

**LINFOCITOS B DE MEMORIA Y LECTINA  
DE UNIÓN A MANOSA: FACTORES ASOCIADOS  
A LA VARIABILIDAD CLÍNICA  
EN INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN  
Y DÉFICIT DE IGA.**

**DRAHOMÍRA DETKOVÁ**

**TESIS DOCTORAL**

**2005**

**UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**Dra. Teresa Español Boren**, Professor Associat del Departament de Biologia cel.lular, Fisiologia i Immunologia, de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, directora de la tesi i **Dr. Viçenç Fonollosa Pla**, Professor Titular del Departament de Medicina, de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma, tutor de la tesi,

FAN CONSTAR,

que la tesi titulada "**LINFOCITOS B DE MEMORIA Y LECTINA DE UNIÓN A MANOSA: FACTORES ASOCIADOS A LA VARIABILIDAD CLÍNICA EN LA IMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN Y DÉFICIT DE IGA.**", ha estat realitzat sota la meua direcció pel llicenciat Dña. **Drahomíra Detková**, trobant-se en condicions de poder ser presentada per al tràmit de lectura i defensa pública

Barcelona, vint-i-quatre de dos-mil-cinc.

**Dra. Teresa Español**  
directora de la tesi

**Prof. Viçenç Fonollosa**  
tutor de la tesi

***Mojím rodičom,  
Rudkovi, q.d.e.p.  
a Isenke.***

Mis más sinceros agradecimientos van dirigidos en primer lugar a la Dra. Teresa Español Boren, Jefe Clínico de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por confiar en mi y darme la oportunidad de trabajar durante ya cuatros años a su lado, por la enseñanza extraordinaria en el diagnóstico y manejo clínico de los pacientes. Le agradezco su confianza y el apoyo personal que estoy recibiendo constantemente de ella.

Al Dr. Gumersindo Fontán, Jefe de Servicio de Inmunología del Hospital Universitario La Paz en Madrid, y su excelente equipo, por introducirme en el mundo de las Inmunodeficiencias Primarias.

A la Dra. Dora Pascual-Salcedo, Adjunto del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario La Paz en Madrid, por introducirme en la investigación. Durante el desarrollo y realización de este proyecto he tenido presente la rigurosidad y metodología aprendida con ella.

Al Dr. Manuel Hernandez, Adjunto de la unidad de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por el apoyo y asesoramiento profesional. Le agradezco las ideas y críticas siempre constructivas.

A la Dra. Isabel Caragol, Adjunto de la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por sus consejos profesionales y personales. Además, le agradezco las correcciones lingüísticas de todos mis escritos.

A la Dra. María José Rodrigo, Jefe Clínico de Unidad de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por la supervisión del trabajo experimental de la MBL y análisis de los resultados. Le agradezco el tiempo empleado en la discusión y revisión de la tesis.

Al Dr. Xavier de Gracia, Jefe Clínico del Servicio de Neumología y de la Sección de Inmunodeficiencias primarias del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por facilitarme el acceso a datos clínicos de los pacientes adultos estudiados en este proyecto. Le agradezco los consejos para la metodología de trabajo y la ayuda en la elaboración de los resultados clínicos de la tesis. Gracias a la metódica y rigurosidad en su trabajo clínico, se han podido completar los datos de la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio.

A la Dra. Luisa Guarner, adjunta del Servicio de Digestivo del Hospital Universitario Vall d'Hebron, responsable del seguimiento de los pacientes con IDVC con sintomatología digestiva, por la revisión de los resultados clínicos de esta área.

A los Dres. Josep Bertran y Pere Soler, Adjuntos de la Consulta de Inmunodeficiencias del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por facilitarme acceso a datos clínicos evolutivos de la infancia de los pacientes estudiados en este trabajo.

Al Dr. Antonio Vidaller, Adjunto del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona, por facilitarme el acceso a datos clínicos de los pacientes adultos con IDVC de este centro y por la organización de la recogida de las muestras sanguíneas de éstos.

A Susana Urban, Encarna Oliveros y Eva Perez, técnicos de la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por el apoyo personal y por la ayuda en los experimentos de extracción de DNA y preparación de las diluciones de las muestras de ELISAs.

A la Dra. Susana Lopes da Silva, Adjunto del Servicio de Inmunología del Hospital Santa María, de Lisboa en Portugal, por su colaboración en la revisión de historias clínicas y por la realización de las entrevistas personales de todos los pacientes estudiados.

A Carmen Besalú, Margarita Bastart, Carmen Martinez Perea y José Galvez, otro equipo de técnicos de la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por compartir conmigo los instrumentos y aparatos necesarios para la realización de ELISAs.

