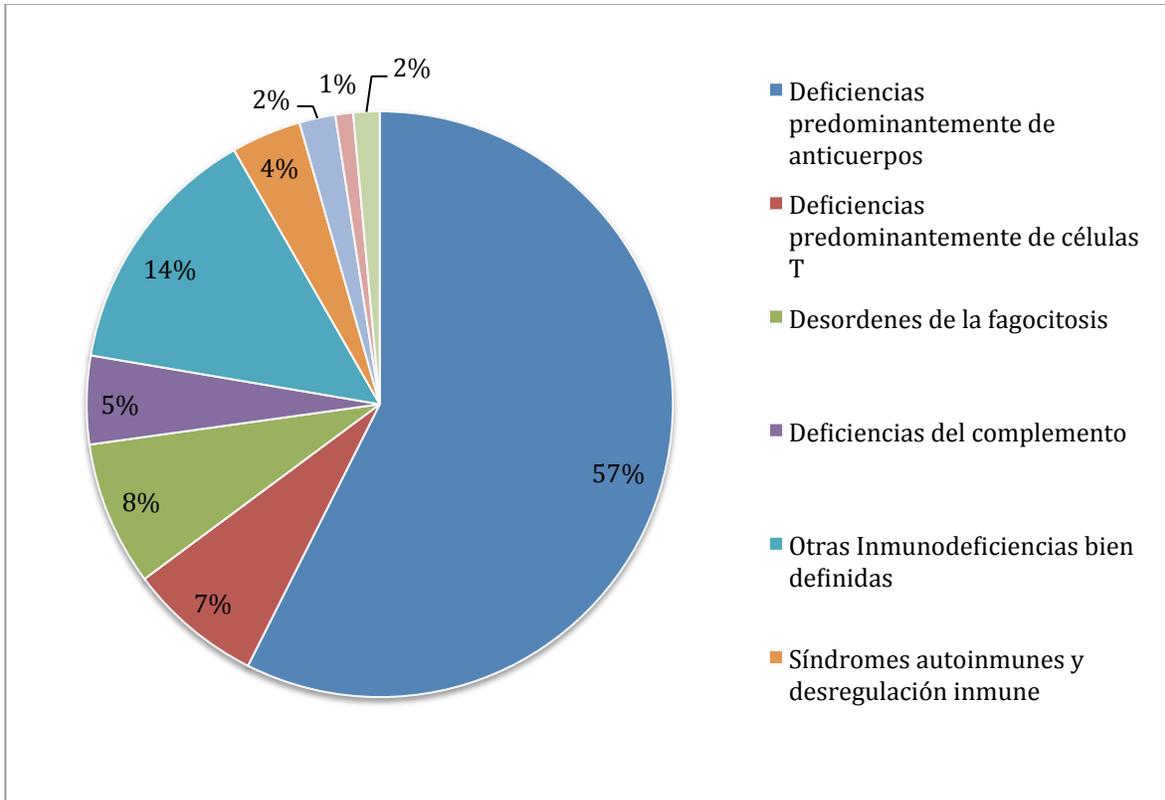


Figura 1 Distribución de Inmunodeficiencias primarias en Europa de acuerdo al registro de pacientes 2013 de la ESID (consultada en <http://www.esid.org/statistics.php?sub=2> mayo de 2013)

1.2 Inmunodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos

Como se mencionó, las deficiencias primarias de anticuerpos son el tipo más común con aproximadamente el 50% del total. El espectro de las deficiencias de anticuerpos abarca desde pacientes con una severa reducción de todos los tipos de inmunoglobulinas séricas y ausencia total de células B en pacientes con una deficiencia selectiva de anticuerpos con niveles normales de inmunoglobulinas como se observa en la tabla 2 (Aghamohammadi y cols.,2012).

Los pacientes en estas condiciones se encuentran libres de infecciones hasta la última parte de su primer año de vida debido a las IgG adquiridas pasivamente de la madre. Algunos pacientes con inmunodeficiencias humorales pueden vivir normalmente si se les da una terapia de reemplazo con inmunoglobulina junto con antibióticos profilácticos (Aghamohammadi y cols.,2012).

Tabla 2. Clasificación de las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos

Tabla modificada (Notarangelo, 2009)

Enfermedad	Ig en suero	Características	Herencia	Defectos genéticos o patogénesis
Agammaglobulinemia ligada al x	Todos los isotipos disminuidos	Infecciones bacterianas serias Células pro B normales	XL	Mutaciones en BTK
Agammaglobulinemia autosómica recesiva	Todos los isotipos disminuidos	Infecciones bacterianas serias Células pro B normales	AR	Mutaciones en la cadena pesada μ , en $\lambda 5$, $Ig\alpha$, $Ig\beta$ y en <i>BLNK</i>
Inmunodeficiencia común variable	IgG e IgA y/o IgM disminuidas	Infecciones bacterianas recurrentes, algunos presentan autoinmunidad, linfoproliferación o enfermedad granulomatosa	Variable	La mayoría desconocidos, en algunos casos mutaciones en ICOS, CD19, TACI, BAFF-R
Síndrome de HiperIgM	Elevación de IgM con IgA e IgG disminuidas	Infecciones oportunistas, neutropenia, enfermedades autoinmunes	XL, AR	Mutaciones en CD40L, gen AICDA, UNG
Deficiencias de isotipo o de cadena pesada con números normales de células B	Una o mas subclases de IgG y/o IgA e IgE probablemente ausente	En algunos casos asintomática o puede presentar infecciones virales/bacterianas recurrentes	Variables	Mutaciones o deleciones en el cromosoma 14q32, Mutaciones en el gen constante Kappa
Deficiencia específica de anticuerpos concentraciones normales de Ig y células B	Normales	Incapacidad de producir anticuerpos contra antígenos específicos	Variable	Desconocida
Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia	IgG e IgA disminuidas	Infecciones bacterianas de recurrentes a moderadas	Variable	Desconocida

1.3 Desarrollo de las células B:

Para comprender los mecanismos moleculares que llevan a deficiencias primarias de anticuerpos es necesario revisar las bases de la maduración temprana y desarrollo terminal de linfocitos B, lo que permite un mejor entendimiento de su patogénesis, así mismo, la identificación de los diversos marcadores de superficie celular de maduración ha dado lugar a un nuevo método de inmunofenotipificación con aplicación en la caracterización de este grupo de enfermedades.

El desarrollo temprano de células pro y pre B humanas a partir de células madre pluripotenciales tiene lugar en la médula ósea (Abbas, 2002). En el primer estadio de diferenciación, conocido con el nombre de estadio pro-B, los linfocitos poseen una capacidad limitada de auto-renovación (Gamberele y cols.,2004).Las células Pro B (CD19⁻ CD10^{+/-} CD20⁻ CD22⁺ CD24⁻ vpreB-Igα^{-/+}) se caracterizan por la expresión del primer marcador de superficie específico de las células B CD22 (Warnatz y cols.,2008). Esta etapa se caracteriza por la reorganización de los loci de la cadena Ig H y L, el cual se lleva a cabo en dos etapas: primero se asocian los fragmentos D_H-J_H (pro-B temprano) y luego se une el fragmento V_H al D_HJ_H previamente re arreglado (pro-B tardío) (Gamberele y cols.,2004) (Le Bien y cols., 2008). El re arreglo completo de la cadena pesada junto con la cadena ligera temporal en la superficie dan lugar al pre BCR, lo que marca la etapa de célula preB.

Las células Pre B (CD19⁺CD10⁺ CD20⁻ CD24⁺⁺vpreB⁺Igα⁺intracelular μ⁺) que expresan correctamente el preBCR en la superficie son seleccionadas positivamente para proliferar y para una consiguiente diferenciación (Warnatz y cols.,2008) (Abbas, 2002).

Después del exitoso ensamblaje del preBCR y una expansión de la cadena ligera Kappa o Lambda, esta remplaza a la cadena provisional ligera, el acoplamiento de la cadena pesada μ y la cadena ligera finalmente llevan a la expresión de la IgM de superficie, el marcador de las células B inmaduras.

Únicamente del 10-20% de células B inmaduras producidas en la médula ósea llegan al bazo, una gran proporción es eliminada debido a una expresión autoreactiva del BCR (Warnatz y cols., 2008) (Suriyani y cols., 2013). En este punto el desarrollo central de las células B está completo por lo que las células transicionales salen de la médula ósea para su completa maduración en los órganos linfoides secundarios, principalmente el bazo (Driessen y cols., 2011).

La activación del complejo BCR por antígenos (Ag) conformacionales que se lleva a cabo en tejidos linfoides, estimula una mayor diferenciación y maduración de las células B (Driessen y cols., 2011). Esta maduración está mediada por cambios dinámicos en la expresión de genes que dan lugar a la reacción del centro germinal (GC). La reacción GC se caracteriza por la expansión clonal, la recombinación de cambio de isotipo (RSE) en el locus IgH, la hipermutación somática (SHM) de genes VH, y la selección de un BCR de alta afinidad. Es dentro de los GCs donde la SHM y la purificación selectiva producen los clones de células B de mayor afinidad que forman los compartimentos de memoria de la inmunidad humoral (Le Bien y cols., 2008).

Las células B de memoria que han pasado por una hipermutación somática rápidamente generan todos los tipos de inmunoglobulinas durante la respuesta secundaria y pueden ser identificadas por la expresión de CD27⁺, (Ko y cols. 2005). La expresión de CD27, miembro de la familia de TNFR, está limitada a linfocitos activados y células dendríticas. Las células B CD27⁺ se encuentran predominantemente en centros germinales y zonas marginales por lo que CD27 está considerado como el marcador de células B de memoria (Xiao y cols., 2004).

Hay dos tipos de células B de memoria: las células B de memoria sin cambio de

isotipo (CD27⁺IgD⁺) que representan aproximadamente del 15-25% de las células B en circulación y las células B de memoria con cambio de isotipo (CD27⁺IgD⁻), (Warnatz y cols., 2008) (Haymore y cols., 2008).

Dependiendo de la fuerza de afinidad de la señal del BCR, la activación de receptores de co-estimulación y otros factores, la activación de células B maduras por antígenos lleva a su muerte o a una diferenciación en células B de memoria o células plasmáticas que son las responsables de la memoria inmunológica de larga duración y la producción de un gran número de moléculas de inmunoglobulinas (Warnatz y cols., 2008).

Las células plasmáticas surgen de la zona extrafolicular así como de los GC . Durante un encuentro primario con el antígeno, los plasmablastos en la zona medular de los ganglios y en la pulpa roja del bazo son los primeros en iniciar la formación anticuerpos (Warnatz y cols., 2008).

La identificación de nuevas subpoblaciones celulares continua en aumento, así, recientemente se han descrito células B CD21^{low}CD38^{low} como una subpoblación distinta. Mientras que su origen y función específica aún está en disputa, se caracterizan por contener clonas principalmente autorreactivas que podrían representar células B anérgicas. Las células B CD21^{low}CD38^{low} expresan receptores de quimiocinas CXCR5 y CCR7 y CD23 y su expansión se ha correlacionado con la presencia de enfermedades granulomatosas, esplenomegalia, lupus eritematoso sistémico (LES), diversas enfermedades autoinmunes y en un subgrupo de pacientes con COVID (Driessen y cols.,2011)(Rakhmanov y cols,2009). Las células B CD21^{low} se encuentran en menos del 10% del total de células B en los controles sanos (Vlková y cols., 2010).

1.4 Inmunodeficiencia Común Variable (CVID)

La Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) es un conjunto heterogéneo de condiciones, todas ellas caracterizadas por una deficiencia primaria de anticuerpos (hipogammaglobulinemia) de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas. Es la más común de las inmunodeficiencias primarias con sintomatología clínica, han surgido muchos avances en los últimos años desde que fue descrita por primera vez en 1953 por Janeway y colaboradores y el término acuñado en 1973 por Cooper y colaboradores (Yong y cols., 2011).

El defecto inmunológico principal es la falta de producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, aunque se han descrito anomalías en todos los otros compartimentos del sistema inmune. Clínicamente, los individuos con CVID son propensos a infecciones recurrentes, más frecuentemente de las vías respiratorias, pero pueden presentarse otro tipo de infecciones incluyendo las del sistema gastrointestinal. En la CVID también se manifiesta aspectos de la desregulación inmune con complicaciones no infecciosas que incluyen autoinmunidad (típicamente citopenias autoinmunes), enfermedad infecciosa gastrointestinal, inflamación granulomatosa, proliferación linfoide, y un mayor riesgo de malignidad (Yong y cols., 2011).

Debido a la heterogeneidad y la rareza de la enfermedad, los avances en el estudio de sus etiologías han sido relativamente lentos, aunque en la última década, se han hecho muchos avances (en paralelo con el crecimiento y la comprensión en todos los aspectos de la inmunología) para mejorar el conocimiento de los mecanismos básicos, así como la atención clínica de los pacientes con CVID (Yong y cols., 2011).

1.4.1 Manifestaciones clínicas

Las bacterias más frecuentemente asociadas con las infecciones en CVID son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *klebsiella pneumoniae*. Las

infecciones sinopulmonares recurrentes pueden comenzar en cualquier momento después de la edad de dos años, pero con mayor frecuencia son precedidas por un período de tiempo prolongado (por ejemplo, décadas) en el que la frecuencia y severidad de las infecciones son normales o casi normales. Algunas personas con CVID también pueden presentar alta susceptibilidad a las infecciones por micoplasma. Variablemente, las personas con CVID pueden también tener meningitis u otras infecciones bacterianas sistémicas oculares recurrentes o infecciones de la piel o gastrointestinales (GI) síntomas relacionados con homeostasis intestinal, como diarrea crónica, mala absorción, o hinchazón (Yong y cols., 2011).

Además de la disfunción inmune humoral, en los individuos con CVID puede también haber síntomas de función anormal de células T y desregulación inmune, incluyendo hiperplasia linfoide, inflamación gastrointestinal, una variedad de fenómenos autoinmunes, y una mayor susceptibilidad al cáncer, especialmente a la generación de linfomas (Scharenberg y cols., 2006).

Dentro de la patología gastrointestinal, se han reportado en aproximadamente 20% de los individuos con CVID, infecciones e inflamación asociados con síntomas de mala absorción (Scharenberg y cols., 2006), así como Infecciones gastrointestinales por *Salmonella*, *Campylobacter* y *Giardia* que se producen en aproximadamente el 10% de los individuos (Piqueras y cols., 2003). La inflamación gastrointestinal en personas con CVID puede parecerse a la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa (Scharenberg y cols., 2006).

Los fenómenos autoinmunes que experimentan las personas con CVID, se atribuyen a la desregulación inmune que ocurre como efecto secundario al defecto molecular subyacente a su deficiencia inmune humoral. El inicio y la gravedad de los fenómenos autoinmunes en cualquier individuo con CVID son por lo tanto fuertemente influenciados por otros modificadores genéticos inmunes tales como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), así como por influencias

ambientales, incluyendo virus y la exposición a patógenos gastrointestinales y la presencia o ausencia de inflamación crónica (Scharenberg cols., 2006).

Del 20% a 25% de los individuos con CVID presentan una o más formas diversas de fenómenos autoinmunes relacionados, que van desde trastornos semejantes a la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico a citopenias, hepatitis y alopecia areata.(Scharenberg cols., 2006). La trombocitopenia autoinmune y anemia son los más comúnmente reportadas (~ 4% -5% y el 2% -4%, respectivamente) (Scharenberg cols., 2006).

Como se mencionó, las personas con CVID son susceptibles a padecer enfermedades malignas, especialmente linfomas. En un estudio con 248 personas, Cunningham-Rundles y Bodian [1999] encontraron que casi el ocho por ciento desarrollaron linfoma no Hodgkin (LNH), otro uno por ciento tenían linfoma de Hodgkins, y otros individuos presentaron 24 diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, melanoma y carcinoma de células basales.

En el pasado, el principal determinante del pronóstico a largo plazo para las personas con CVID era el número y gravedad de las infecciones bacterianas sinopulmonares, lo que contribuye a una mortalidad global del 23% -30% durante aproximadamente diez años de período de seguimiento (Scharenberg cols., 2006).

1.4.2 Diagnóstico

Los criterios diagnósticos de CVID fueron definidos originalmente por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) y el Grupo Panamericano de Inmunodeficiencia Humana (Pagid) en 1999 (Conley y cols., 1999) como sigue:

- Probable

Paciente masculino o femenino que tiene una marcada disminución de IgG (al menos 2 DS por debajo de la media para la edad) y una marcada disminución en al

menos uno de los isotipos IgM o IgA, y cumple todos los criterios siguientes:

- 1) El inicio de la inmunodeficiencia es después de los 2 años de edad.
- 2) Isohemaglutininas ausentes y / o mala respuesta a las vacunas.
- 3) Las causas definidas de hipogammaglobulinemia han sido excluidos. (ver "Diagnóstico diferencial del Hipogammaglobulinemia anexo1)

No existen datos precisos sobre la prevalencia de la CVID pero se ha estimado entre 1:10000 y 1:100000 de la población. Los datos actuales en el registro ESID muestra una prevalencia mínima de CVID de 5/100, 000 habitantes en Francia, casi 2 en el Reino Unido, y el 1,3 sólo en Alemania (Driessen y cols., 2011). Actualmente estos criterios son los más aceptados y utilizados en el diagnóstico de inmunodeficiencias en México.

1.4.3 Etiología

En los últimos años, las deficiencias de ICOS, TACI, CD19, BAFF-R, CD20 y CD81 han sido identificados en pacientes con condiciones CVID, sin embargo, menos del 10% de los pacientes con CVID tienen antecedentes familiares y la presencia de estos defectos genéticos según lo reportado en la base de datos de inmunodeficiencias primarias de la ESID. La heterogeneidad inmunológica y clínica de la CVID dificulta el descubrimiento de los mecanismos subyacentes que causan enfermedades, defectos genéticos y factores clínicamente relevantes en la mayoría de los pacientes (Driessen y cols., 2011), (Yongy cols., 2011).

Los pacientes con CVID no producen cantidades suficientes de Abs Ag-específicos, que puede ser causados por defectos en cualquier etapa crítica de la diferenciación y maduración de las células B (Driessen y cols., 2011).

Inicialmente, varios estudios genéticos en los años 1980 y 1990 se habían centrado principalmente en la región HLA y se demostró una asociación con CVID. No fue hasta el 2003 que las mutaciones en ICOS fueron identificados como el primer trastorno genético que resulta en un fenotipo CVID (Castigli y cols., 2005). El ritmo de avance en el descubrimiento de la base genética de la CVID ha progresado mucho desde entonces. Se han encontrado mutaciones de células B en genes relacionados con la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) así como (TACI y BAFF-R), en los miembros del complejo de células CD19- receptor (CD19, CD21 y CD81) y en el antígeno de diferenciación de células B, CD20. Además en diversos polimorfismos de los genes implicados en el metabolismo del ADN (MSH5, MSH2, MLH1, RAD50, y NBS1), (Park y cols. 2011).

1. 5 Clasificación de CVID

Los pacientes con CVID presentan un grupo heterogéneo de trastornos con etiologías separadas como se sugiere por el hecho de la presencia de defectos de células B, células T (entre ellos la falta de coestimulación). Además la heterogeneidad clínica de los pacientes sugiere causas moleculares y/o genéticas diferentes para cada caso, razón por la cual los métodos de clasificación son necesarios para poder determinar los mecanismos responsables de CVID (Ko y cols.,2005). Desde 1997 se han propuesto diversas clasificaciones entre las más aceptadas tenemos:

- ✓ Bryant Spickett y col. Propusieron en 1997 una clasificación para CVID, de acuerdo con la capacidad de los pacientes para producir IgM, IgA e IgG *in vitro* tras la estimulación con *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) más interleucina-2 (IL-2) o anti-IgM más IL-2. Se establecieron tres grupos: Grupo A: involucra pacientes que presenta falla en la producción de cualquier isotipo de Ig *in vitro*; Grupo B: pacientes con producción normal solamente de IgM; Grupo C: pacientes con una producción similar a individuos sanos

de cualquier tipo de isotipo de Ig's *in vitro*, pero niveles bajos de inmunoglobulinas *in vivo* (Spickett y col., 1997) (Bryant y col., 1990).