A las enfermeras Emilia Mur, Guadalupe García Salgado y Ana Alvarez Roig, que administran la gammaglobulina intravenosa a los enfermos del Hospital Universitario de Vall d'Hebron, por su desinteresada ayuda al mandarme las muestras de los pacientes.

A la Dra. Isabel García Laorden y al Dr. Carlos Rodríguez Gallego, del Laboratorio de Inmunología, Hospital Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria por la realización de los estudios del genotipo de la MBL.

A la empresa de Antibodishop de Gentofte de Dinamarca, que me ha proporcionado los equipos de ELISAs utilizados en este trabajo.

Al Dr. José Roselló, Adjunto del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por orientación estadística.

Al Ing. Javier Narvaez, por el soporte informático y la confección de la base de datos.

Al equipo del Banco de Sangre y Tejidos del Hospital Universitario de Vall d'Hebron, especialmente a la Dra. Gonzalez, por su eficacia y rapidez con la que reaccionó ante nuestras peticiones de proporcionarnos las muestras de controles sanos.

Al equipo de los archivos centrales del Hospital Universitario Vall d'Hebron, especialmente al señor Luis, por la búsqueda eficaz de las historias clínicas.

A todos los pacientes con IDVC y DIgA del Hospital Vall d'Hebron y los donantes voluntarios de sangre por haber colaborado desinteresadamente en este trabajo.

A todos los padres de los 428 niños que han colaborado activamente y desinteresadamente en este estudio.

Gracias a todas las personas que no he nombrado, pero que han contribuido a la realización de este trabajo.

Gracias a Toni y Lidia, los canguros incansables de mi hija.

A mi hija Isabel por la paciencia y comprensión de que la mami necesita trabajar y no puede estar por ella.

A mis padres y mis hermanos, Mirka y Milanko, por su innumerable ayuda, apoyo y amor incondicional.

A mi marido por haber estado.

## ABREVIATURAS MÁS FRECUENTEMENTE UTILIZADAS

ac	Anticuerpos
AcMo	Anticuerpos Monoclonales
AHAI	Anemia Hemolítica Autoinmune
BDBs	Becton Dickinson Biosciences
BM	Linfocitos B de Memoria
BR	Bronquiectasias
CMF	Citometría de Flujo
CV	Coeficiente de Variación
CVF	Capacidad Vital Forzada
DE	Desviación Estándar
DIgA	Déficit de IgA
DR	Diarreas Recidivantes
EAI	Enfermedad Autoinmune
EPC	Enfermedad Pulmonar Crónica
ESID	European Society for Immunodeficiencies
GG.ev.	Gammaglobulina humana endovenosa
HiB	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B
HRP	Peroxidasa de rábano (Horse Redish Peroxidase)
HUVH	Hospital Universitario Vall d'Hebron
IC	Intervalo de Confianza
IDP	Inmunodeficiencias Primarias
IDVC	Inmunodeficiencia Variable Común
Ig	Inmunoglobulina
IRR	Infecciones Respiratorias Recurrentes
IUIS	<i>International Union of Immunology Societies</i>
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MASP	Serín-proteasas asociadas a MBL
MBL	Lectina de unión a manosa (Mannose Binding Lectin)
NK	Natural Killer, células citocidas naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFR	Pruebas de Función Respiratoria
REDIP	Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias
UA	Unidades Arbitrarias
VEMS	Volumen Espiratorio Máximo en el primer Segundo

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inmunodeficiencias primarias (IDP) .....	3
1.1.1. Clasificación de las IDP	
1.1.2. Registro nacional e internacional de las IDP	
1.1.3. IDP con defectos predominantemente de anticuerpos	
1.2. Inmunodeficiencia variable común y Déficit de IgA .....	7
1.2.1. Definición	
1.2.2. Manifestaciones clínicas de los pacientes con IDVC .....	8
1.2.3. Manifestaciones clínicas de los pacientes con DIgA .....	11
1.2.4. Diagnóstico de los pacientes con IDVC .....	12
1.2.5. Diagnóstico de los pacientes con DIgA .....	13
1.2.6. Tratamiento de IDVC.....	14
1.2.7. Tratamiento de DIgA .....	15
1.2.8. Pronóstico de IDVC.....	15
1.2.9. Pronóstico de DIgA .....	16
1.2.10. Consejo genético.....	16
1.2.11. Etiología .....	16
1.3. Líneas de investigación actuales .....	18
1.3.1. Nueva propuesta para la clasificación de la IDVC .....	19
1.3.2. MBL como factor modulador del fenotipo clínico .....	20

### 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Antecedentes .....	29
2.2. Hipótesis .....	29
2.3. Objetivos .....	30

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población de estudio .....	33
3.1.1. Grupo control	
3.1.2. Grupos de pacientes	
3.1.3. Grupo de recién nacidos	