✓ Clasificación de Freiburg

Warnatz y cols. (2002) propusieron una clasificación por medio de citometría de flujo (FACS)-la cual define 2 grupos:

- Grupo tipo I: incluye pacientes que poseen células B CD27⁺ menos de 0.5% (77% de los pacientes estudiados). Este grupo se subdivide en dos grupos:
 - Tipo 1a: con un número incrementado de las células B CD19⁺CD21⁻ (células inmaduras).
 - Tipo 1b: los pacientes que presentan un número normal de células B CD19⁺, CD21⁺.

Los pacientes del tipo 1a también poseen porcentajes muy bajos de células B de memoria con cambio de isotipo. El 100% de los pacientes del tipo 1a presentó esplenomegalia y el 60% presentó citopenia del tipo autoinmune, mientras que los pacientes del grupo 1b sólo el 7.7% se asoció a otros fenómenos autoinmunes tales como vitiligo y anemia perniciosa.

- Grupo Tipo II: Incluye pacientes con un alto porcentaje de células B, con CD27⁺ mayor al 0.05% y con una producción normal de Ig's *in vitro*, pero con porcentajes bajos de Ig's *in vivo*.

Esta clasificación muestra una buena correlación con la clasificación anterior propuesta por Bryant et al, además permite realizar asociaciones clínicas como citopenía autoinmune y esplenomegalia preferentemente con el grupo Ia.

En esta clasificación se concluyó que los pacientes con CVID del grupo I, pueden tener reacciones irregulares en el centro germinal. Los pacientes con CVID del grupo II pueden cursar con incremento en la proliferación o decremento en la

apoptosis y sí estos pacientes tienen número normal de células B de memoria, pueden tener una reacción normal de centro germinal, pero fallan en la producción de anticuerpos in vivo y la hipogammaglobulinemia entonces puede deberse a fallas en la diferenciación hacia las células plasmáticas (Warnatz y col., 2002).

Las células CD21^{low}, que se utilizan para clasificar el grupo 1a y 1b, se han identificado en individuos infectados por el VIH y en el subgrupo 1a en pacientes con CVID, estas células tienen una expresión atípica de marcadores de superficie; se caracterizan por ser células grandes pre-centro germinal maduros (Moir y cols 2008). Expresan altos niveles de CD86, aunque con una función disminuida *in vitro*, por lo que se propuso un estatus de anergia. Después de haber demostrado que las células CD21^{low} son autorreactivas, varios autores plantearon la hipótesis de que la anergia es una expresión de selección negativa defectuosa durante la maduración (Rakhmanov M. Y col. 2009).

Alternativamente varios autores proponen una activación inadecuada de estas células en la periferia debido a la fuerte acumulación de estas en el espacio bronco alveolar en pacientes con CVID. Curiosamente, la expansión de las células B CD21^{low} en la sangre periférica se asoció significativamente con una deficiencia en la activación de la vía de calcio. Esta deficiencia no se limita a la población de células B CD21^{low} sino que afecta a todas las células B maduras en los pacientes Ia de la clasificación Freiburg. La disección de los diferentes pasos que conducen a la entrada de calcio a través de la membrana plasmática reveló un estado fosforilado de la liberación de PLC γ 2 normal, mientras que el paso de flujo de calcio transmembrana se reduce drásticamente en las células B CD21^{low} (Isnardi I y col 2010) (Foerster C. y cols 2010).

Clínicamente, la reducción severa de las células B de memoria con cambio de isotipo se asocia con alto riesgo de granulomas y esplenomegalia, La

esplenomegalia también está asociada con un incremento de las células B CD21 bajo. La elevación de las células B transicionales están asociadas con un riesgo alto a linfadenopatias (Wehr y col. 2007) (Arumugakani G y col 2010).

✓ Clasificación de París

La clasificación propuesta por el grupo de París (Piqueras y col. 2003), se basa en la cuantificación de la proporción de sub-poblaciones de células B de memoria (BM), definidas con base en la expresión de IgD y CD27 a partir de un estudio donde se dividieron a los pacientes en 3 grupos:

- Grupo BM0: pacientes sin células B de memoria (CD27⁻).
- Grupo BM1: pacientes con células B de memoria no funcionales (sin cambio de isotipo (CD27⁺IgD⁺))
- Grupo BM2: pacientes con células B de memoria de ambos tipos (células B de memoria con cambio de isotipo, CD27⁺IgD⁻ y células B de memoria sin cambio de isotipo células B CD27⁺IgD⁻) en una proporción igual a la de la población general.

En los pacientes con CVID del grupo BM0 se observó una proporción mayor de manifestaciones linfoproliferativas y granulomatosas, en tanto que en los pacientes del grupo BM0 y BM1 hubo esplenomegalia. En contraste enfermedades autoinmunes se encontraron en los tres grupos con una prevalencia similar (Piqueras y col. 2003).

- ✓ La última clasificación de los pacientes con CVID es el de la EURO class trial, este ensayo europeo fue iniciado para desarrollar un consenso de los dos esquemas de clasificación anteriores basados en el fenotipo de las células B y el curso clínico. Esta clasificación dividió principalmente en dos grupos de acuerdo a las células B transicionales (a) y a las células B CD21^{low}:

El grupo A incluye:

- Grupo B+ está formado por $> 1\%$ de células B. Este grupo a su vez se subdividió en:
 - Grupo switched memory B cells (smB-) formado por $\leq 2\%$ de células B de memoria con cambio de isotipo.
 - Grupo smB- $\text{Tr}^{\text{hi}} \geq 9\%$ células B transicionales.
 - Grupo smB- $\text{Tr}^{\text{norm}} < 9\%$ células B transicionales.
 - Grupo smB+ $> 2\%$ de células B de memoria con cambio de isotipo

El grupo B incluye:

- Grupo B+ está formado por $> 1\%$ de células B. Este grupo a su vez se subdividió en:
 - Grupo switched memory B cells (smB-) formado por $\leq 2\%$ de células B de memoria con cambio de isotipo.
 - Grupo smB- $\text{CD21}^{\text{lo}} \geq 10\%$ células B CD21^{low}
 - Grupo smB- $\text{CD21}^{\text{norm}} < 10\%$ células B CD21^{low}
 - Grupo smB+ $> 2\%$ de células B de memoria con cambio de isotipo
 - Grupo smB+ $\text{CD21}^{\text{lo}} \geq 10\%$ células B CD21^{low}
 - Grupo smB+ $\text{CD21}^{\text{norm}} < 10\%$ células B CD21^{low}

La evaluación clínica de 303 pacientes con CVID demostró que una reducción severa de las células B de memoria se asoció a un riesgo alto de esplenomegalia y enfermedad granulomatosa (Wehr y col., 2008).

Las últimas tres clasificaciones coinciden en que hay una marcada disminución de células B de memoria con cambio de isotipo. Sin embargo, la inmunodeficiencia común variable, aún tiene que ser satisfactoriamente definida y subclasificada de acuerdo a anormalidades moleculares o funcionales. En estudios previos se sugiere que en la inmunopatogénesis de CVID también hay un desorden en las células T en la mayoría de los casos, los cuales no son incluidos en las clasificaciones anteriores. Estas fueron realizadas con pacientes europeos, por lo que en este

trabajo se investigó si la clasificación de Freiburg puede ser aplicada en pacientes mexicanos, la cual además de ser la primera en asociar las células CD21low con enfermedades autoinmunes representa una forma rápida y eficaz de clasificar a los pacientes en centros de investigación en nuestro país.

Por lo anterior en este estudio además de aplicar la clasificación de Freiburg se procedió a realizar un análisis fenotípico de las poblaciones de leucocitos y subpoblaciones de linfocitos a todos los pacientes con la finalidad de asociarlo con manifestaciones clínicas.

II. JUSTIFICACIÓN

En México el diagnóstico definitivo de las Inmunodeficiencias primarias es difícil debido principalmente a la falta de pruebas de laboratorio que caractericen a cada tipo de inmunodeficiencia. En nuestra población el diagnóstico de la CVID actualmente se basa solo en el historial clínico por lo que la determinación de las subpoblaciones de linfocitos B puede servir como un criterio definitivo de diagnóstico de CVID y tener un valor pronóstico en la propensión a padecer enfermedades autoinmunes en estos pacientes. De igual manera, la aplicación de la clasificación de Freiburg puede ser de utilidad para identificar el posible defecto molecular ya que los pacientes del grupo 1a y b, tiene problemas pre-centro germinal y los del grupo 2 post-centro germinal y las proteínas candidato a estudiar dependerán del estadio de diferenciación de la célula B que se ve afectado en cada paciente.

III. HIPÓTESIS

Los pacientes con CVID del grupo 1 de la clasificación de Freiburg tienen disminuidas sus células B de memoria (CD19+, CD27+, IgD-) si estos pacientes además tienen alto porcentaje de las células B (CD21-), tienen predisposición a enfermedades autoinmunes.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar las subpoblaciones de células B en pacientes con CVID para incorporarlos en la clasificación de Freiburg de acuerdo a la expresión de sus células B de memoria correlacionando estos datos con el estatus clínico de los pacientes.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar poblaciones de leucocitos (CD45 positivos) por citometría de flujo: linfocitos B (CD19), linfocitos T (CD3, CD4, CD8), células NK (CD16+56) y monocitos CD14, en pacientes con CVID y en donadores sanos.
2. Identificar las subpoblaciones de las células B en sangre periférica por citometría de flujo: célula B inmadura (IgD+, CD27-), célula B de memoria sin cambio de isotipo (IgD+, CD27+), células B de memoria con cambio de isotipo (IgD-, CD27+), células B transicionales (CD19+, CD24 +, CD38 ++), plasmablastos (CD19+, CD24-, CD38 ++) y CD21bajo (CD21^{LOW}, CD19+, CD38^{LOW}) en pacientes con CVID y donadores sanos.
3. Aplicar la clasificación de Freiburg a los pacientes con CVID para correlacionarla con las manifestaciones clínicas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Población de estudio

Los pacientes incluidos en este estudio fueron previamente diagnosticados con CVID según los criterios establecidos para inmunodeficiencias primarias (Conley y cols., 1999), que asisten para su evaluación a la Clínica de Inmunodeficiencias primarias o a la unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de salud, o del Centro Médico Nacional La Raza.

5.2 Criterios de inclusión

- Los pacientes que se incluyeron en este estudio, fueron previamente diagnosticados con CVID, basado en los criterios de clasificación de la ESID. Las muestras analizadas fueron tomadas antes de iniciar tratamiento.

5.3 Criterios de exclusión

- Pacientes con menos de 1% de células B, por la dificultad para analizar las subpoblaciones de células B.

5.4 REACTIVOS

Para este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos:

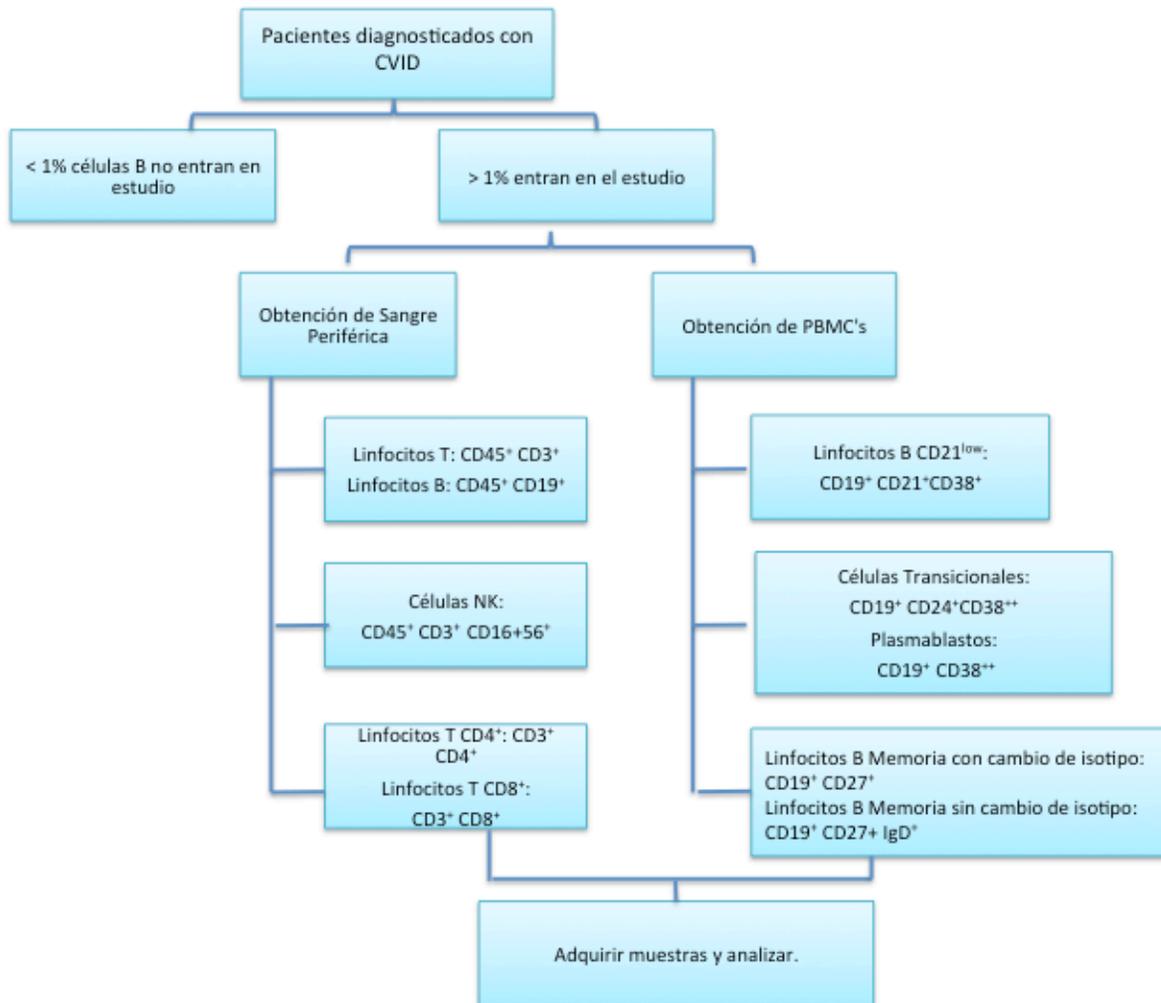
- Bioscience Anti-human CD45PerCP/CD16+56PE/CD3FITC clone NCAM
- Bioscience Anti-human CD45PerCP/CD19PE/CD3FITC clone SK7, 2D1, SJ25C1

- Bioscience Anti-human CD3PerCP/CD8PE/CD4FITC clone SK3, SK1 y SK7
- Bioscience Anti-human CD45FITC/CD14APC
- Bioscience Anti-human CD19APC HIB19
- Bioscience Anti CD19FITC HIB19
- Bioscience Anti-human CD27PE clone M-T271
- Bioscience Anti-humanm IgD FITC, clone IA6-2
- Bioscience Anti-human CD24PE clone ML5
- Bioscience Anti-human CD38APC clone HB7
- Bioscience Control $\gamma_1\gamma_2$ Clone X40 y X39
- Beckman coulter ANTI CD21PE BL13 Beckman coulter
- PBS estéril
- Ficoll-Hypaque
- BD lysing solution
- Solución fijadora
- Alcohol
- Turk

5.5 Equipo

- Citómetro de flujo FACS Aria

5.6 Plan general de trabajo



5.7 Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de 10ml de sangre periférica de los pacientes y controles sanos, utilizando el sistema Vacutainer® con tubos heparinizados o con EDTA, utilizándose 1ml para la determinación de poblaciones leucocitarias. El resto de la muestra se utilizó para la obtención de células polimorfonucleares (PBMCs) por

gradiente de densidad usando Ficoll-Hypaque, las PBMC's aisladas se lavaron dos veces con PBS.

5.8 Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica:

Se realizaron tinciones para determinar las proporciones de diferentes poblaciones celulares, para lo cual se emplearon 30 µl de sangre periférica sin activar y se incubó durante 20 minutos en obscuridad con 5µl de las siguientes mezclas de anticuerpos en tubos para citometría: AntiCD45FITC/CD14APC, Anti CD45PerCP/CD16+56PE/CD3FITC; Anti CD3PerCP/CD8PE/CD4FITC; Anti CD45PerCP/CD19PE/CD3FITC y un control de isotipo anti CD45 PerCP/γ1FITCγ1 PE. Después de la incubación, las muestras se trataron con 500 µl de solución de lisis (BD lysing solution) durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con PBS, centrifugando a 500xg durante 5 minutos. Las células se fijaron con solución fijadora(formaldehído 1%).

Tabla 3 Combinaciones de anticuerpos empleadas para el análisis de poblaciones leucocitarias.

No. Combinación	Células identificadas	Anticuerpos
1	Linfocitos T y B	antiCD45 PerCP; antiCD3 FITC, antiCD19 PE
2	Linfocitos T CD4 y CD8	antiCD4 FITC, antiCD8 PE, antiCD3 PerCP
3	Células NK	antiCD3 FITC, antiCD16+ 56 PE, antiCD45 PerCP

5.9 Análisis de la expresión de subpoblaciones de células B en PBMC's:

La determinación se realizó en PBMC's las cuales fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: anti CD19APC; anti CD19FITC; anti CD27PE, anti IgD FITC, anti CD24PE, ANTI CD38APC y ANTI CD21PE; posteriormente fueron incubados 20 min en oscuridad. Las muestras fueron lavadas con PBS, centrifugando a 500xg durante 5 minutos. Las células se fijaron con solución fijadora (formaldehído 1%).

Tabla 4 Combinaciones de anticuerpos empleadas para el análisis de subpoblaciones de células B

No. Combinación	Células identificadas	Anticuerpos
1	CD21 ^{low}	CD19FITC, CD21PE, CD38APC
2	Células transicionales, plasmablastos	CD19FITC, CD24PE, CD38APC
3	Linfocitos B memoria, Linfocitos B naive, Linfocitos B memoria con cambio de isotipo, linfocitos B memoria sin cambio de isotipo, Linfocitos B dobles negativos	CD27PE, CD19APC, IgDFITC

Usando citometría de flujo, se determinó la expresión de IgD y CD27 para verificar si los pacientes tienen células B maduras; células B de memoria sin cambio de isotipo (IgD+, CD27+), células B de memoria con cambio de isotipo (IgD-, CD27+) y células B inmaduras (IgD+, CD27-). También se determinó la presencia de células B transicionales (CD24⁺⁺, CD38⁺⁺) y plasmablastos (CD24-, CD38⁺⁺).

5.10 Adquisición y análisis

Se adquirieron 10,000 eventos para el análisis de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica y 100,000 eventos para las subpoblaciones de células B en PBMC's. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSAria (BD). Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 8.7.

5.11 Análisis estadístico e interpretación de los datos

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba estadística de Mann-Whitney para datos no paramétricos y la prueba de Kruskal-Wallis, valores de $p \leq 0.5$ entre el grupo de estudio y el grupo control fueron considerados estadísticamente significativos.

VI. Resultados

Debido a que los pacientes pediátricos y jóvenes presentan en general menos complicaciones clínicas y mayor cuenta de células, en este estudio se realizó un análisis de las poblaciones leucocitarias y de las subpoblaciones de las células B en dos grupos de pacientes; el primer grupo consta de diez pacientes de 7 a 17 años de edad y el segundo grupo de adultos a partir de los 18 años y se comparó con veinte testigos sanos pareados por edad (Tabla 5).

Tabla 5 Lista de pacientes, edades y género.