<b>3.2.</b>	Recogida de datos clínicos e inmunológicos de los pacientes con IDC y DIgA .....	37
<b>3.2.1.</b>	Subpoblaciones linfocitarias.....	38
<b>3.2.2.</b>	Función linfocitaria. ....	39
<b>3.2.3.</b>	Inmunoglobulinas séricas.....	39
<b>3.2.4.</b>	Subclases de IgG.....	39
<b>3.2.5.</b>	Producción de anticuerpos específicos.....	39
<b>3.2.</b>	Recogida de datos de los recién nacidos .....	40
<b>3.3.</b>	Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B.....	41
<b>3.3.1.</b>	Preparación de la muestra .....	41
<b>3.3.2.</b>	Análisis de las subpoblaciones de linfocitos B .....	43
<b>3.4.</b>	Cuantificación de la MBL proteica y funcional .....	45
<b>3.4.1.</b>	Tipo de muestra	
<b>3.4.2.</b>	Materiales	
<b>3.4.3.</b>	Método de cuantificación de la MBL proteica.....	45
<b>3.4.4.</b>	Método de cuantificación de la MBL funcional .....	47
<b>3.4.5.</b>	Cálculo del límite de detección .....	48
<b>3.4.6.</b>	Calculo de la precisión intra- e interensayo	
<b>3.5.</b>	Identificación de los polimorfismos del gen de la MBL.....	49
<b>3.5.1.</b>	Tipo de muestra	
<b>3.5.2.</b>	Extracción de ADN genómico a partir de sangre total	
<b>3.5.3.</b>	Análisis genético de la MBL .....	50
<b>3.6.</b>	Análisis de datos clínicos.....	54
<b>3.7.</b>	Análisis de datos experimentales.....	55
<b>3.7.1.</b>	Estudio de los linfocitos B de memoria en pacientes con IDVC	
<b>3.7.2.</b>	Estudio de asociación entre el genotipo y la concentración plasmática de MBL.	
<b>3.7.3.</b>	Estudio de MBL en pacientes con IDVC y DIgA	
<b>3.8.</b>	Análisis estadístico .....	57

## **4. RESULTADOS**

<b>4.1.</b>	Estudio de los linfocitos B de memoria en pacientes con IDVC .....	61
<b>4.1.1.</b>	Cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B en controles y pacientes con IDVC.....	61
<b>4.1.2.</b>	Clasificación de los pacientes con IDVC en grupos según la cuantificación de las subpoblaciones de los LB de memoria .....	62

4.1.3. Caracterización clínica e inmunológica de los pacientes con IDVC clasificados en grupos BM.....	68
4.1.3.1. Datos generales y antecedentes familiares .....	68
4.1.3.2. Caracterización clínica de los pacientes con IDVC clasificados en grupos BM.....	71
4.1.3.3. Datos inmunológicos de pacientes con IDVC .....	77
4.2. Estudio de MBL en el grupo de recién nacidos .....	82
4.4.1. Caracterización del método de ELISA para MBL proteica .....	82
4.4.2. Caracterización del método de ELISA para MBL funcional.....	83
4.4.3. Correlación entre MBL proteica y funcional .....	84
4.4.4. Datos generales de RN y concentración de MBL .....	85
4.4.5. Correlación entre el genotipo y la concentración plasmática de MBL .....	85
4.3. Estudio de MBL en el grupo de pacientes con IDVC y DIgA .....	96
4.3.1. Determinación de la concentración de MBL proteica .....	96
4.3.2. Determinación de la concentración de MBL funcional.....	99
4.3.3. Correlación entre MBL proteica y funcional .....	101
4.3.4. Concentración plasmática de MBL y manifestaciones clínicas en los pacientes con IDVC y DIgA.....	103
4.3.5. Estudio del genotipo de la MBL en pacientes con IDVC y DIgA .....	108
4.3.6. Correlación entre el genotipo de la MBL y manifestaciones clínicas en los pacientes con IDVC y DIgA. ....	110

## 5. DISCUSIÓN

5.1. Estudio de los linfocitos B de memoria en pacientes con IDVC.....	118
5.2. Estudio de asociación entre el genotipo y la concentración plasmática de MBL.....	126
5.3. Estudio de MBL en pacientes con IDVC y DIgA .....	130

6. CONCLUSIONES.....	136
----------------------	-----

7. BIBLIOGRAFÍA.....	140
----------------------	-----

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un grupo heterogéneo de enfermedades, causadas por defectos en el desarrollo y la maduración del sistema inmunológico. Son enfermedades poco conocidas y han estado durante muchos años infradiagnosticadas. A excepción de la deficiencia de IgA, que afecta a uno de cada 700 individuos en nuestro medio, la incidencia se estima en 3-5 por cada 10.000 nacimientos<sup>1</sup>. Aunque en muchas inmunodeficiencias se ha podido determinar una causa genética, en otras la causa permanece desconocida<sup>1,2</sup>.