No. Paciente	Edad	Genero
1	7	M
2	9	F
3	9	F
4	9	F
5	9	F
6	10	F
7	11	M
8	14	F
9	16	F
10	17	M
Grupo 1 n= 10 pacientes Niños y jóvenes		

No. Paciente	Edad	Genero
11	18	F
12	20	F
13	20	M
14	22	M
15	31	M
16	39	F
17	43	F
18	48	F
19	54	F
20	66	M
Grupo 2 n=10 Adultos		

6.1 Características clínicas de los pacientes.

Los pacientes estudiados, presentaron las siguientes características clínicas:

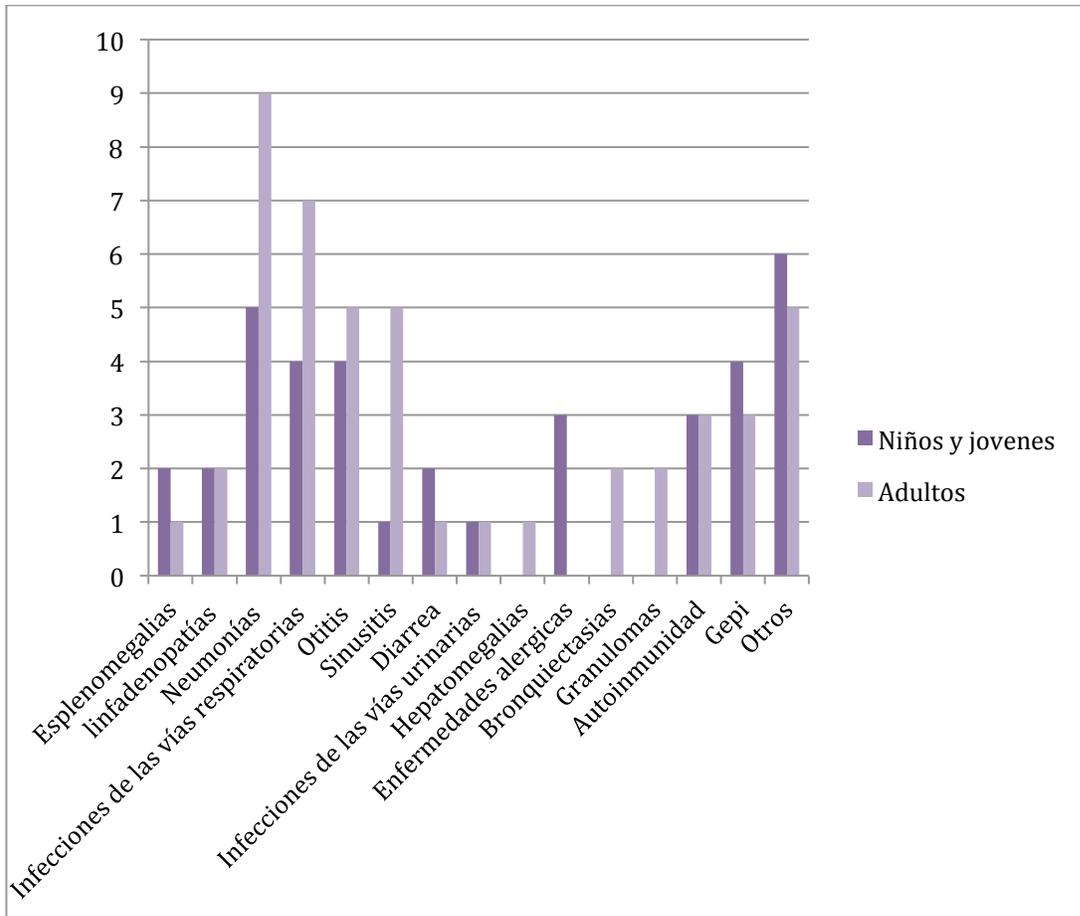
Tabla 6 Historia clínica de todos los pacientes estudiados.

No. Paciente	Edad	Genero	ESPLENOMEGALIAS	LINFADENOPATIA	NEUMONIA	INFECCIÓN VÍAS RESPIRATORIAS	OTTIS	SINUSITIS	DIARREA CRÓNICA	INFECCIÓN VÍAS URINARIAS	ENFERMEDADES AUTOINMUNES	ENFERMEDADES ALÉRGICAS	BRONQUIECTASIAS	HEPATOMEGALIAS	GRANULOMAS	GASTROENTERITIS POR INFECCIÓN
1	7	M							+							+
2	9	F					+				+					
3	9	F			+	+					+					
4	9	F	+		+						+					
5	9	F			+	+	+		+	+		+				+
6	10	F		+	+	+	+									+
7	11	M									+	+				
8	14	M	+	+	+	+	+	+				+				+
9	16	F														
10	17	M														
11	18	F			+	+	+	+					+	+		+
12	20	F			+											+
13	20	M			+	+	+	+								
14	22	M		+	+	+	+									
15	31	M			+	+				+	+					
16	39	F			+	+		+								+
17	43	F	+	+	+	+	+	+	+						+	
18	48	F									+				+	
19	54	F			+			+			+		+			
20	66	M			+	+	+									

Tabla 7 Relación de enfermedades presentada por los diferentes grupos de pacientes.

Enfermedad	Niños y jóvenes	Adultos
Esplenomegalias	2	1
Linfadenopatías	2	2
Neumonías	5	9
Infecciones de las vías respiratorias	4	7
Otitis	4	5
Sinusitis	1	5
Diarrea	2	1
Infecciones de las vías urinarias	1	1
Hepatomegalias	0	1
Enfermedades alérgicas	3	0
Bronquiectasias	0	2
Granulomas	0	2
Autoinmunidad	3	3
GEPI	4	3
Otros	6	5

Dentro de las características clínicas, estas se dividieron por grupos de edad (tabla 7), así mismo se observó el número de pacientes que presentaban la enfermedad de acuerdo al grupo que pertenecen.



Gráfica 1 Relación de enfermedades de acuerdo a la edad de los pacientes.

Un criterio importante a considerar es la concentración de inmunoglobulinas en los pacientes, por ser este un criterio para diagnosticar la CVID, (Tabla 8 y 9). En las tablas 8 y 9 se muestran las concentraciones de los grupos de estudio.

Tabla 8 Concentración de Inmunoglobulinas en niños y jóvenes

No. Paciente	IgG mg/dl	V.R IgG mg/dl	IgA mg/dl	V.R IgA mg/dl	IgM mg/dl	V.R IgM mg/dl
1	<135	607-1228	<23	32-199	<17	45-196
2	125	583-1509	24	44-233	29	49-229
3	46	583-1509	6	44-233	11	49-229
4	<200	583-1509	<40	44-233	<40	49-229
5	226	583-1509	15	44-233	57	49-229
6	33	583-1509	6	44-233	6	49-229
7	386	613-1295	17	69-308	22	53-334
8	206	613-1295	22	69-308	16	53-334
9	138	613-1295	29	69-308	89	53-334
10	295	613-1295	25	69-308	21	53-334

Tabla 9 Concentración de Inmunoglobulinas en adultos

No. Paciente	IgG mg/dl	V.R IgG mg/dl	IgA mg/dl	V.R IgA mg/dl	IgM mg/dl	V.R IgM mg/dl
11	293	613-1295	4	69-308	16	53-334
12	580	613-1295	23.1	69-308	69.4	53-334
13	71	613-1295	13	69-308	280	53-334
14	26	613-1295	6	69-308	189	53-334
15	30	613-1295	4	69-308	42	53-334
16	344	613-1295	23	69-308	17	53-334
17	200	613-1295	10	69-308	30	53-334
18	286	613-1295	18	69-308	30	53-334
19	301	613-1295	1	69-308	5	53-334
20	228	613-1295	6.6	69-308	362	53-334

6.2 Análisis de poblaciones de leucocitos

Para realizar el análisis de las diferentes poblaciones leucocitarias se partió de una gráfica de Granularidad (SSC) vs Tamaño (FSC) de la cual se seleccionó la región donde se encuentran los leucocitos. La muestra fue teñida con CD45FITC/CD14PE para observar las diferentes poblaciones (Figura2).

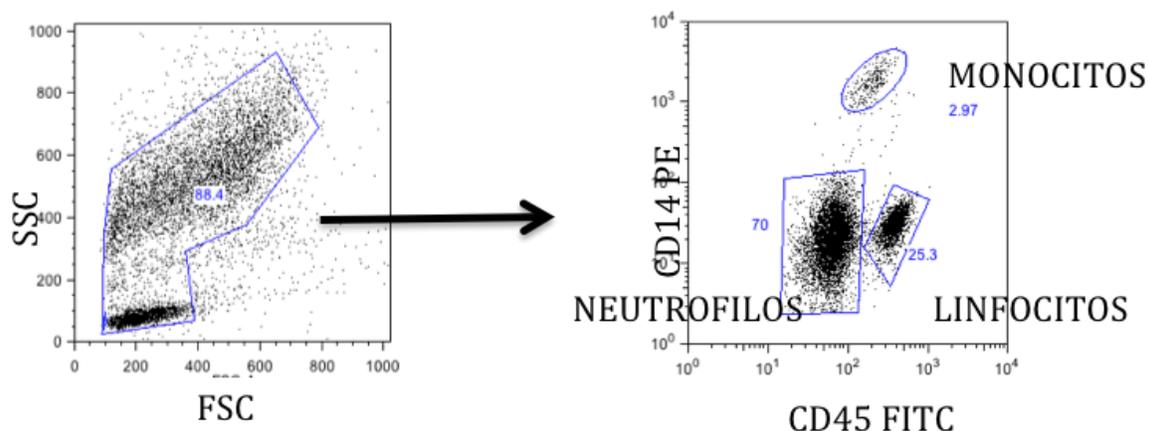


Figura 2 Gráfica de poblaciones leucocitarias. En la gráfica del lado izquierdo encontramos a los leucocitos y en la gráfica del lado derecho podemos observar las diferentes poblaciones leucocitarias: Monocitos (CD45+CD14+), Neutrófilos (CD45+) y Linfocitos (CD45++)

6.3 Análisis de subpoblaciones de linfocitos

A todos los pacientes se les realizó un análisis de subpoblaciones de linfocitos, ya que la predisposición genética a múltiples defectos en todos los compartimentos del sistema inmune podrían ser la causa de los diversos síntomas presentados en pacientes con CVID, para tener un esquema general de su estado de salud y saber que parte de la inmunidad se ve afectada. Por lo que se comenzó con el análisis de los linfocitos NK.

Para observar el porcentaje de linfocitos NK partimos de una región CD45 teñida con PerCP se seleccionó la región de linfocitos (figura 3), posteriormente se dividió a los Linfocitos NK los cuales están teñidos con CD16+56+PE

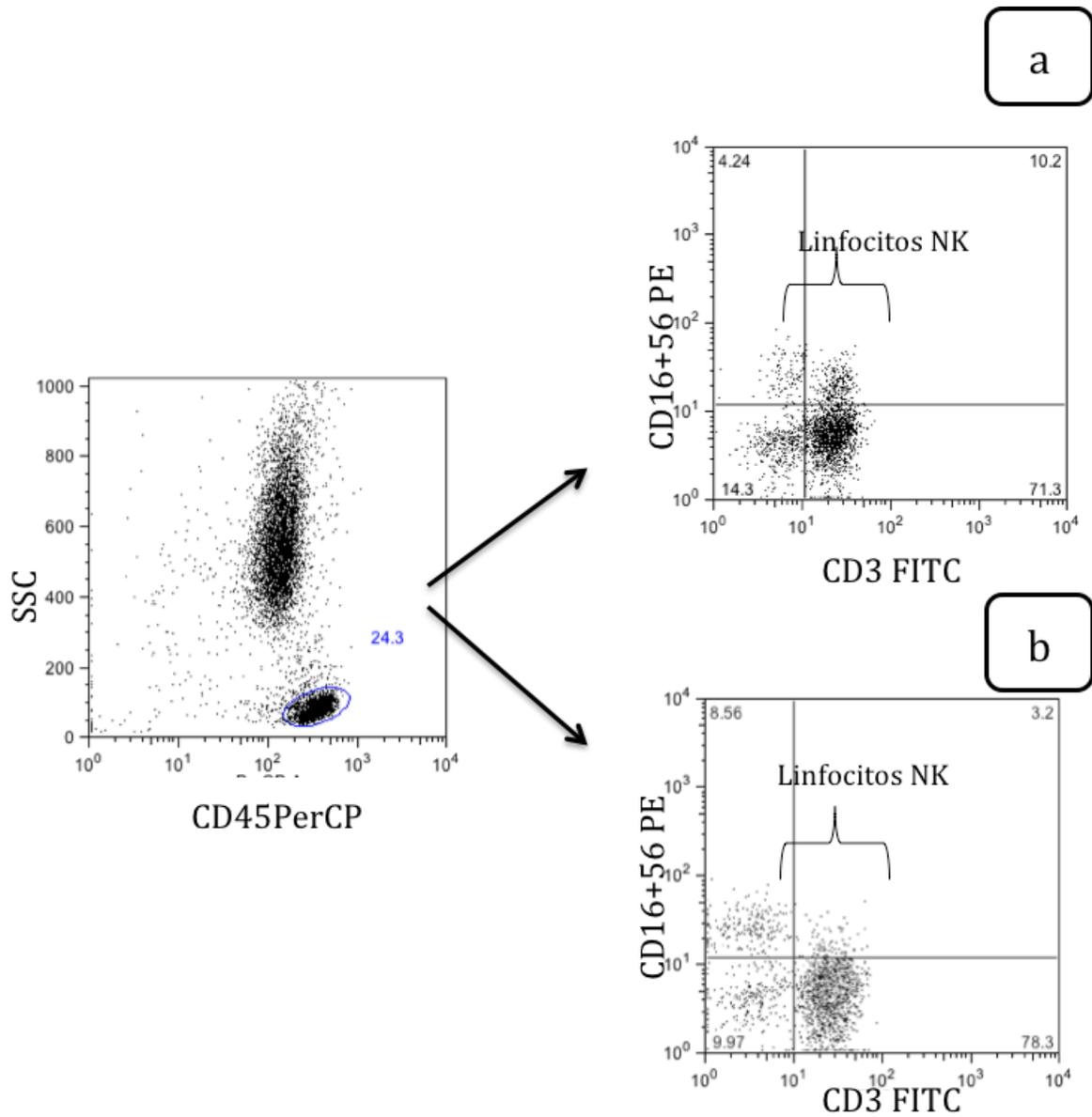


Figura 3 Grafica de linfocitos NK. Se observan los linfocitos NK en la gráfica del lado derecho en la región positiva de CD16+56. En la figura a) se muestra a los linfocitos NK de un testigo y en la fig. b) la de un paciente.

Para observar el porcentaje de linfocitos B y T se partió de una región CD45⁺ teñida con PerCP se seleccionó la región de linfocitos (figura 4), posteriormente se separó a los Linfocitos T (CD45⁺ CD3⁺) de los linfocitos B (CD45⁺ CD19⁺)

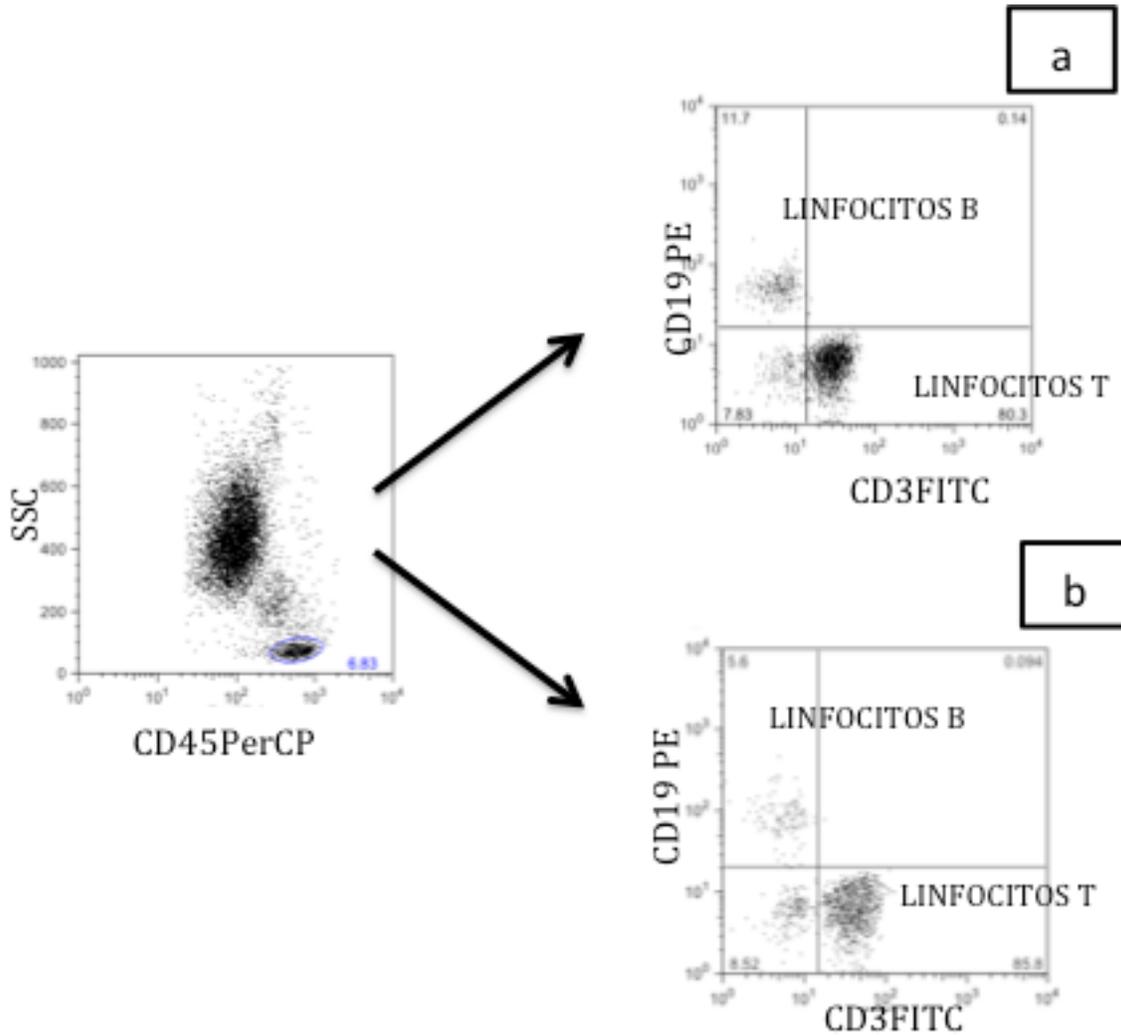


Figura 4 Análisis de Linfocitos T y B. En la gráfica a podemos observar el análisis de un testigo y en la grafica b los de un paciente.

Para analizar a los linfocitos T, de una región CD3PerCP se seleccionaron los Linfocitos T cooperadores CD3⁺ CD4⁺ y los linfocitos T citotóxicos CD3⁺ CD8⁺ (figura 5).