Las manifestaciones clínicas de las IDP suelen aparecer temprano, pero pueden comenzar a cualquier edad de la vida. Las más significativas son las infecciones de repetición, aunque también están presentes otras patologías, como los procesos autoinmunes o neoplasias, con una incidencia superior a la de la población general<sup>1</sup>.

Las infecciones que padecen los enfermos con IDP no sólo son más frecuentes, sino que suelen ser más graves, de evolución tórpida y con peor respuesta a los tratamientos antibióticos. Además, pueden ser causadas por gérmenes de baja virulencia, no patógenos para las personas que tienen un sistema inmunológico normal<sup>3</sup>.

Ante la sospecha clínica de una IDP, las primeras pruebas complementarias a realizar son un hemograma y una cuantificación de inmunoglobulinas séricas, cuyas anomalías serán la primera indicación de un defecto inmunológico (ver protocolo diagnóstico ante la sospecha de una IDP en la página Web:<http://aeped.es/protocolos>). Al mismo tiempo, hay que iniciar una serie de pruebas y estudios inmunológicos para identificar el tipo de IDP y hacerlo, si es posible, a nivel molecular. El conocimiento de la mutación responsable de la IDP en una familia, permite realizar el consejo genético y diagnóstico prenatal en cada caso<sup>4</sup>.

El proceso diagnóstico de una forma concreta de IDP es complejo, si tenemos presente que a la vez que se identifican nuevas mutaciones y defectos moleculares responsables de diferentes IDP, aparecen formas variantes con clínica y analítica atípicas de IDP, no filiadas en la clasificación actual de la OMS<sup>2,5,6</sup>.

En todas las IDP con defecto en la formación de anticuerpos tipo IgG el tratamiento consiste en la administración de gammaglobulina endovenosa, que aporta al paciente los anticuerpos deficitarios<sup>7</sup>. El tratamiento de base en las deficiencias combinadas de células T y B es el trasplante de médula ósea, que sustituye las células defectuosas del paciente<sup>8</sup>.

### 1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS IDP

El Comité Científico de la *International Union of Immunology Societies (IUIS)*, patrocinado por la OMS, se reúne periódicamente para actualizar la clasificación de las IDP donde se incluyen nuevas patologías, pruebas diagnósticas y tratamientos<sup>1,2</sup>. Dentro de los siete grandes apartados que relacionan cada IDP con la alteración del sistema inmunitario que la produce, se agrupan más de 100 de estas enfermedades:

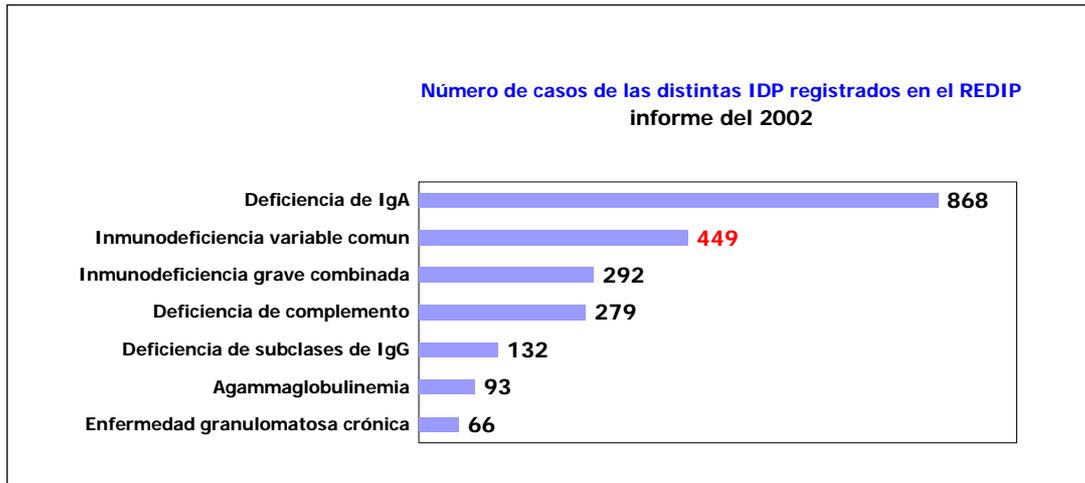
- 1) Inmunodeficiencias graves combinadas de células T y B
- 2) Deficiencias predominantemente de anticuerpos
- 3) Otros síndromes de Inmunodeficiencia bien definidos
- 4) Deficiencias del sistema del complemento
- 5) Defectos congénitos del número y/o función de los fagocitos
- 6) Inmunodeficiencias asociadas a procesos linfoproliferativos
- 7) Inmunodeficiencias asociadas a otras enfermedades congénitas.