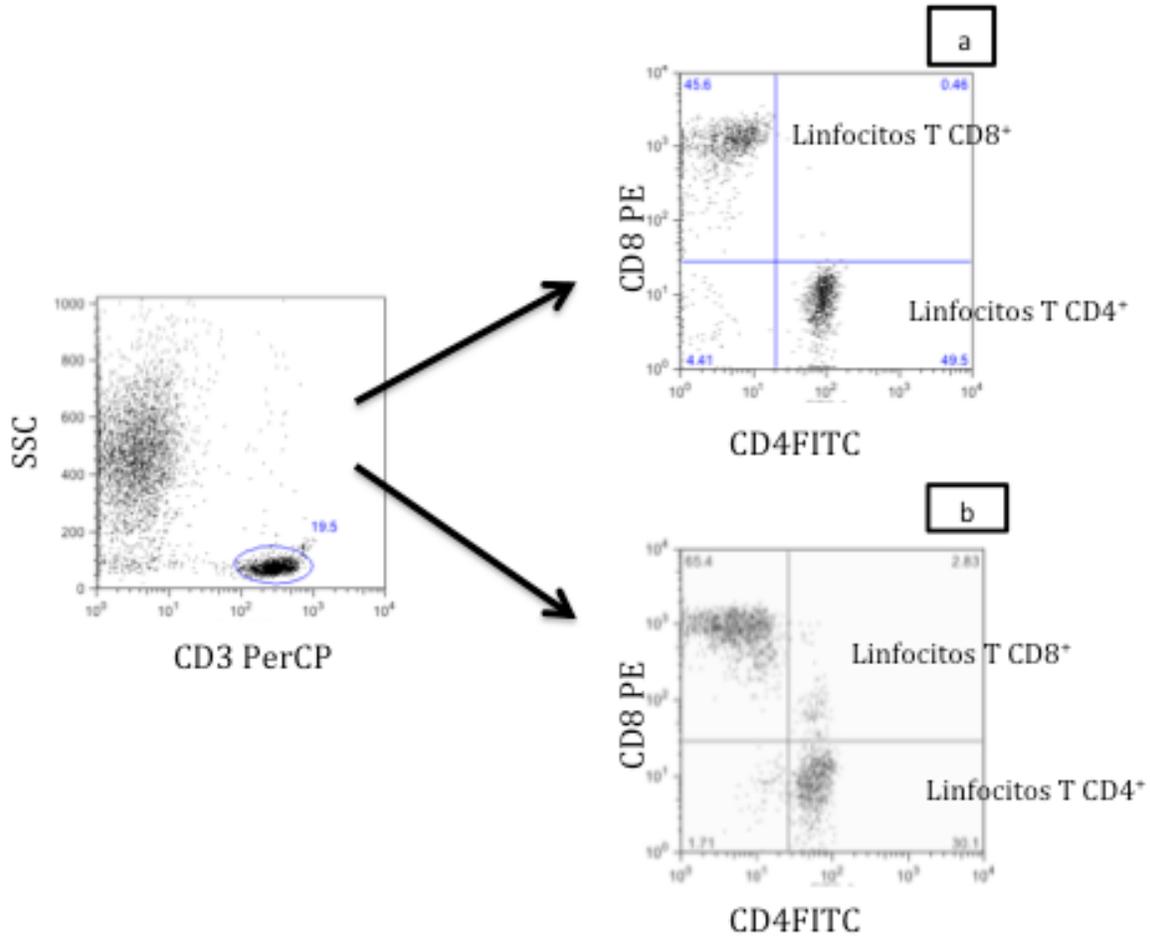


Figura 5 Análisis de Linfocitos T cooperadores CD3⁺ CD4⁺ y los linfocitos T citotóxicos CD3⁺ CD8⁺. Figura a) se observan el análisis del testigo y en la fig. b se encuentra el análisis de un paciente. Se puede observar una mayor cantidad de linfocitos T CD8⁺

Para el cálculo de los números absolutos de células de las poblaciones anteriores se usó el conteo de leucocitos por mm³ realizado con la cámara de Newbauer así como en el porcentaje obtenido en las gráficas anteriores por medio de la siguiente formula:

No. linfocitos, monocitos o neutrófilos

$$= \frac{\text{Leucocitos totales mm}^3 \times \% \text{ linfocitos, monocitos o neutrófilos}}{100}$$

Obteniéndose los valores de Neutrófilos, linfocitos y monocitos en niños y jóvenes (Tabla10), así como en sus testigos (Tabla 20).

Tabla 10. Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias en pacientes niños y jóvenes

No. Paciente	Sexo	Edad	Leucocitos totales células/mm ³	Neutrófilos células/mm ³	Linfocitos células/mm ³	Monocitos células/mm ³
1	M	7	3800	874	2622	190
2	F	9	15800	13588	632	948
3	F	9	8900	6052	2225	300
4	F	9	6300	1254	2079	252
5	F	9	5000	3100	1550	100
6	F	10	5200	3328	1300	156
7	M	11	7800	4750	2496	234
8	F	14	8900	3471	4512	534
9	F	16	4000	3000	400	120
10	M	17	4800	4080	1068	240

Tabla 11. Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias en testigos niños y jóvenes

No. Testigo	Sexo	Edad	Leucocitos totales células/mm ³	Neutrófilos células/mm ³	Linfocitos células/mm ³	Monocitos células/mm ³
1	F	12	7800	4173	2854	351
2	M	14	6600	3960	2006	481
3	F	11	7300	3416	3299	452
4	F	14	7530	4043	2941	547
5	F	14	6300	3144	2463	466
6	F	14	5600	2710	2452	246
7	F	11	7900	4724	2623	466
8	M	12	5700	3009	2114	388
9	M	13	7100	3514	2854	589
10	F	12	6000	2160	1920	720
11	M	15	4600	1913	2185	230
12	M	15	6100	3208	2159	451
13	M	15	5600	2721	2335	336
14	F	16	5100	2590	2014	336
15	F	17	10200	5385	3845	918
16	F	17	5900	3758	1779	301
17	M	17	7800	5428	1973	312
18	F	16	5000	2835	1710	440
19	m	16	5700	2787	2405	336
20	F	16	9500	665	5795	162

Se procedió a realizar el mismo cálculo en el grupo de adultos (tabla 12) con sus respectivos testigos (Tabla 13).

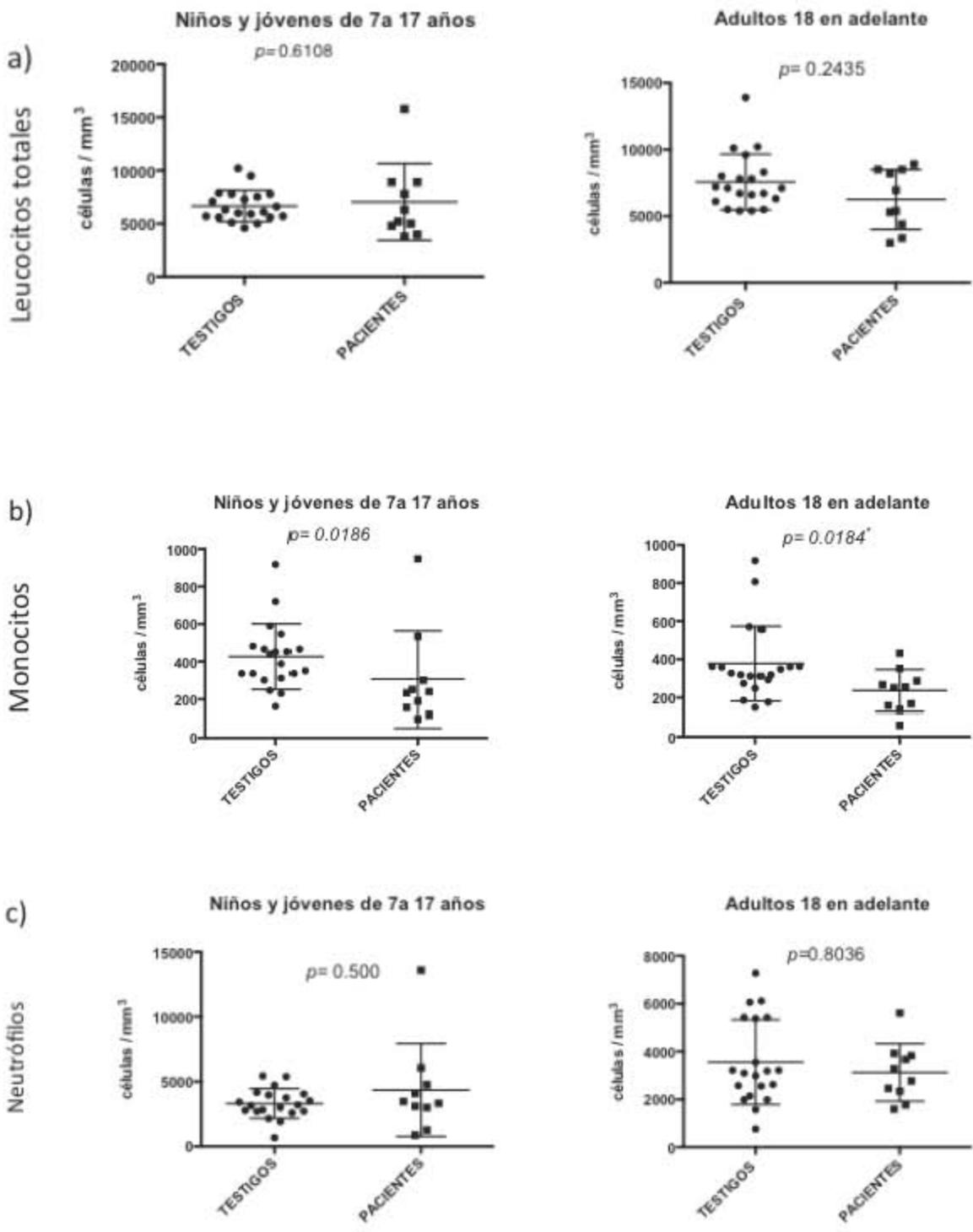
Tabla 12 Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias de pacientes adultos

No. Paciente	Sexo	Edad	Leucocitos totales células/mm ³	Neutrófilos células/mm ³	Linfocitos células/mm ³	Monocitos células/mm ³
11	F	18	8200	2460	2919	287
12	F	20	3350	2345	234	168
13	M	20	5300	3282	1166	159
14	M	22	5400	3672	1188	432
15	M	33	4400	2772	1056	352
16	F	39	4000	2080	1245	540
17	F	43	3000	1770	900	60
18	F	48	8500	3925	3507	251
19	F	54	8500	5610	2550	255
20	M	66	8900	3827	4450	267

Tabla 13 Valores absolutos de las poblaciones leucocitarias de testigos adultos

No. Testigo	Sexo	Edad	Leucocitos totales células/mm ³	Neutrófilos células/mm ³	Linfocitos células/mm ³	Monocitos células/mm ³
1	F	21	8000	760	6320	360
2	F	43	6300	1575	3276	359
3	F	31	5500	3190	1650	176
4	F	35	7100	3550	2556	327
5	F	35	7100	2556	3621	348
6	F	30	6700	3216	2479	362
7	F	30	7200	3096	3312	274
8	F	23	6100	2623	2623	293
9	F	24	6600	2574	2772	185
10	F	33	13900	6116	5838	570
11	F	45	8300	2988	4067	249
12	F	50	5500	2145	2475	149
13	F	75	5400	1987	2862	318.6
14	M	42	10100	6060	3030	808
15	F	40	9600	7286.4	1718.4	556.8
16	F	18	10200	5385.6	3845.4	918
17	M	18	7800	5428.8	1973.4	312
18	M	68	5400	1987	2862	319
19	M	20	7800	5429	1973	312
20	M	28	6700	3216	2479	362

A los resultados anteriores se les aplicó la prueba estadística de Mann-Whitney para datos no paramétricos en pacientes y testigos, de los dos grupos de edad (Figura 6).



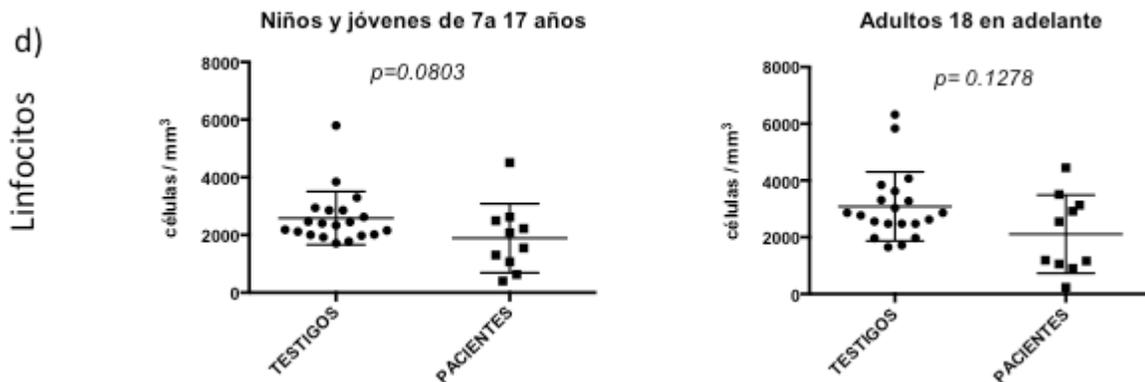


Figura 6 Gráficas de poblaciones leucocitarias en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=20 y en pacientes n= 10

Dentro de las poblaciones leucocitarias la única que presentó una diferencia significativa, fueron los monocitos (figura 6b) con una diferencia de 0.0184 en el grupo de los pacientes adultos en comparación con sus testigos pareados por edad; mientras que las demás poblaciones leucocitarias se encontraron normales en comparación con los valores obtenidos de los testigos.

Se calcularon los valores absolutos de los linfocitos T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, linfocitos NK CD16+56 y linfocitos B CD19⁺ tanto en pacientes niños y jóvenes (Tabla 14), adultos (Tabla 16) como en testigos (15 y 17).

Tabla 14 Valores absolutos de linfocitos de pacientes niños y jóvenes

No. Paciente	Sexo	Edad	CD3 células/mm ³	CD4 células/mm ³	CD8 células/mm ³	CD19 células/mm ³	CD16+56 células/mm ³
1	M	7	1835	1541	55	419	183
2	F	9	556	245	233	60	70
3	F	9	1978	910	929	70	229
4	F	9	1559	1013	514	104	187
5	F	9	1070	385	446	186	326
6	F	10	1040	541	343	156	65
7	M	11	1772	922	797	624	71
8	F	14	3925	2041	1727	315	225
9	F	16	216	100	108	64	164
10	M	17	689	420	193	174	53

Tabla 15 Valores absolutos de linfocitos de testigos

no. Testigo	Sexo	Edad	CD3 células/mm ³	CD4 células/mm ³	CD8 células/mm ³	CD19 células/mm ³	CD16+56 células/mm ³
1	F	12	2041	1070	816.5	514	214
2	M	14	1009	752	229	481	501
3	F	11	2418	1489	786	362	452
4	F	14	2105	1208	779	470	358
5	F	14	1923	748	837	155	288
6	F	14	1751	959	732	287	387
7	F	11	1975	1096	713	294	404
8	M	12	1586	1007	31	342	181
9	M	13	2072	1116	820	437	408
10	F	12A	1574	551	937	250	126
11	M	15	1311	668	648	349	356
12	M	15	1049	575	428	352	675
13	M	15	1471	691	575	420	326
14	F	16	1591	946	498	189	225
15	F	17	2272	1027	920	1115	615
16	F	17	1103	628	399	94	640
17	M	17	1483	713	897	270	473
18	F	16	1260	422	738	191	352
19	m	16	1539	563	923	187	433
20	F	16	3859	2624	1042	1565	399

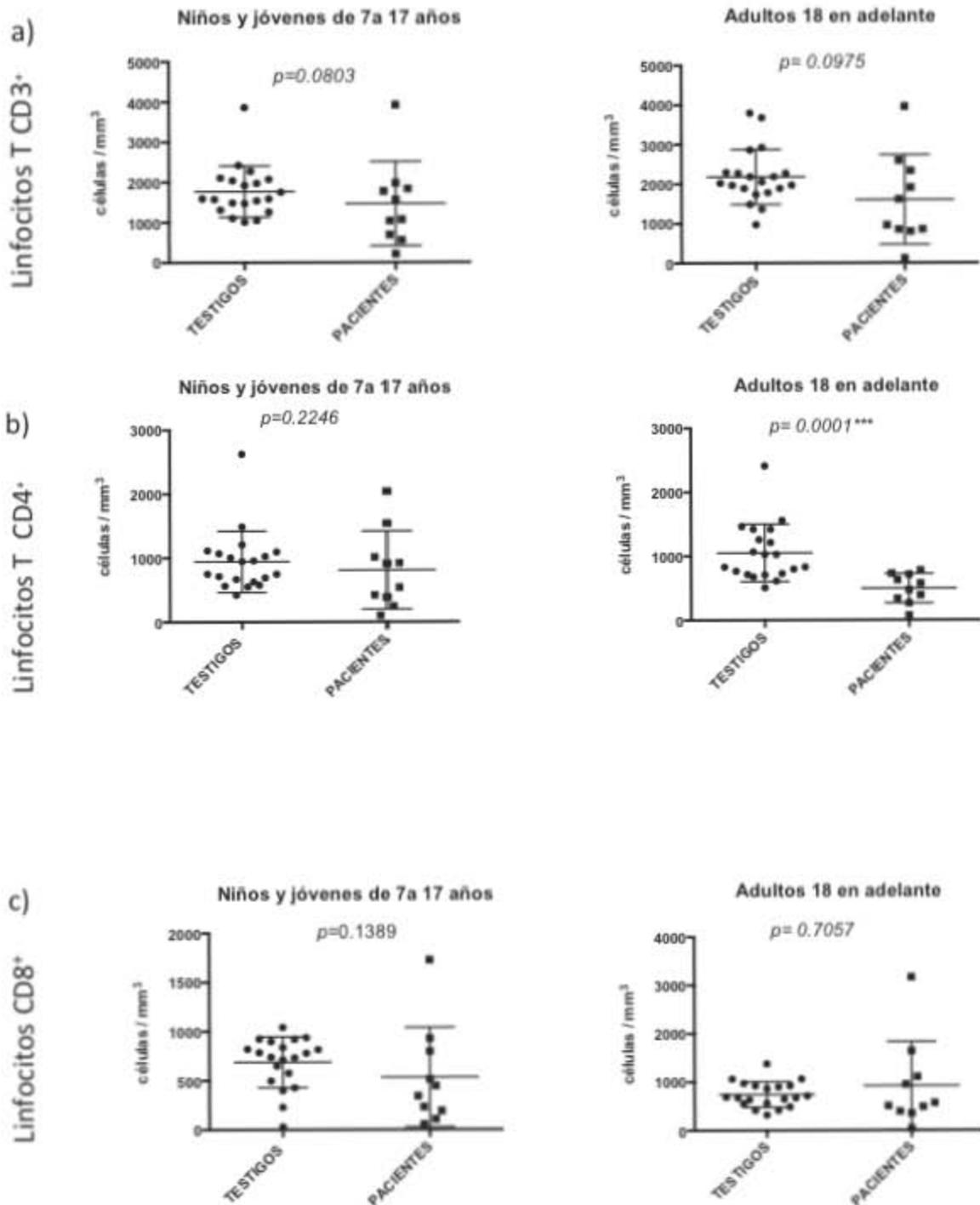
Tabla 16 Valores absolutos de linfocitos en pacientes adultos

No. Paciente	Sexo	Edad	CD3 células/mm ³	CD4 células/mm ³	CD8 células/mm ³	CD19 células/mm ³	CD16+56 células/mm ³
11	F	18	2335	574	1642	44	613
12	F	20	119	73	42	91	16
13	M	20	851	391	392	198	152
14	M	22	855	265	487	190	190
15	M	33	962	336	568	53	63
16	F	39	992	516	397	128	220
17	F	43	801	470	352	36	36
18	F	48	1613	629	952	1157	596
19	F	54	1912	728	1109	510	153
20	M	66	3961	713	3169	267	267

Tabla 17 Valores absolutos de linfocitos en testigos adultos

no. Testigo	Sexo	Edad	CD3 células/mm ³	CD4 células/mm ³	CD8 células/mm ³	CD19 células/mm ³	CD16+56 células/mm ³
1	F	21	3792	2412	1062	1452	1680
2	F	43	2293	1559	631	573	1071
3	F	31	974	614	317	380	853
4	F	35	1968	709	561	230	4589
5	F	35	2861	1259	973	326	1704
6	F	30	1735	798	486	198	1491
7	F	30	2186	831	670	530	2345
8	F	23	1967	767	688	656	1080
9	F	24	2024	728	648	499	1281
10	F	33	3678	1214	1060	701	594
11	F	45	2928	1464	1376	447	4170
12	F	50	1782	677	552	272	1660
13	F	75	1888	1420	415	435	1045
14	M	42	2054	1068	863	182	540
15	F	40	1366	509	713	153	830
16	F	18	2272	1027	920	1115	615
17	M	18	1483	713	897	270	473
18	M	68	1889	1420	416	435	1045
19	M	20	2273	1027	920	1115	615
20	M	28	2186	831	670	530	1491

Con los resultados anteriores se realizó la prueba estadística para datos no paramétricos Mann-Whitney, haciendo una comparación entre testigos y los grupos de pacientes de cada una de las subpoblaciones de linfocitos (figura 7).