### 1.1.2. REGISTRO NACIONAL E INTERNACIONAL DE LAS IDP

El **Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias (REDIP)** nació en el año 1993 con el fin de recoger la incidencia de estas enfermedades en España<sup>9</sup>. La centralización de los datos epidemiológicos facilita la colaboración de diferentes centros nacionales dedicados al estudio de las IDP y así, contribuye a la mejoría del proceso de diagnóstico y tratamiento de los pacientes. El Registro Español colabora con el **Registro Europeo de Inmunodeficiencias (ESID)**.

Desde el enero de 1980 hasta el agosto de 2002 se han diagnosticado y registrado en España 2357 pacientes con IDP. De acuerdo a su clasificación por grandes

grupos, según se muestra en las tablas del REDIP (Anexo N° 1), son mayoritarias las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos (69%), de las cuales 868 registros (el 37% del total) corresponden a deficiencia selectiva de IgA y 449 registros pertenecen a inmunodeficiencia variable común (IDVC), (19% del total). La **figura 1.1.** muestra el número de casos de las 6 IDP más frecuentes en España, según el informe del REDIP del año 2002.



**Figura 1.1.** Número de casos registrados en REDIP (2002) de las 6 IDP más frecuentes en España.

Según este mismo informe, las patologías asociadas con mayor frecuencia han sido: infecciones de repetición, presentes en el 87% de casos, autoinmunidad en un 3,8% y neoplasias en un 0,9% de todas las IDP.

La comparación de los datos del registro español (REDIP) con los obtenidos por el registro europeo (ESID) no presenta diferencias significativas (<http://www.esid.org>).

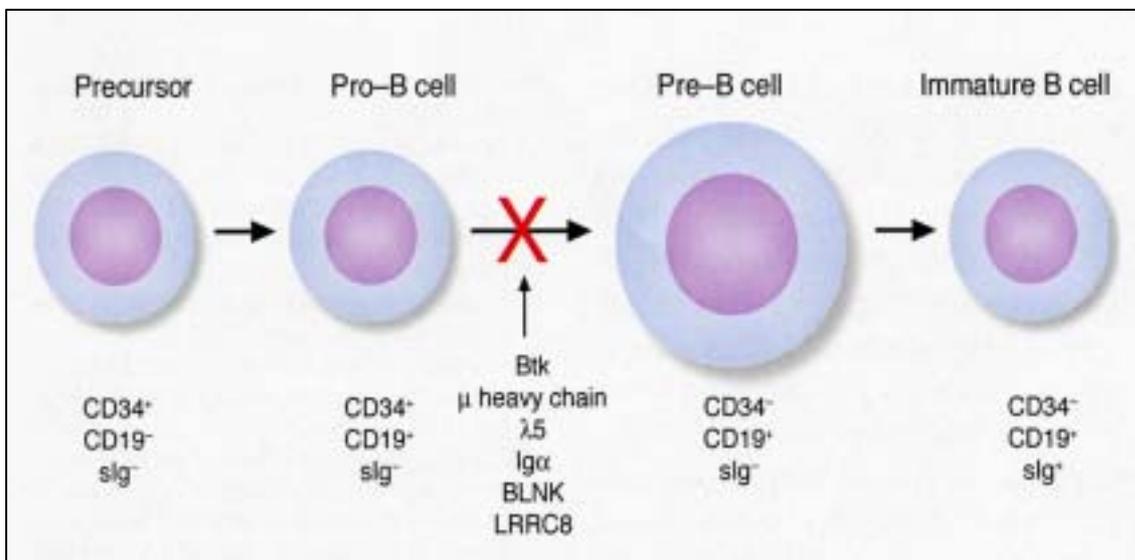
### **1.1.3. IDP CON DEFECTOS PREDOMINANTEMENTE DE ANTICUERPOS**

Este grupo incluye las dos IDP más frecuentes: el déficit selectivo de IgA y la Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC). Sólo un tercio de los pacientes con déficit de IgA presenta clínica infecciosa y/o autoinmune, por lo que la IDVC pasa a ser la IDP sintomática más frecuente<sup>10</sup>.