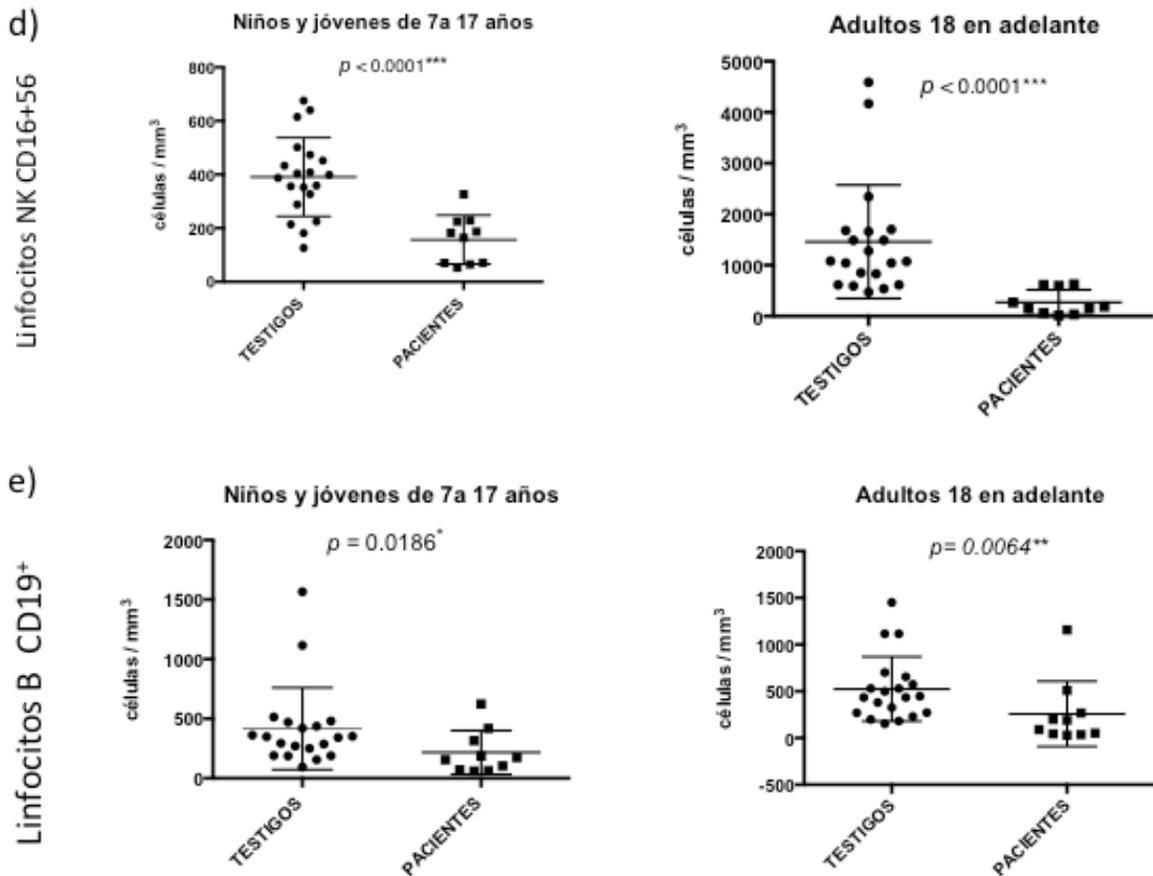


Figura 7 Gráficas de poblaciones linfocitos en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=20 y en pacientes n= 10

En la figura 7 se observó que en los linfocitos T (figura 7a) y los linfocitos T CD8⁺(figura 7c)no hubo diferencia significativa entre los pacientes de ambos grupos y los testigos pareados por edad.

Mientras que en los linfocitos B (figura 7e) se observó una diferencia significativa de 0.0186 en pacientes jóvenes y de 0.0064 en pacientes adultos, siendo mayor la disminución de linfocitos B en adultos lo cual indica que hay un problema en el

desarrollo de los linfocitos B, lo cual es un criterio importante para la clasificación de los pacientes con COVID.

Al igual que los linfocitos B, los linfocitos NK (figura 7d) y los linfocitos T (figura 7b) CD4⁺ presentaron una marcada disminución en ambos grupos en relación con sus testigos lo que confirma que no solo los linfocitos B están alterados en estos pacientes también los linfocitos T y los linfocitos NK.

6.5 Análisis de las subpoblaciones de células B

Partiendo de una región de linfocitos B teñidos con CD19⁺ APC se separaron las subpoblaciones de linfocitos B de Memoria con cambio de isotipo (CD19⁺CD27⁺IgD⁻), células B de memoria sin cambio de isotipo (CD19⁺CD27⁻IgD⁺), células B naive (CD19⁺ CD27-IgD⁺) (Figura 8).

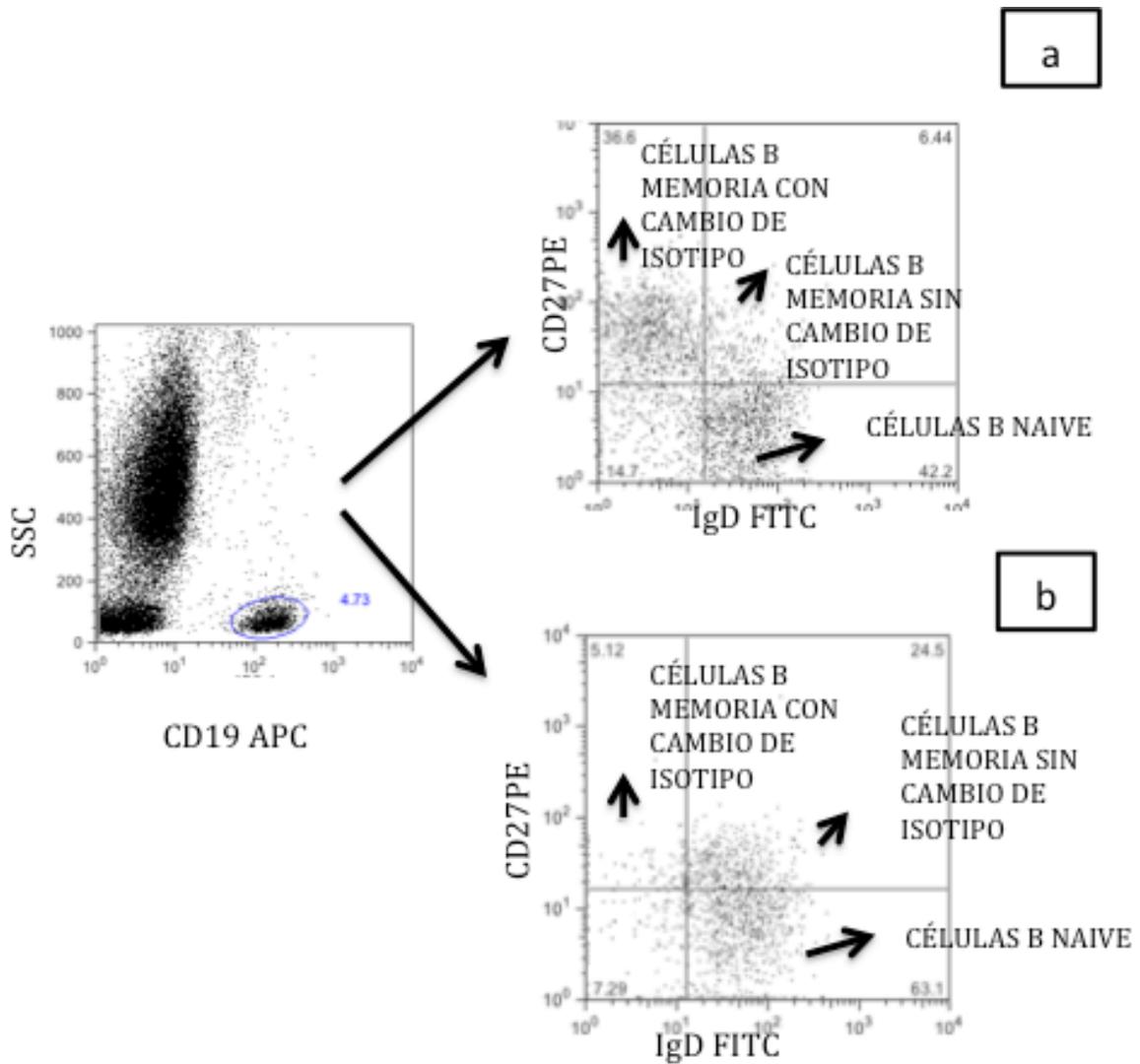


Figura 8 Subpoblaciones de células B. Podemos observar células B Naive, células B de Memoria con cambio de isotipo y sin cambio de isotipo. Fig a) se observan el análisis del testigo y en la fig. b se encuentra el análisis de un paciente

Para analizar las células B transicionales ($CD19^+ CD24^+ CD38^{++}$) y plasmablastos ($CD19^+ CD24^- CD38^{++}$), partimos de una región CD19 teñida con FITC (figura 9).

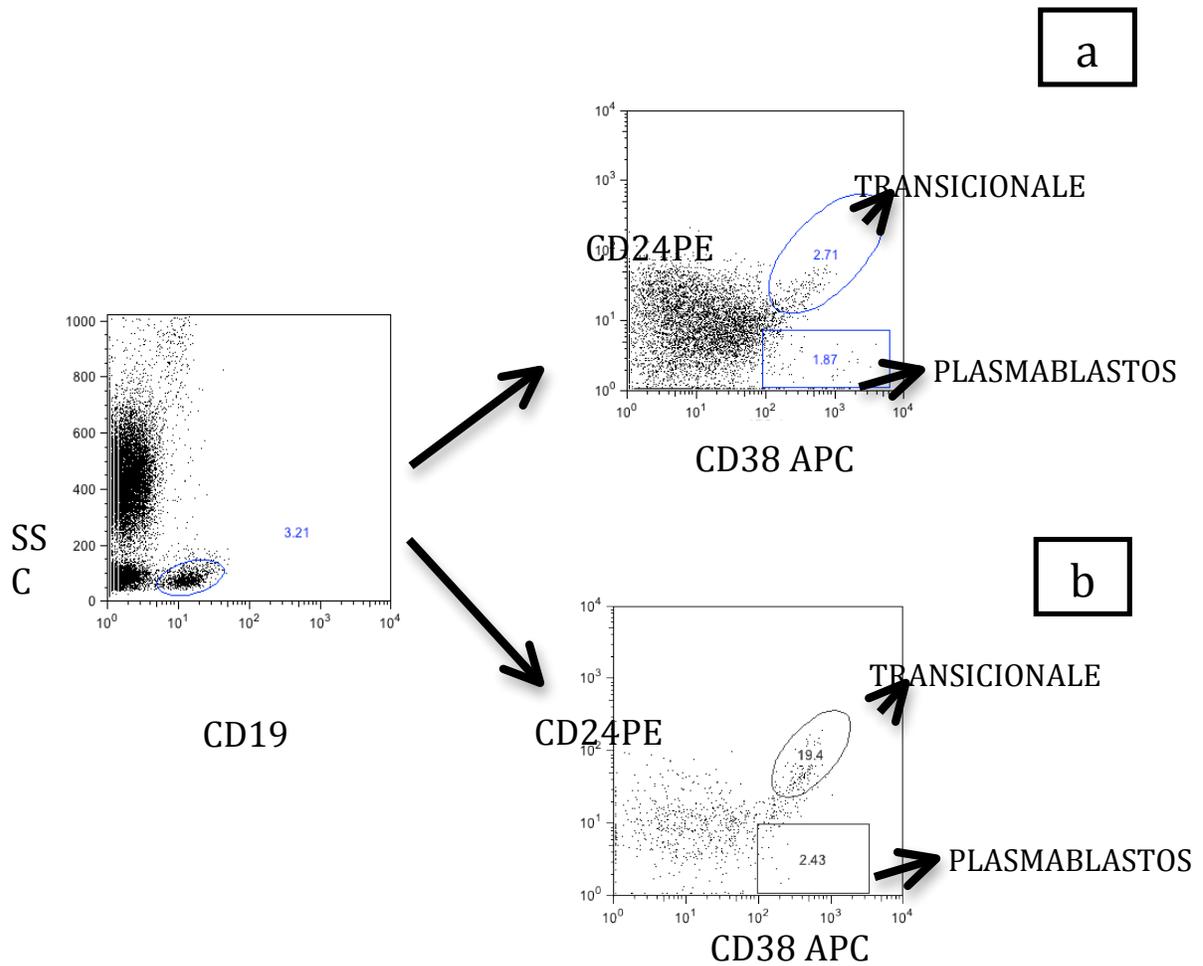


Figura 9 Subpoblaciones de células B, células transicionales y plasmablastos. Fig a) se observan el análisis del testigo y en la fig. b se encuentra el análisis de un paciente

Se calcularon los valores absolutos de las subpoblaciones de células B: células B naive, células B de memoria con cambio de isotipo, células B de memoria sin cambio de isotipo, células B transicionales y plasmablastos de pacientes menores de 18 años (tabla 18), pacientes adultos (tabla 20) y sus testigos (tabla 19 y 21).

Tabla 18 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en pacientes niños y jóvenes.

No. Paciente	Sexo	Edad	CD19 Células/mm ³	Naive Células/mm ³	Memoria s/ c Células/mm ³	Memoria c/cambio Células/mm ³	Transicionales Células/mm ³	Plasmablastos Células/mm ³
1	M	7	419	402	13	0.5	0.8	0.8
2	F	9	60	40	15	3	1	1
3	F	9	70	49	4	0.3	0.4	12
4	F	9	104	90	2	0	3	20
5	F	9	186	125	41	13	0	0
6	F	10	156	140	3	0.3	0.6	60
7	M	11	624	587	15	3	6	37
8	F	14	315	306	6	0.3	0.3	3
9	F	16	46	35	11	0	0.9	6
10	M	17	174	86	31	45	9	2

Tabla 19 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en testigos niños y jóvenes.

no. Testigo	Sexo	Edad	CD19 Células/mm ³	Naive Células/mm ³	Memoria s/ c Células/mm ³	Memoria c/cambio Células/mm ³	Transicionales Células/mm ³	Plasmablastos Células/mm ³
1	M	9	420	269	50	67	8	3
2	M	11	695	605	42	35	42	2
3	M	12	262	147	42	52	13	2
4	F	12	200	114	24	48	1	0.8
5	M	15	270	230	8	22	5	0.5
6	M	11	191	160	13	12	19	2
7	F	11	350	207	70	60	14	4
8	m	11	832	674	75	67	50	3
9	M	17	213	123	51	34	4	1
10	F	9	415	278	66	54	50	2
11	F	9	243	170	29	32	0.7	7
12	M	10	167	124	28	10	12	0.5
13	F	10	288	156	43	78	17	1
14	M	11	219	153	20	37	ND	ND
15	F	14	149	89	11	37	ND	ND
16	F	11	282	133	48	85	ND	ND
17	F	12	245	162	25	44	ND	ND
18	F	13	300	179	43	45	ND	ND
19	M	18	150	103	7	21	ND	ND
20	F	16	126	99	10	11	ND	ND

ND no hay datos.

Tabla 20 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en pacientes adultos.

No. Paciente	Sexo	Edad	CD19 Células/mm ³	Naive Células/mm ³	Memoria s/ c Células/mm ³	Memoria c/cambio Células/mm ³	Transicionales Células/mm ³	Plasmablastos Células/mm ³
11	F	18	44	43	0.2	0	1	3
12	F	20	91	38	23	5	1	0
13	M	20	198	168	0.7	1	3	0
14	M	22	190	141	23	10	2	1
15	M	31	53	48	2	1	2	1
16	F	39	128	10	13	3	0	0
17	F	43	35	33	3	0	21	1
18	F	48	1157	1064	23	23	10	81
19	F	54	510	469	15	10	2	26
20	M	66	267	230	6	14	3	1

Tabla 21 Valores absolutos de subpoblaciones de células B en testigos adultos.

no. Testigo	Sexo	Edad	CD19 Células/mm ³	Naive Células/mm ³	Memoria s/ c Células/mm ³	Memoria c/cambio Células/mm ³	Transicionales Células/mm ³	Plasmablastos Células/mm ³
1	M	25	158	87	22	35	0.2	2
2	M	40	210	109	27	46	0.2	0.2
3	M	26	228	123	25	55	4	0.2
4	F	24	120	66	23	25	2	0.2
5	M	30	294	188	27	68	6	1
6	F	28	240	110	38	41	1	3
7	F	25	232	181	19	28	16	1
8	F	20	239	158	12	57	5	2
9	F	33	266	122	64	67	2	11
10	M	25	260	127	36	62	2	3
11	M	40	356	224	43	57	2	18
12	M	38	343	271	41	21	14	7
13	M	35	146	101	26	16	3	0
14	F	40	130	82	34	16	4	2
15	F	38	401	273	44	64	8	4
16	F	36	251	168	25	43	18	3
17	F	33	630	441	63	95	3	10
18	F	30	243	148	15	41	2	7
19	F	20	251	90	12	100	10	8
20	F	23	238	164	38	21	0	1

Con los resultados anteriores se realizó la prueba estadística para datos no paramétricos Mann-Whitney, haciendo una comparación entre testigos y los grupos de pacientes de cada una de las subpoblaciones de células B (figura 10-14).

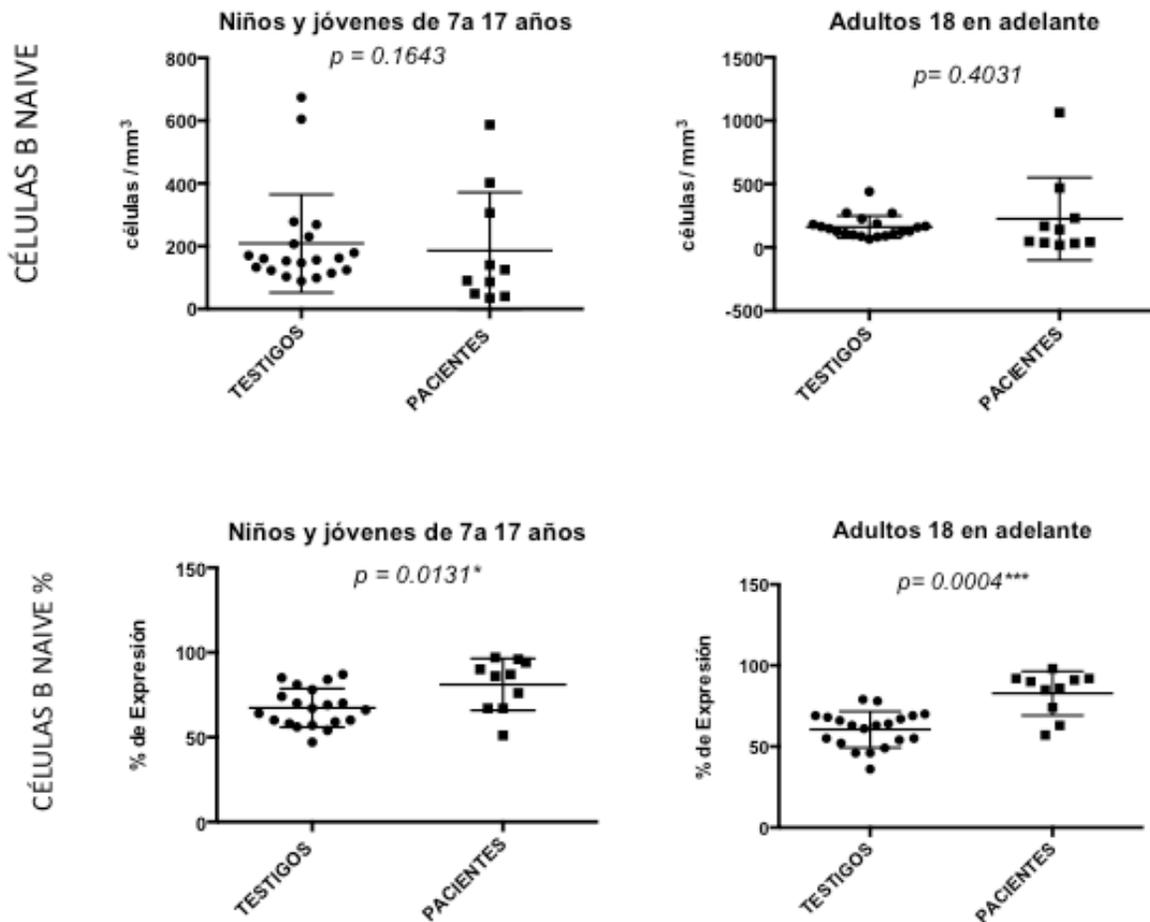


Figura 10 Gráficas de células B naive CD19⁺ CD27-IgD⁺ expresados en valores absolutos y %. Subpoblaciones de linfocitos B en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=20 y en pacientes n= 10.

Se observó una diferencia significativa en las células B naive en el grupo pacientes niños y jóvenes y en el de adultos de 0.0131 y 0.0004 respectivamente (figura 10),

sin embargo solo se observó un aumento de estas células en porcentaje ya que en números absolutos no hay diferencia significativa. Se esperaba un aumento en las células B Naive como mecanismo de compensación por la falta de células B de memoria, sin embargo se sabe que estas tienen una vida media por lo que al no ser activadas entran en apoptosis (Vale y cols., 2010).

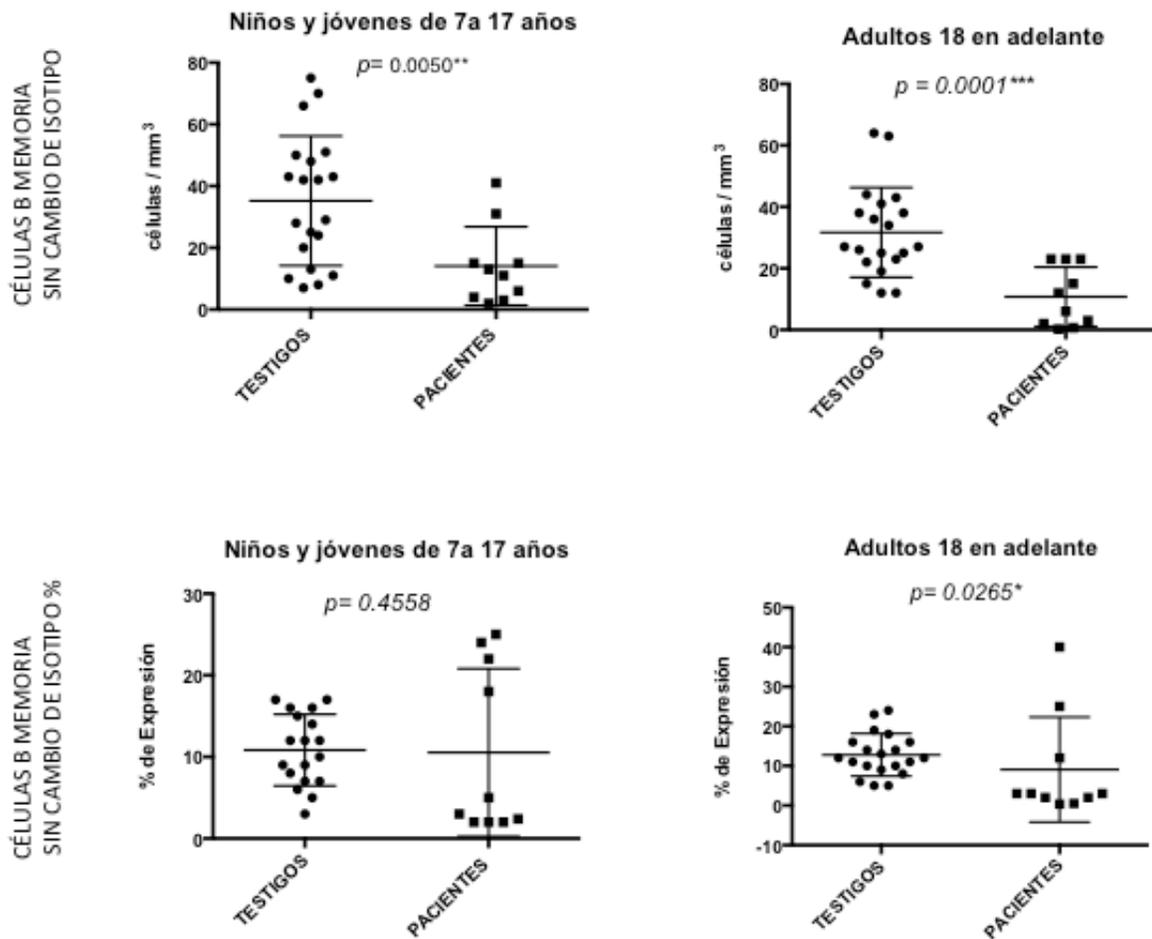


Figura 11 Gráficas de células B memoria sin cambio de isotipo CD19⁺CD27⁺IgD⁺ expresados en valores absolutos y % en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=20 y en pacientes n= 10.

Las células B memoria sin cambio de isotipo presentaron una disminución de números absolutos en el grupo de los pacientes niños y jóvenes así como en el grupo de adultos con una diferencia significativa de 0.0050 y 0.0001

respectivamente (figura 11), así mismo los pacientes adultos presentaron una disminución en el porcentaje de expresión con una diferencia significativa de 0.0265 lo que sugiere que hay un problema en la hipermutación somática.

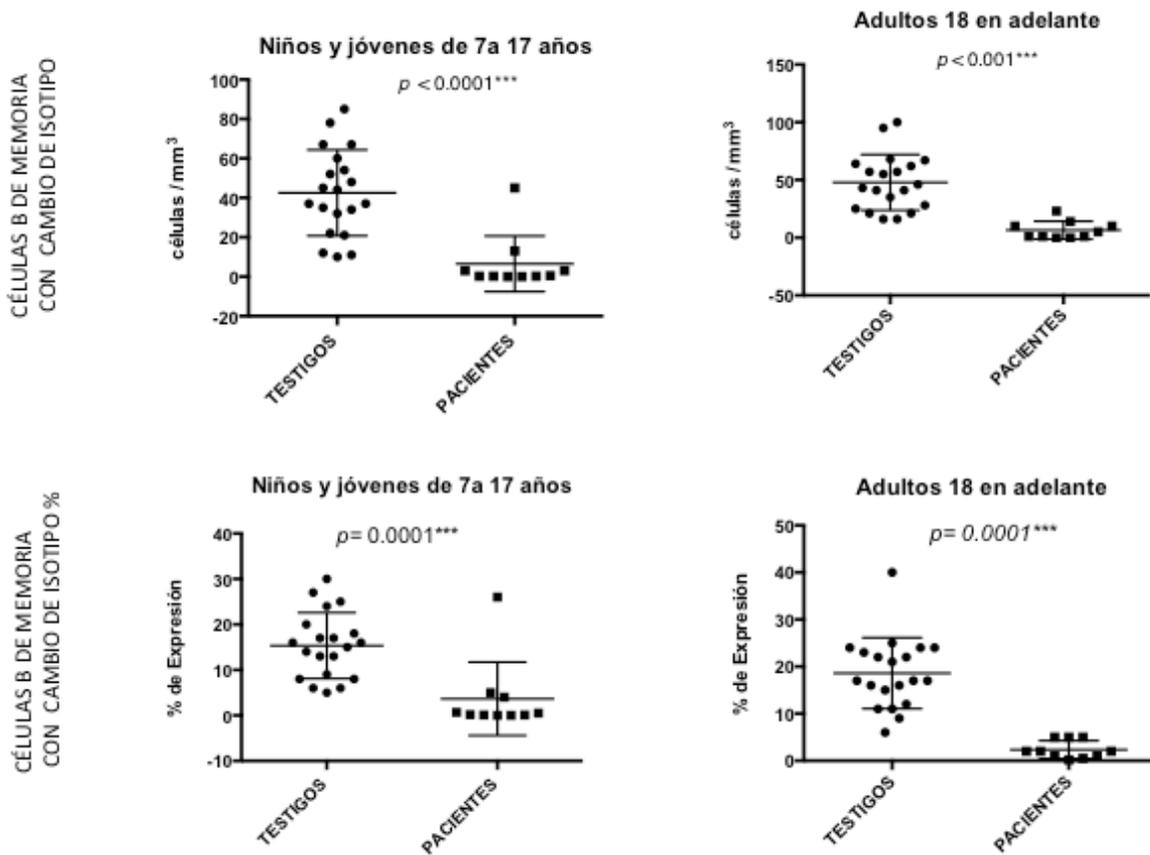


Figura 12 Gráficas de células B memoria con cambio de isotipo CD19⁺CD27⁺IgD⁻ expresados en valores absolutos y en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=20 y en pacientes n= 10.

Las células B de memoria con cambio de isotipo fue la subpoblación que presento una mayor disminución de células tanto en números absolutos como en porcentaje de expresión en ambos grupo, con una diferencia significativa de 0.0001 en todos

los casos, siendo esta una de las principales características de los pacientes con COVID, indicando un problema en el centro germinal.

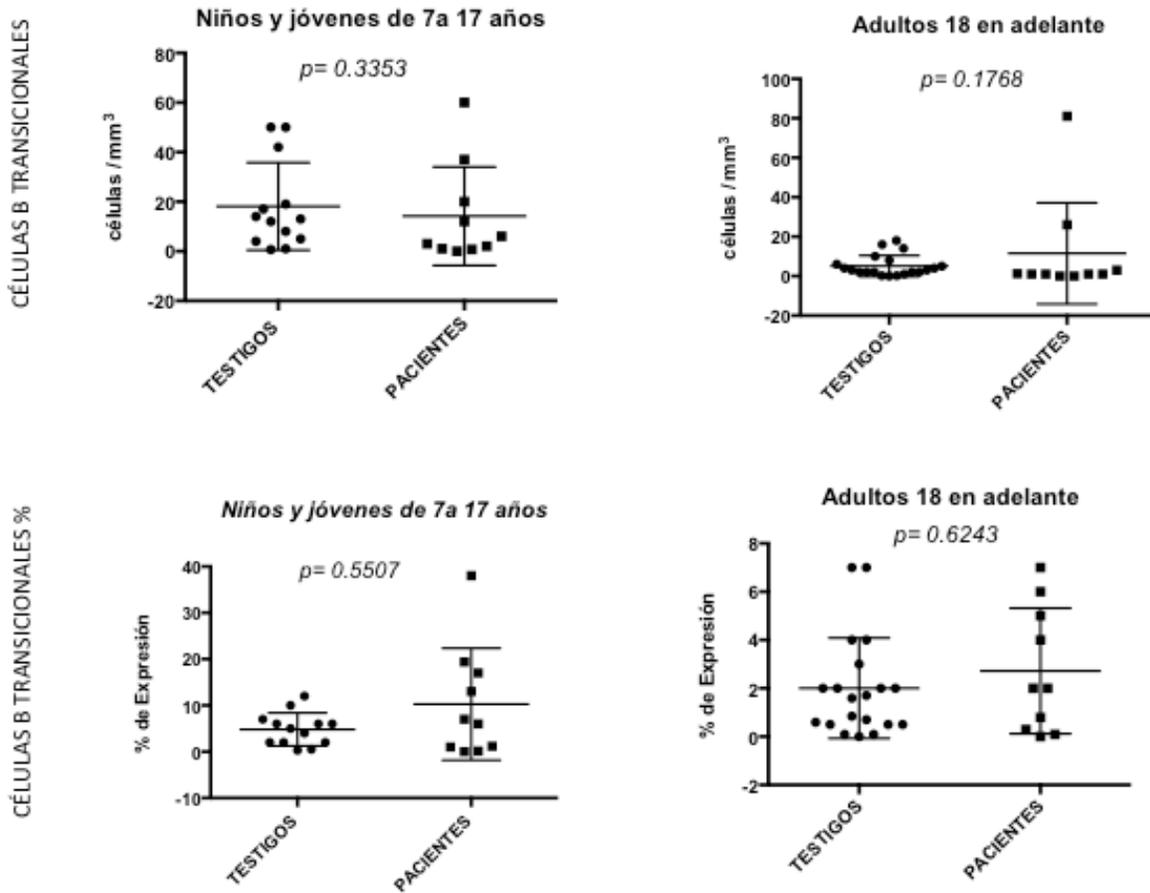


Figura 13 Gráficas de células B transicionales (CD19⁺ CD24⁺ CD38⁺⁺) expresados en valores absolutos y % en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=23 y en pacientes n= 10.

Se obtuvieron valores ligeramente por arriba de los valores en testigos, sin embargo no presentaron diferencia significativa en ninguno de los grupos (figura 13), lo que indica que esta población no se ve alterada.

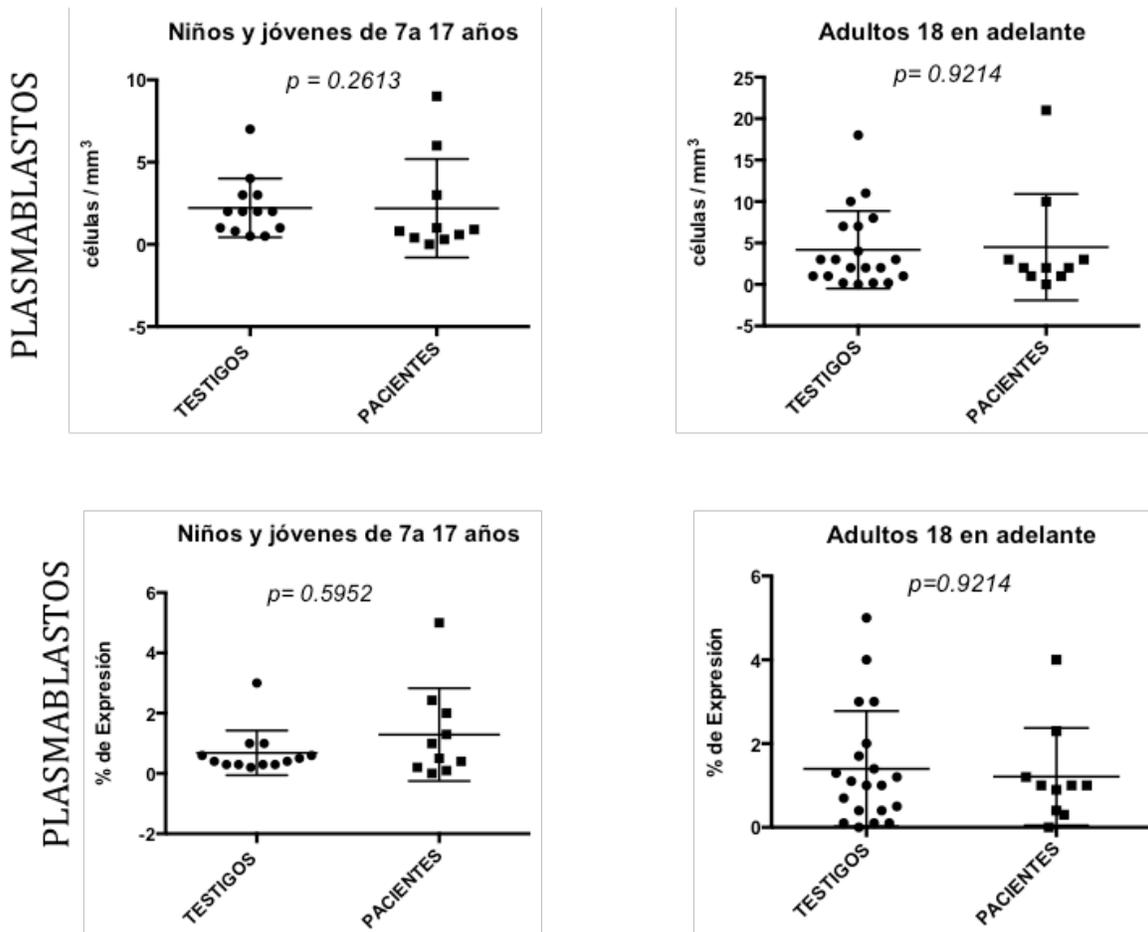


Figura 14 Gráficas plasmablastos (CD19+CD24-CD38++) en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=13 y en pacientes n= 10,

Al igual que las células B transicionales los plasmablastos tampoco presentaron diferencia significativa en relación con los testigos en ambos grupos (Figura 14). Estos pacientes no presentan alteraciones con las células B transicionales ni con los plasmablastos.

Partiendo también de una región CD19FITC, se analizaron la células B CD21^{low} (CD19⁺CD21^{LOW}CD38^{LOW}), se utilizó la siguiente combinación CD19FITC, CD21PE y CD38APC (figura 15).

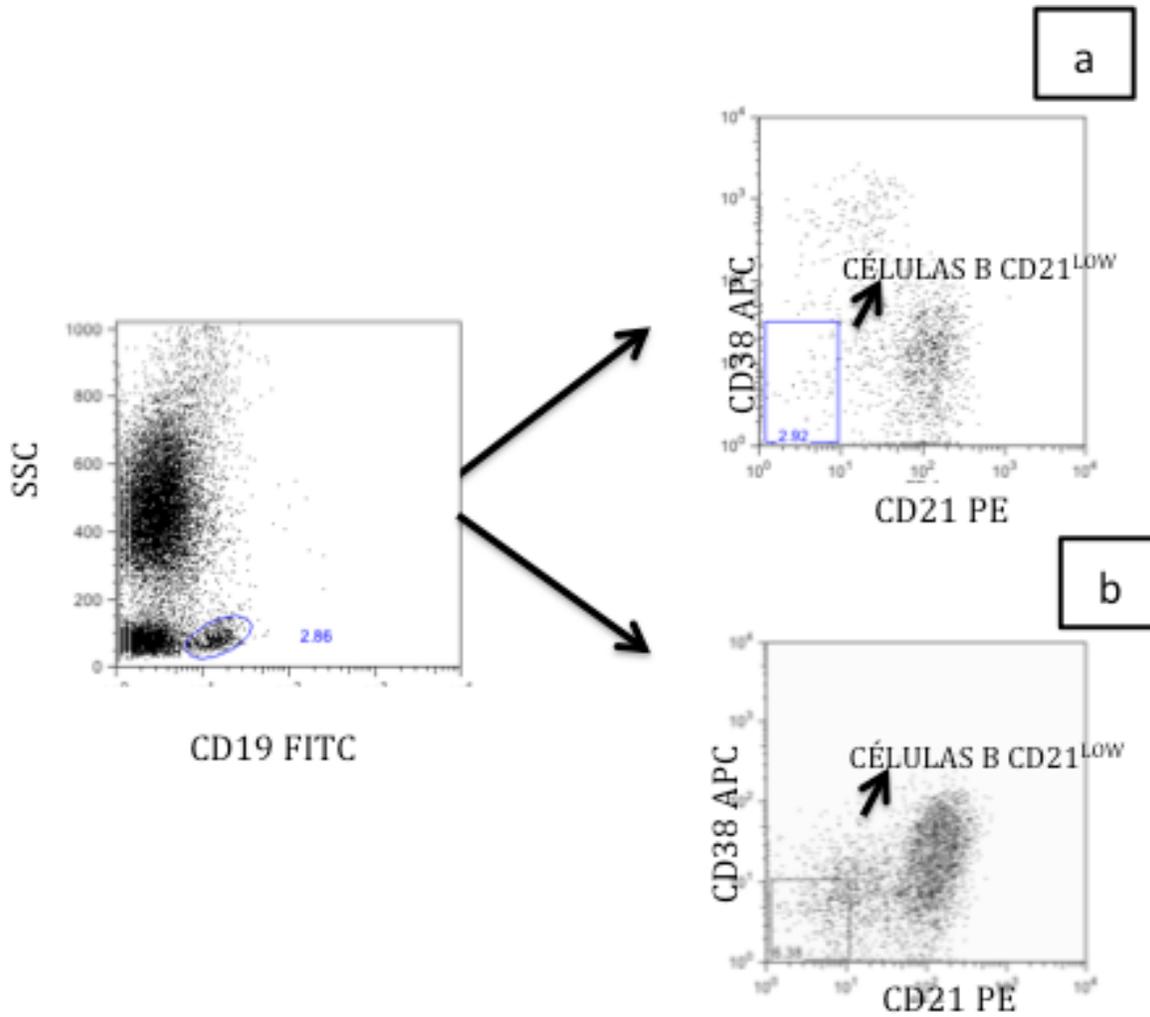


Figura 15 Poblaciones de células B CD21^{low}. En la fig. a podemos ver las células B CD21^{low} de un testigo y en la fig. b las del paciente.