Los defectos moleculares en este grupo de IDP son muy heterogéneos, pudiendo afectar cualquier elemento de la respuesta humoral, dando lugar a una falta cuantitativa y/o cualitativa de la producción de anticuerpos<sup>2</sup>. Se incluyen en este grupo las siguientes IDP (ESID, <http://www.esid.org>):

- 1) Déficit selectivo de IgA.
- 2) Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC).
- 3) Deficiencia selectiva de las subclases de IgG.
- 4) Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.
- 5) Déficit de anticuerpos con concentración normal de inmunoglobulinas.
- 6) Agammaglobulinemia autosómica recesiva.
- 7) Deficiencia de AID
- 8) Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia
- 9) Deleciones en el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.
- 10) Deficiencia autosómica recesiva de la cadena kappa.

En la **figura 1.2.** se muestran algunos de los defectos moleculares responsables de las IDP con defecto predominantemente de anticuerpos.



**Figura 1.2.** Algunos de los defectos moleculares responsables de las IDP con defecto predominantemente de anticuerpos. Estos defectos causan un paro madurativo en el desarrollo de los precursores de los LB, paso de la célula pro-B a pre-B, cuya consecuencia final es la hipogammaglobulinemia. Modificado del J.Clin.Invest. Dec.2003.

## 1.2. INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMUN Y DÉFICIT DE IgA

### 1.2.1. DEFINICIÓN

La Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC) y el Déficit de IgA (DIgA) son las inmunodeficiencias primarias más frecuentes. Se caracterizan por un defecto de la producción de anticuerpos debido a anomalías todavía no identificadas de la diferenciación terminal de los linfocitos B. La IDVC se caracteriza por hipogammaglobulinemia de 2 o más isotipos de inmunoglobulinas, una mayor propensión a las infecciones bacterianas, sobre todo del tracto respiratorio y digestivo y el desarrollo de enfermedades autoinmunes y tumorales<sup>1,2</sup>. El DIgA se define por la ausencia de IgA en el suero y en las secreciones mucosas. Aunque los individuos con DIgA son habitualmente asintomáticos, algunos sufren un mayor número de infecciones y desarrollan enfermedades autoinmunes y alérgicas<sup>1,2</sup>.

La aparición de ambas enfermedades en la misma familia y la progresión del DIgA a la IDVC han sido bien documentados<sup>11,12</sup>. Una mayor incidencia del déficit de subclases de IgG y procesos autoinmunes entre los familiares (hasta en un 20% de los casos) y la asociación con un determinado haplotipo HLA, también indican una predisposición genética para el DIgA y la IDVC<sup>13-17</sup>. Se postula que estas dos enfermedades representan los extremos opuestos de un espectro clínico del mismo defecto genético de la inmunodeficiencia humoral que va desde el DIgA selectivo hasta la hipogammaglobulinemia e incapacidad de la producción de anticuerpos, característica de la IDVC<sup>16</sup>.

La incidencia del DIgA en nuestro entorno se estima sobre 1:700 individuos. Después del DIgA, la IDVC es la inmunodeficiencia primaria más frecuente, con una incidencia estimada entre 1:10.000 y 1:50.000 individuos. Ambas afectan por igual a ambos sexos, con cierto predominio de los varones. La IDVC se diagnostica a cualquier edad aunque existen dos picos de frecuencia importantes, uno en la infancia y otro entre los 20 y 30 años<sup>10, 18</sup>. El diagnóstico del DIgA suele ser un hallazgo casual de laboratorio en los pacientes en estudio por las manifestaciones gastrointestinales o alérgicas<sup>10</sup>.

La característica principal de la IDVC y del DIgA son su variabilidad clínica e inmunológica<sup>16-20</sup>. La mayoría de los pacientes con DIgA son asintomáticos pero pueden presentar síntomas clínicos parecidos a los de los pacientes con IDVC<sup>10,16</sup>.

Las infecciones respiratorias son los síntomas iniciales de casi todos los pacientes con IDVC<sup>16-20</sup>. Además, existe una gran variabilidad de otros síntomas, infecciosos y no infecciosos, de diversa gravedad, presentes entre los pacientes y sus familiares de primer grado<sup>17</sup>. Entre éstos destacan los síntomas digestivos (diarreas agudas y crónicas, malabsorción, pérdida de peso, etc.), autoinmunes (citopenias, artritis reumatoide, etc.), linfoproliferativos con o sin formación de granulomas (esplenomegalia, linfadenopatias) y tumorales (linfomas, leucemias, carcinomas, etc.).

Los hallazgos de laboratorio son también muy heterogéneos. En pacientes con IDVC, además de la presencia de hipogammaglobulinemia de IgG e IgA, concentraciones variables de IgM (bajas, normales o incluso aumentadas) y producción anormal de anticuerpos específicos, se han descrito otras alteraciones, tales como: presencia de diferentes tipos de autoanticuerpos con valor clínico desconocido, linfopenia, sobre todo a expensas de los linfocitos T CD4 positivos, cifras variables de linfocitos B (desde muy bajas, hasta valores de normalidad), o de las células citocidas naturales (NK) y alteración de la respuesta proliferativa de los linfocitos<sup>21,22</sup>.