Se calcularon los valores absolutos de las células CD21^{low} tanto en pacientes niños y jóvenes como en adultos (tabla 22 y 24) como en testigos (tabla 23 y 25).

Tabla 22 Valores absolutos y relativos de células B CD21^{low} de pacientes niños y jóvenes

No. Paciente	CD21 ^{low} %	CD21 ^{low} células/mm ³
1	4	17
2	3	2
3	22	15
4	9	9
5	9	17
6	27	42
7	27	168
8	0.5	2
9	15	7
10	1.4	2

Tabla 23 Valores absolutos y relativos de células B CD21^{low} de testigos niños y jóvenes

No. Testigo	CD21 ^{low} %	CD21 ^{low} células/mm ³
1	4	29
2	4	33
3	8	33
4	17	31
5	4	12
6	4	12
7	9	22
8	3	6
9	0.5	3
10	4	22

Tabla 24 Valores absolutos y relativos de células B CD21^{low} de pacientes adultos

No. Paciente	CD21 ^{low} 0%	CD21 ^{low} Células/mm ³
11	0.8	0.3
12	15	14
13	3	6
14	4	8
15	22	12
16	12	9
17	21	7
18	1	23
19	7	35
20	1	3

Tabla 25 Valores absolutos y relativos de células B CD21^{low} de testigos adultos

TESTIGO	CD21 ^{low} 0%	CD21 ^{low} células/mm ³
1	0.3	1
2	4	10
3	6	14
5	3	5
6	3	6
7	7	16
8	3	4
10	4	10
11	5	13
13	3	19
14	10	26
15	6	21
16	3	10
17	11	16
18	6	9
19	5	20
20	1	3

Con los resultados anteriores se realizó la prueba estadística para datos no paramétricos Mann-Whitney, haciendo una comparación entre testigos y los grupos de pacientes de cada una de las subpoblaciones de células B CD21^{low} (figura 16).

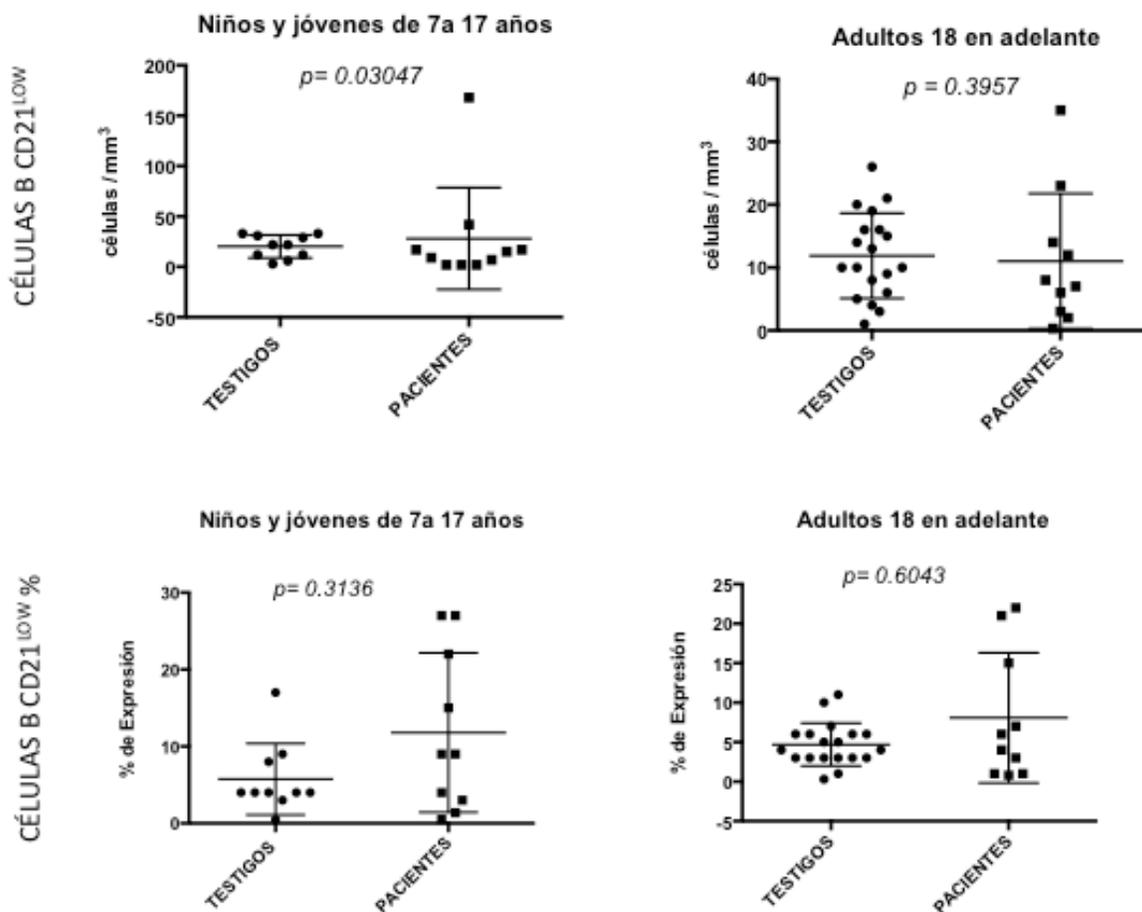


Figura 16 Gráficas de células B CD21^{low} CD19⁺CD21^{LOW}CD38^{LOW} en los dos grupos estudiados niños y jóvenes, adultos. Donde (*) = Nivel significancia, obtenido por el estudio de Mann Whitney. Testigos n=10 y en pacientes n= 10

Las células CD21^{low} no presentaron diferencia significativa en relación con sus testigos pareados por edad. Este es un criterio importante en la clasificación de COVID ya que se ha relacionado con predisposición a presentar enfermedades

autoinmunes, sin embargo todos los pacientes en conjunto no presentan una diferencia significativa.

Considerando los valores de CD21^{low}, los valores de CD19 y el % células B de memoria en linfocitos totales obtenidos, y basándonos en la clasificación de Freiburg establecida por Warnatz y colaboradores (2002), se clasificó a todos los pacientes (Tabla 26) sin considerar edades en los siguientes grupos:

Tabla 26 Clasificación de Freiburg de los pacientes estudiados.

No. Paciente	% Células B	% Células B de memoria en LT	% Células B CD21 low	CLAS. WARNATZ
1	16	0.016	4	1B
2	9	0.5	3	2
3	3	0.003	22	1A
4	5	0	9	1B
5	12	0.084	9	1B
6	4	0.008	27	1A
7	25	0.125	27	1A
8	7	0.0007	0.5	1B
9	17	4	1.4	2
10	5	0	15	1B
11	2	0.004	0.8	1B
12	39	1.95	15	2
13	17	0.085	3	1B
14	16	0.8	4	2
15	5	0.05	22	1A
16	10	0.2	62	1B
17	3	0.03	21	1A
18	33	0.66	1	2
19	20	0.2	7	1B
20	6	0.3	1	1B

Una vez clasificados los pacientes se realizó una comparación de sus células B totales, células B de memoria total y células B CD21^{low} (figura 17-19).

Como se observa en la figura 17 los pacientes pertenecientes al grupo Ia y Ib tiene una menor cantidad de células B, los pacientes del grupo II presentan un ligero aumento en comparación con los testigos.

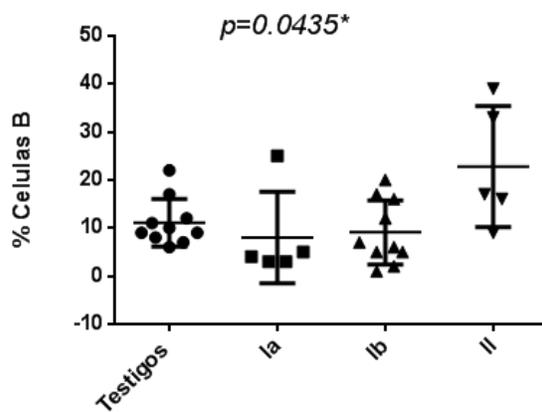


Figura 17 Grafica de % de células B en los diferentes grupos de acuerdo a la clasificación de Freiburg. El análisis se realizó con la prueba estadística Kruskal-willis.

La clasificación de Freiburg propone dos grupos de acuerdo a las células B de memoria de los pacientes, el grupo I se subdivide en relación con el % de células B CD21^{low}

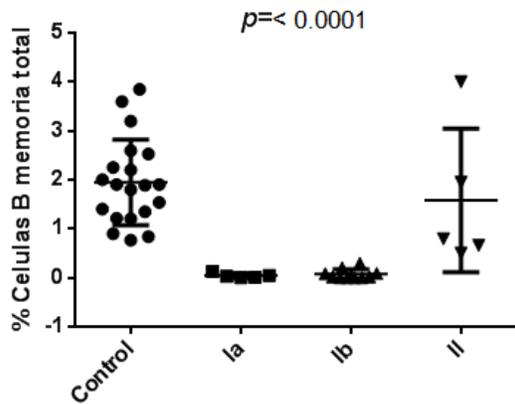


Figura 18 Grafica de % de células B de memoria en los diferentes grupos de acuerdo a la clasificación de Freiburg. El análisis se realizó con la prueba estadística Kruskal-Willis

En la figura 18 se observa una marcada disminución del % de las células B de memoria en linfocitos totales en los grupos Ia y Ib en comparación con los pacientes pertenecientes al grupo II.

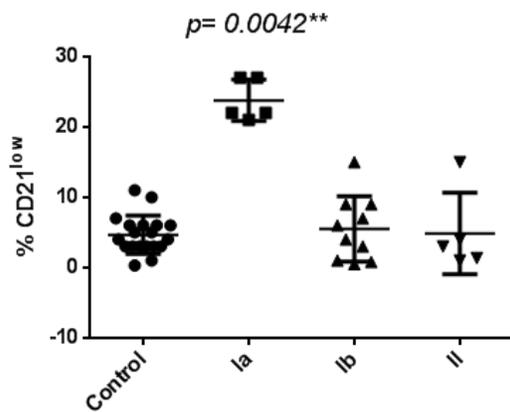


Figura 19 Grafica de % de células B CD21^{low} en los diferentes grupos de acuerdo a la clasificación de Freiburg. El análisis se realizó con la prueba estadística Kruskal-Willis

El subgrupo Ia de la clasificación de Freiburg fue el grupo que presentó un mayor número de células CD21^{low} en comparación con los otros dos grupos (figura 19).

Al relacionarlos con su historial clínico observamos que los pacientes del grupo I de la clasificación de Freiburg presentan más casos de esplenomegalia, neumonías, infecciones de las vías respiratorias, otitis, sinusitis, diarrea, infecciones de las vías urinarias, hepatomegalias, bronquiectasias, granulomas, gastroenteritis por infección (GEPI) y enfermedades autoinmunes (figura 20).

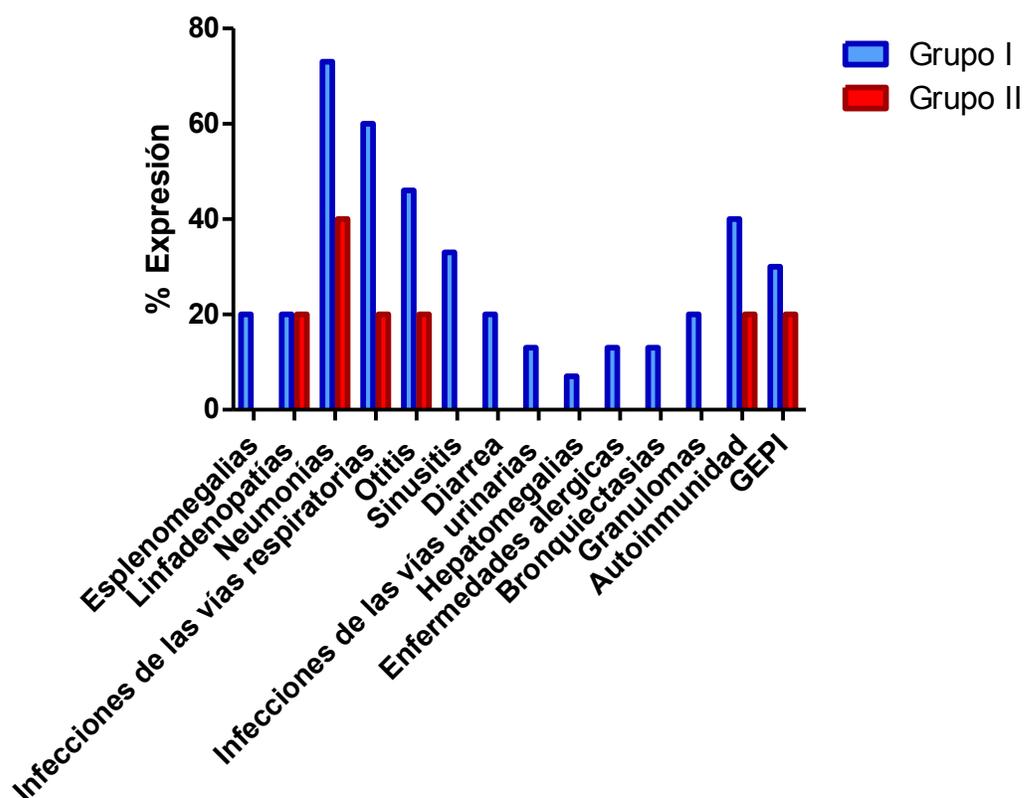


Figura 20. Gráfica de las características clínicas. De los grupos I y II de Warnatz acuerdo a la clasificación de Freiburg.

Al separar el grupo Ia y Ib se observó que el grupo Ia presenta más casos de linfadenopatías, neumonías, infecciones de las vías respiratorias, diarrea y enfermedades autoinmunes (figura 21).

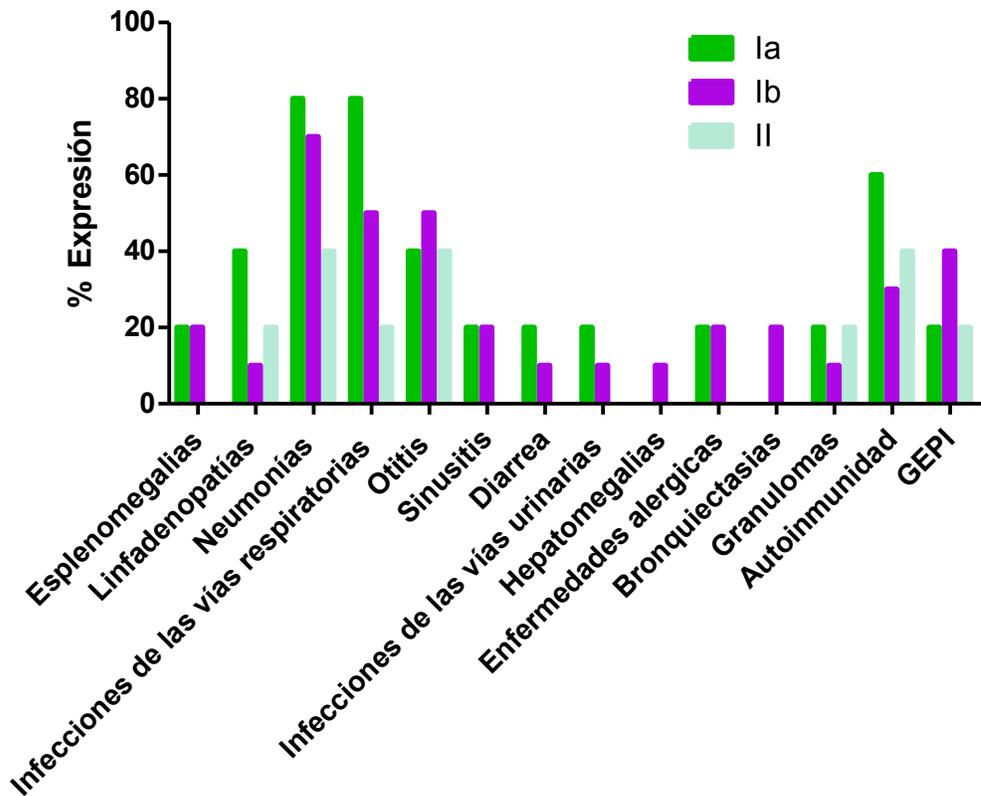


Figura 21 Clasificación clínica de acuerdo a la clasificación de Freiburg.

VII. Análisis y discusión de resultados

Los pacientes con inmunodeficiencia común variable presentan un grupo heterogéneo de diversas enfermedades, las cuales se conoce son el resultado de diversos mecanismos inmunopatológicos. El nivel de heterogeneidad inmunológica se ha descrito principalmente en términos de anormalidades en los diferentes subtipos de células B en diversos pacientes (Driessen y cols., 2011).

La mayor parte de los estudios realizados en pacientes con CVID es en adultos, debido a que esta enfermedad se manifiesta generalmente en la tercer década de vida (Yong y cols. 2010), sin embargo, existen diferencias inmunológicas entre pacientes adultos y niños debido a que la maduración del sistema inmune influye en el impacto de las mutaciones genéticas así como en las manifestaciones clínicas, ya que los niños tienen un sistema inmune más inmaduro que los adultos.

Al efectuar el estudio de las poblaciones leucocitarias observamos que tanto los pacientes jóvenes como los adultos tienen niveles normales de Leucocitos y neutrófilos ; en el caso de los monocitos sólo los pacientes adultos muestran una diferencia significativa de 0.0184 en comparación con los donadores sanos; los cuales en cada caso fueron pareados por edad figura 6b. En la CVID se han observado defectos tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, dentro de la inmunidad innata se han reportado anormalidades en el linaje de los monocitos asociadas con la desregulación de la producción de citocinas, Cambroner y colaboradores reportaron en el 2002 un grupo de monocitos con anormalidades en el eje IL-12-IFN γ lo que a su vez afecta la síntesis de anticuerpos ya que el aumento en la producción de IFN γ en las células T CD4⁺ aleja las células del perfil Th2 necesario para la producción de anticuerpos (Cambroner y cols., 2000), esto podría ser investigado en el futuro como causa de la desregulación inmune en pacientes mexicanos, este estudio se enfocó solo en la caracterización fenotípica y no se midieron citocinas.

Al analizar las poblaciones de linfocitos se observó una diferencia significativa de 0.0001 en los niveles de linfocitos NK (Figura 7D). Las células NK son un componente importante de la inmunidad innata el cromosoma 12 contiene el complejo de genes que es esencial para el funcionamiento de los linfocitos NK, se ha sugerido que el loci 12p tiene una gran susceptibilidad para estar afectado en CVID (Bayry y cols. 2005), esto es interesante porque se encontró una disminución de linfocitos NK en pacientes con CVID; la deficiencia de linfocitos NK puede afectar el funcionamiento de otros compartimentos del sistema inmune, además puede comprometer la vigilancia inmunológica contra tumores y la protección a la infección viral (Bayry y cols. 2005), sin embargo, no se han reportado consecuencias clínicas evidentes relacionadas con la disminución de linfocitos NK en pacientes con CVID razón por la cual no hay mayor información al respecto.

Se han observado anormalidades en las células T en varios pacientes con CVID como en el caso de los linfocitos T CD4⁺ en adultos donde se observó una diferencia significativa de 0.0001 (Figura 7 b); en el caso de los linfocitos T CD8⁺ no se observó diferencia significativa en ninguno de los grupos (Figura 7 c), existen varias propuestas de la disminución de los linfocitos T CD4⁺, entre ellas que la reconstitución de células T CD4⁺ es más lenta y depende de la salida del timo, así mismo la capacidad regenerativa de las células T CD4⁺ también se reduce por la propensión de estas para someterse a apoptosis, así como por una expansión intrínsecamente limitada en respuesta a la estimulación antigénica (Giovannetti y cols., 2007). En contraste con las células T CD4⁺ en algunos de nuestros pacientes tabla 16 y 17 las células T CD8⁺ se ven numéricamente aumentadas, explicando así la relación invertida CD4/CD8 de células T observada en pacientes con CVID. Estas alteraciones de las células T CD8⁺ pueden estar asociadas con una alteración en la secreción de citocinas, a un número disminuido de células B de memoria (Salzerycols., 2012). Giovannetti y colaboradores en el 2007 propusieron que el nivel

de células T CD4⁺ naive como un parámetro importante para la clasificación de estos pacientes, ya que estos presentaron una clara disminución de estas células. Por lo tanto los hallazgos en este trabajo de investigación concuerdan con lo reportado en otras investigaciones acerca de defectos en la inmunidad celular presentada en pacientes con COVID.