Los pacientes con DIgA tienen, generalmente, las subpoblaciones y función linfocitarias dentro de los límites de la normalidad. La concentración de la IgG e IgM suele estar también en los límites de la normalidad o puede estar aumentada. En muchos pacientes con DIgA están presentes cambios simultáneos en las subclases de la IgG, con déficit de anticuerpos específicos anti-polisacáridos de la clase IgG2, o total ausencia de la IgG2 o IgE<sup>10,16</sup>.

## **1.2.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON IDVC**

Los pacientes con IDVC presentan una amplia variedad de patologías infecciosas, no infecciosas, autoinmunes y linfoproliferativas que pueden afectar a cualquier sistema del organismo, pero sobre todo al aparato respiratorio y digestivo<sup>16-20</sup>.

### **1.2.2.1. MANIFESTACIONES RESPIRATORIAS**

El 99% de pacientes con IDVC han sufrido infecciones respiratorias de distinta gravedad a lo largo de su vida. Son el principal motivo de consulta médica que lleva

a su diagnóstico<sup>16-20</sup>. En un alto porcentaje, son las primeras manifestaciones que alertan sobre la existencia de una IDP. Su ausencia, o baja incidencia y gravedad, es la principal causa del retraso en el diagnóstico y consecutivamente en el comienzo del tratamiento sustitutivo con gammaglobulina endovenosa. Las más frecuentes incluyen: neumonías (66%), sinusitis (60%), bronquitis (45%), otitis media y mastoiditis (29%) acompañados frecuentemente de secreción nasal purulenta y expectoración, pudiendo presentar bronquiectasias en edades tempranas de la vida<sup>18</sup>.

Las bacterias encapsuladas (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, etc.) son los gérmenes más habituales, responsables de la mayoría de estas infecciones, ya que el proceso de su eliminación requiere la colaboración de anticuerpos opsonizantes (IgG), que son precisamente los que fallan en estos pacientes. En pacientes con linfopenia T CD4 existe una susceptibilidad aumentada a padecer infecciones pulmonares por *Mycoplasma pneumoniae* e infecciones virales por enterovirus, *Herpes simplex*, varicela zoster y citomegalovirus<sup>17,20</sup>.

En estos pacientes, las infecciones respiratorias son más graves y se convierten en crónicas con mayor frecuencia que en la población general, causando, con el tiempo, daño pulmonar irreversible (deterioro progresivo de la función y estructura pulmonar) y bronquiectasias con sobreinfecciones respiratorias continuas<sup>23</sup>. La EPOC y la insuficiencia respiratoria crónica con cor pulmonale son los principales factores condicionantes de la calidad de vida, en los pacientes en los que el tratamiento sustitutivo ha limitado las exacerbaciones infecciosas agudas, pero no puede reparar el daño estructural ocasionado<sup>23</sup>.

Una vez establecido el tratamiento sustitutivo adecuado, las infecciones respiratorias mejoran notablemente, disminuyendo su frecuencia y gravedad. Según estudios publicados, cerca del 17% de los pacientes con IDVC presentan bronquiectasias ya al momento del diagnóstico<sup>20</sup>. La situación es más grave cuanto mayor es el lapso del tiempo entre los primeros síntomas respiratorios y el diagnóstico y comienzo del tratamiento<sup>10,17,18</sup>.

El diagnóstico precoz y comienzo del tratamiento sustitutivo con gammaglobulina intravenosa es de primordial importancia no sólo para prevenir y controlar los procesos infecciosos, sino también para evitar el desarrollo de una neumopatía crónica<sup>3,23</sup>.

### **1.2.2.2. MANIFESTACIONES GASTROINTESTINALES**

Hasta un 60% de los pacientes con IDVC presentan patología digestiva de diversa gravedad. Las infecciones recurrentes del tracto intestinal son producidas comúnmente por *Giardia lamblia*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, rotavirus, etc.<sup>17-20</sup>.

Las alteraciones digestivas mas frecuentes en los enfermos con IDVC son: diarrea recidivante, diarrea crónica asociada o no al síndrome de malabsorción y malnutrición, intolerancia a la lactosa y pérdida de peso<sup>24</sup>. El estudio histológico del intestino muestra con frecuencia lesiones, tales como hiperplasia nodular linfoide (HNL), atrofia de vellosidades de diversos grados y ausencia de células plasmáticas. La HNL se caracteriza por la presencia de pequeños nódulos linfoides en el intestino delgado, colon o recto y su patogenia parece estar relacionada con la persistente estimulación antigénica de los linfocitos B residuales en la pared intestinal y su escasa capacidad para sintetizar anticuerpos<sup>17</sup>.