En el caso de Linfocitos B CD19⁺ en ambos grupos se observó una disminución de estas células con una diferencia significativa mayor en los pacientes adultos. Las causas de esta disminución pueden variar dependiendo principalmente de la subpoblación que se encuentre disminuida, afectando así el número total de linfocitos B.

Varios estudios indican un funcionamiento alterado de los linfocitos B en pacientes con COVID, incluyendo etapas tempranas y tardías de diferenciación (Bayry y cols. 2005). Normalmente sólo ciertos subconjuntos de células B se pueden encontrar en la sangre periférica de adultos sanos. Por lo general, entre 50-80% de las células B circulantes pertenecen a las células CD27⁻ incluyendo células B naive y hasta 4% de células B transicionales. Las células B restantes comprenden CD27⁺IgD⁺ zona marginal (MZ)-como las células B₁ y células B con cambio de isotipo CD27⁺IgD⁻ (Rakmanov y cols., 2009). Esta homeostasis en las células B periféricas se ve gravemente alterada en pacientes con inmunodeficiencia común variable como se pudo ver en los resultados obtenidos ya que tanto pacientes jóvenes como adultos tenían aumentadas la población de células B naive con una diferencia significativa de 0.0131 y 0.0064 respectivamente (figura 10) defectos en BAFF-R y TACI pueden evitar el cambio de isotipo en células B naive (Vale y cols., 2010), ocasionando un aumento en el número de células B naive en circulación.

Por consiguiente, se observó una disminución en las células B de memoria en pacientes jóvenes y adultos en comparación con los controles sanos pareados por edad, encontrándose diferencias significativas en las células B de memoria sin

cambio de isotipo (figura 11) y en las células B de memoria con cambio de isotipo (figura 12). Las células B de memoria disminuidas apuntan hacia una mala reacción del centro germinal en los órganos linfoides secundarios en la mayoría de los pacientes de CVID, existen muchas causas reportadas que explican un mal funcionamiento en centros germinales, mutaciones en el gen CD40L, defectos en la familia del factor de necrosis tumoral α (TNF α) así como en sus receptores, una expresión impar en moléculas co-estimuladoras como CD86, todo lo anterior interfiere de una manera importante en las interacciones dentro del GC (Warnatz y cols., 2002). Esto es confirmado por la disminución de células B de memoria con cambio de isotipo indicando un problema en la hipermutación somática (Salzer y cols., 2012); la hipermutación somática es esencial para la generación de anticuerpos de alta afinidad (Bayry y cols., 2005), lo que puede ser la causa de la disminución de inmunoglobulinas séricas en estos pacientes (tabla 8 y 9). El grupo de niños y jóvenes presentó una diferencia significativa de 0.0050 menor a la presentada en adultos que fue de 0.001 lo que se refleja en menores casos de neumonías, e infecciones en las vías respiratorias (tabla 7).

En el caso de las células B transicionales y los plasmablastos se encontraron en valores normales en comparación con los testigos (Figuras 14 y 15), lo que indica que los pacientes estudiados no presentan alteraciones, en contraste con lo reportado por otros grupos como el de Wehr y colaboradores (2008) quienes encontraron un grupo de pacientes con células B transicionales elevadas las cuales relacionaron con un mayor caso de linfadenopatías.

En general los pacientes pertenecientes al grupo de niños y jóvenes como el de adultos presentaron las mismas alteraciones en poblaciones de linfocitarias, en especial en las subpoblaciones de linfocitos B, sin embargo, el primer grupo de pacientes estudiados presentó menos alterados estos valores lo que se reflejó en sus manifestaciones clínicas debido a lo progresivo de la enfermedad.

Como se observó en los pacientes estudiados con CVID, las células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo se encuentran disminuidas (Figuras 11 y 12). Como se mencionó anteriormente este criterio es la base de las clasificaciones actuales en pacientes con CVID realizadas en pacientes europeos, por lo que también es un criterio aplicable en pacientes mexicanos.

Los pacientes con un porcentaje menor a 0.4% de células B de memoria en la población de linfocitos totales se clasificaron en el Grupo I (Tabla 26). Una característica relevante en estos pacientes fue la alta prevalencia de la diarrea crónica y un mayor número de episodios de neumonía en comparación con los pacientes con niveles normales de células B de memoria (Figura 21). Las células B de memoria se someten a hipermutación somática y generan inmunoglobulinas durante una respuesta inmune secundaria; su ausencia en algunos pacientes con CVID puede explicar en parte la mayor prevalencia de las infecciones observadas en los pacientes en el Grupo I (Figura 21) (Berron y cols., 2013). Carsetti y cols. sugieren que las células B de memoria son críticas para la defensa contra bacterias encapsuladas como *streptococcus pneumoniae*, una de las principales causantes de neumonías, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestros pacientes. Como se mencionó anteriormente el aparato gastrointestinal es el segundo más afectado en pacientes con CVID, lo cual se observó en los pacientes con menor número de células B como son los pertenecientes al grupo I (Figura 21).

A su vez el grupo I se subdividió en tipo a y b de acuerdo a la cantidad de células CD19⁺ CD21⁻, los pacientes del subgrupo Ia presentan una mayor cantidad de células CD21^{low} (CD19⁺ CD21⁻) así como células B de memoria (CD19⁺, CD27⁺, IgD⁻) disminuidas, por lo que estos pacientes además de presentar mayor número de episodios de neumonía y diarrea crónica como todos los pacientes pertenecientes al grupo I presentan enfermedades de tipo autoinmune observándose en el 60% de los pacientes en este grupo (Figura 21).

En la figura 19 podemos observar que los testigos no expresan más del 20% de células CD21^{low} al igual que los pacientes del subgrupo Ib y grupo II, sin embargo los pacientes del subgrupo Ia tienen células CD21^{low} por arriba del 20%. Por lo que se puede relacionar un aumento en células CD21^{low} con la autoinmunidad presentada en los pacientes analizados, como se ha visto en estudios anteriores que los pacientes afectados con CVID tienen una mayor capacidad de producir anticuerpos contra antígenos propios, a pesar de la incapacidad para producir los niveles adecuados de anticuerpos frente a antígenos bacterianos o virales (Piatosa y cols., 2013).

Las células CD21^{low} han sido reportadas previamente como un subtipo de células B anérgicas, policlonales, pre-activadas con un preferente enriquecimiento en tejidos periféricos las cuales tienen la capacidad de migrar a sitios de inflamación (Rakhmanov y cols., 2009).

Otros estudios (Wehr y cols, 2008) han asociado una expansión de células transicionales con linfadenopatías, citopenias autoinmunes y plasmablastos reducidos, a diferencia de esos estudios en nuestros pacientes tanto las células transicionales como los plasmablastos se encontraron normales en relación a los testigos utilizados. Por lo que se puede decir que la relación entre el defecto en el proceso de maduración de células B y autoinmunidad no está claro, pero los defectos similares en pacientes asplénicos puede indicar que el bazo de los pacientes con CVID proporciona un entorno inadecuado para el control eficaz de la población (Piatosa y cols., 2013).

Los pacientes del subgrupo Ib presentan también una baja cantidad de células B de memoria al igual que los pacientes del grupo 1a como se ve en la figura 17, presentan poca memoria con cambio y sin cambio de isotipo lo que sugiere también defectos en el proceso de hipermutación somática. (Warnatz y cols., 2002)

En el caso de los pacientes pertenecientes al grupo II se observaron células B de memoria prácticamente iguales a los controles sanos (figura 18), inclusive se observa ligeramente aumentado el porcentaje de células B en comparación con los testigos, probablemente estos pacientes presentan un centro germinal normal pero tienen algún problema en la síntesis de anticuerpos (Warnatz y cols. ,2002). La hipogammaglobulinemia en este grupo se puede deber a un problema en la diferenciación terminal de células plasmáticas como consecuencia de una señalización alterada CD27-CD70, un homing perturbado de precursores de células plasmáticas, o una menor esperanza de vida de las células plasmáticas en vivo (Warnatz y cols.,2002) (Bayry, y cols., 2005), los pacientes de este grupo no presentan esplenomegalia, sinusitis, diarrea, infecciones de las vías urinarias, bronquiectasias ni granulomas, presentan un menor número de episodios de neumonía, sinusitis y gastroenteritis.

Con base a los resultados obtenidos se puede decir que la clasificación de Freiburg propuesta por Warnatz y cols. también es aplicable en los pacientes mexicanos incluidos en este estudio con CVID ya que los pertenecientes al grupo Ia tienen disminuidas sus células B de memoria (CD19+,CD27+, IgD-) al igual que un alto porcentaje de las células B (CD21-), mostrando mayor predisposición a presentar enfermedades autoinmunes. Así mismo se puede afirmar que la cuantificación de las subpoblaciones de células B es un método útil para distinguir entre los diferentes fenotipos clínicos de los pacientes con CVID.

VIII. Conclusiones

- Los pacientes con CVID presentan una disminución en linfocitos T cooperadores , linfocitos NK tanto en adultos como en niños. Se encontró una disminución de los linfocitos T CD3+/CD4+.
- Las poblaciones de células B tanto en el grupo de niños y jóvenes como el de adultos se encuentran disminuidas.
- Las subpoblaciones de células B de memoria se encuentran disminuidas en todos los pacientes al igual que en estudios realizados en Europa con pacientes CVID.
- Tanto el grupo de niños y jóvenes como el de adultos tienen una disminución significativa en sus células B de memoria con cambio de isotipo, como sin cambio de isotipo.
- Por lo anterior fue posible aplicar la clasificación de Freiburg encontrándose que los pacientes del grupo 1a y 1b son tienen una disminución en el porcentaje de sus células B; mientras los pacientes del grupo 2 tienen un porcentaje normal.
- Los pacientes del grupo 1 tienen un porcentaje mayor en eventos de neumonías, otitis, GEPI, Sinusitis, complicaciones autoinmunes y esplenomegalias; comparándolos con el grupo 2.
- Los pacientes pertenecientes al grupo 1 de la clasificación de Freiburg tiene un fenotipo clínico más grave que los pacientes del grupo 2.
- Por último, los pacientes con CVID que presentan un mayor porcentaje de enfermedades autoinmunes se encuentran en el grupo 1a.
- La evaluación de las poblaciones leucocitarias, como subpoblaciones de células B, así como una clasificación fenotípica y clínica aportan nuevos datos acerca de la inmunidad humoral en esta patología en pacientes mexicanos.

X. Anexo 1

Diagnostico diferencial de hipogammaglobulinemia

- Inducida por fármacos

Agentes antipalúdicos

Captopril

Carbamazepina

Los glucocorticoides

Fenclofenaco

Las sales de oro

Penicilamina

Fenitoína

La sulfasalazina

- Trastornos genéticos

Ataxia Telangiectasia

Formas autosómicas de SCID

HyperIgM

Deficiencia de transcobalamina II y la hipogammaglobulinemia

Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

Trastorno linfoproliferativo ligado a X (EBV asociado)

SCID ligada al X

Algunos trastornos metabólicos

Las anomalías cromosómicas

Síndrome cromosoma 18q

Monosomía 22

La trisomía 8

La trisomía 21

- Enfermedades Infecciosas

VIH

Rubéola congénita

Infección congénita por CMV

Infección congénita por *Toxoplasma gondii*

Epstein-Barr Virus

- Malignidad

Leucemia linfocítica crónica

Inmunodeficiencia con timoma

El linfoma no Hodgkin

Células B malignas

- Trastornos sistémicos

Inmunodeficiencia causada por hipercatabolismo de inmunoglobulina

Inmunodeficiencia causada por la pérdida excesiva de inmunoglobulinas (nefrosis, quemaduras graves, diarrea linfangiectasia, grave).

Anexo 2

Preparación de soluciones

- PBS 10x

Para 1 litro

- NaCl 80g
- KH_2PO_4 2g
- Na_2HPO_4 anhidro 11.5g
- KCl 2g
- H_2O aforar a 1000ml
- Filtrar en membrana de 0.22

- PBS 1x

Hacer una dilución 1:10 de la solución PBS 10x

- Solución fijadora
 - Paraformaldehido 1%
- BD lysing solution 10x
 - Hacer una dilución 1x
- Liquido de turk
 - Acido acético glacial 3ml
 - Agua destilada c.b.p 100ml
 - Adicionar 1 o2 gotas azul metileno

X. Referencias

1. Abbas A, Litchman A, Pober J. Inmunología celular y molecular (Cuarta edición). Madrid: Ed. Interamericana-McGraw Hill (2002).
2. Agarwal S y Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in common variable Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009; 9: 347-352.
3. Aghamohammadi A, Abolhassani H, Eibl M, Espanol T, Kanegane H, Miyawaki T, Mohammadinejad P, Pourhamdi S, Wolf H, Parvaneh N, Herz W, Durandy A, Stiehm R, Plebani A. Primary Immunodeficiencies Diseases: Definition, diagnosis, and management. Ed Springer. Capitulo 3 pp113-122.
4. Allman D y Pillai Shiv. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 149-157
5. Arkwright P, Abinun M y Cant A. Autoimmunity in primary immunodeficiency diseases. *Blood* 2002; 99: 2694-2702.
6. Arumugakani G, Wood PM, Carter CR. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21^{low} B lymphocytes. *J Clin Immunol* 2010; 30:292-300.
7. Bayry J, Hermine O, Webster D, Lévy Y y Kaveri S. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends in molecular medicine* 2005; 11:370-376
8. Berrón-Ruiz L, Lopez-Herrera G, Vargas-Hernandez A, Mogica-Martinez E, Garcia-Latorre E, Blancas-Galicia L, Espinosa-Rosales F.J y Santos-Argumedo. Lymphocytes and B-cell abnormalities in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Allergol Immunopathol*, 2013
9. Bryan A, Calver N, Toubi E, Webster A, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56: 239-48.
10. Cambroner R, Sewell WA, North ME, Webster ADB, Farrant J. Up-regulation of IL-12 in *monocytes*: a fundamental defect in common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 2000; 164(1):488-494.
11. Carsetti R, Rosado M, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, Quinti I. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2005; 115: 412.
12. Castigli E, Wilson S, Garibay L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha R. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature Genetic* 2005; 37: 829.

13. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*. 1999;93:190-7
14. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92:34-48
15. Driessen G, Van Zelm M, Van Hagen P, Hartwig N, Trip M, Warris A, Vries E, Barendregt B, Pico I, Hop W, Van Dongen J, Van der Burg M. B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiological backgrounds in common variable immunodeficiency. *Blood*, 2011; 118: 6814-6823
16. Foerster C, Voelxen N, Rakhmanov M, et al. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2010; 184:7305-7313.
17. Gamberale R. Ontogenia B: el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad. *Revista Química Viva*, 2004; 3: 1-10
18. Geffner, J. Y Fainmbon, L. 2008. Introducción a la Inmunología Humana 5ª edición, editorial Médica Panamericana, Buenos Aires; Argentina. Pp 429-435
19. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, Felice M, Mora B, Esposito A, Carrello R, Pissuti A, Paggi M, Paganelli R, Malorni W y Aiuti. Unravelling the complexity of t cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J. Immunol*. 2007;178:3932-43.
20. Hardy R y Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol* 2001; 19:595-621
21. Haymore B, Mikita C y Tsokos G. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimmunity reviews* 2008; 7: 09-312
22. Isnardi I, Ng YS, Menard L, et al. Complement receptor 2/CD21-negative human naive B cells mostly contain autoreactive unresponsive clones. *Blood* 2010; 115:5026-5036.
23. Ko J, Radigan L y Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency *Clinical Immunology* 2005; 116: 37 - 41
24. LeBien T y Tedder T. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112: 1570-1580.
25. Moir S, Ho J, Malaspina A, et al. Evidence for HIV-associated B cell

- exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 2008; 205:1797–1805.
26. Moratto D, Gulino A, Fontana S, Mori L, Pirovano S, Soresina A, Meini A, Imberti L, Notarangelo L, Plebani A, Badolato R. Combined decrease of defined B and T cell subsets in a group of common variable immunodeficiency patients *Clinical Immunology* 2006; 121: 203 – 214
 27. Notarangelo L, Fischer A, Geha R, Casanova J, Chapel H, Conley M, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartröm L, Nonoyama S, Ochs H, Puck J, Roifman C, Seger R y Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update: The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiencies (PID). *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 1161–1178.
 28. Notarangelo L D, Lanzi G, Peron S, Durandy A. Defects of class-switch recombination. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 855-864.
 29. Park M, Li J, Maddox D, Abraham R. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *The Lancet* 2008; 372:489-502
 30. Piatosa B, Pac M, Siewiera K, Pietrucha B, Klaudel-Dreszler M, Heropolitańska-Pliszka E, Common Variable Immune Deficiency in Children – Clinical Characteristics Varies Depending on Defect in Peripheral B Cell Maturation. *J Clin Immunol*, 2013; 33:731–741
 31. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debre P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol.* 2003;23:385–400.
 32. Podjasek J y Roshini A. Autoimmunocytopenias in common variable immunodeficiency. *Frontiers in immunology*, 2012; 3:1-7.
 33. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoening M, Driessen G, Van de Burg M, Van Dogen J, Wiech E, Visenti M, Quinti I, Prasse A, Voelxen N, Salzer U, Goldacker S, Fisch P, Eibel H, Schwarz K, Hanshartumer P y Warnatz K. 2009. Circulating CD21^{low}B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *PNAS*, 2009; 106 (32): 13451–13456
 34. Salzer U, Warnatz K, hartmut P Common variable immunodeficiency- an update. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14:223
 35. Spickett G, Farrant J, North M, Zhang J, Morgan L, Webster D. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunology Today.* 1997; 18: 325.

36. Scharenberg AM, Hannibal MC, Torgerson T, et al. Common Variable ImmuneDeficiencyOverview. 2006 Jul 5. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Availablefrom: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1299/>
37. Spickett G, Farrant J, North E, Zhang J, Morgan L, Webster B. 1997. Common variable immunodeficiency: how many diseases?. *Immunology Today*; 8:325-8.
38. Suryani S, Fulcher D, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw P, Gibson J, Williams A y Tangye S. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*, 2010; 115: 519-529
39. Taubenheim N, Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Hartmut H y Eibel H. Defined Blocks in Terminal Plasma Cell Differentiation of Common Variable Immunodeficiency Patients. *J Immunol*2005; 175:5498-5503
40. Vlková M, Fronková E, Kanderová V, Janda A, Ruzicková S, Litzman J, Sedivá A y Kalina T Characterization of Lymphocyte Subsets in Patients with Common Variable Immunodeficiency Reveals Subsets of Naive Human B CellsMarkedby CD24 Expression.*J Immunol*2010; 185:6431-6438
41. Vale A y Schroeder W. Clinical consequences of defects in B-cell development.*J. allergy clin immunol*, 2010; 125: 778-787.
42. Vries E y Driessen G. Educational Paper. Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge.*Eur J Pediatr*. 2011 170: 169-177
43. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth CH, Guido W, Hermann E, Schlesier M, Peter H. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27 pos IgM neg IgD neg) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2001; 99: 1544.
44. Warnatz K y Schlesier M. Flow cytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry part B* 2008, 74B: 261-271
45. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. 2008. The EUROclass

trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*; 111: 77-85.

46. Xiao Y, Hendriks J, Langerak P, Jacobs H y Borst J. CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation. *J. Immunol.* 2004; 172:7432-7441.
47. Yong P, Thaventhiran J y Grimbacher B. A rose is a rose but CVID is not CVID. Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we know in 2011. *Advances in Immunology*, 2011; 111 667-710
48. Yong P, Sullivan K y Orange J. Pediatric common variable immunodeficiency: Immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2010.