### **1.2.2.3. OTRAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Las infecciones producidas por hongos, micobacterias y protozoos (*Pneumocystis carinii*) ocurren también más frecuentemente de lo esperado en pacientes con IDVC. Además pueden aparecer: septicemia, meningitis, encefalitis (por enterovirus), poliartritis séptica destructiva, mononucleosis infecciosa, infecciones por micoplasma, poliomielitis asociada a la vacuna, etc.<sup>17-20</sup>.

### **1.2.2.4. MANIFESTACIONES LINFOPROLIFERATIVAS**

Aproximadamente un tercio de los pacientes tienen esplenomegalia y linfadenopatías torácicas, mesentéricas y/o retroperitoneales. Los ganglios linfáticos muestran una importante hiperplasia folicular reactiva. En la imagen ecográfica, la espleno y hepatomegalia pueden ser homogéneas, o con granulomas no caseificantes<sup>18, 25,26</sup>.

### **1.2.2.5. MANIFESTACIONES AUTOINMUNES**

La asociación entre inmunodeficiencia y autoinmunidad no es una excepción en el caso de la IDVC. Alrededor de un 30% de los pacientes sufre trastornos autoinmunes (anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, neutropenia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, etc.) o presentan diferentes tipos de autoanticuerpos de valor clínico desconocido. Esta sintomatología es más frecuente en las mujeres que en los varones<sup>18</sup>.

### **1.2.2.6. NEOPLASIAS**

La incidencia de neoplasias sólidas y hematológicas está incrementada de 8 a 13 veces, sobre todo en mujeres<sup>18</sup>, si la comparamos con el grupo de individuos no inmunodeficientes de igual edad y sexo.

Las neoplasias más frecuentes son las epiteliales de origen gastrointestinal (carcinoma gástrico), que suelen estar asociadas a atrofia gástrica<sup>24</sup>, y los linfomas. Estos últimos son principalmente non-Hodgkin y tienden a ser de origen extranodal, de tipo B, bien diferenciados<sup>27</sup>.

La causa de esta alta incidencia de neoplasias es desconocida, aunque es posible que la estimulación antigénica permanente y la disregulación de la inmunidad celular intervengan como factores de riesgo. El tratamiento sustitutivo adecuado parece frenar esta incidencia<sup>18,28</sup>.

### **1.2.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DIgA**

Aunque la mayoría de los pacientes con DIgA son asintomáticos, en otros el DIgA ha sido asociado a un asombroso número de patologías específicas<sup>29</sup>. Entre ellas destacan:

- a) Infecciones sinopulmonares recurrentes bacterianas y víricas. Éstas son más frecuentes en pacientes con el déficit de IgG2 concomitante pero también se describieron en los pacientes sin otro defecto inmunológico conocido.

- b) Enfermedades intestinales: giardiasis, hiperplasia nodular linfoide, celiaquía y enfermedad intestinal inflamatoria.
- c) Enfermedades autoinmunes o presencia de múltiples autoanticuerpos, incluso con ausencia de la enfermedad.
- d) Alergias: conjuntivitis, rinitis, urticaria, eccema atópico, asma bronquial, alergia alimentaria.

#### **1.2.4. DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON IDVC**

El diagnóstico de IDVC se basa, actualmente, en el fenotipo clínico y analítico de los pacientes (Anexo N° 2)<sup>10,16</sup>.

La sospecha clínica de un posible trastorno inmunológico es un elemento clave en el proceso diagnóstico de la IDVC. Dado que ésta puede debutar en todas las edades, incluso las más avanzadas, con frecuencia no se piensa en ella y los pacientes siguen siendo diagnosticados, y por lo tanto tratados, con mucho retraso desde el inicio de los síntomas y muchas veces cuando ya han desarrollado alteraciones orgánicas irreversibles.

Una vez se realiza la sospecha clínica, el diagnóstico de una posible IDP es relativamente sencillo en la mayoría de los pacientes. Una simple determinación de inmunoglobulinas séricas, hemograma y poblaciones linfocitarias, pruebas complementarias accesibles a todos los niveles sanitarios, corroboran o excluyen este diagnóstico y orientan en el tratamiento en la mayoría de los casos<sup>30,31</sup>.

La mayoría de pacientes con IDVC presentan<sup>16</sup>: IgG inferior a 500mg/dl, IgA bajo o indetectable, déficit de subclases de la IgG en el siguiente orden de frecuencia: IgG2>IgG1>IgG3; IgM e IgE reducidas, poblaciones linfocitarias normales y alteración en la función de los LT. Un porcentaje de pacientes con IDVC presentan<sup>16</sup>: disminución del número de LB y disfunción de diferentes células del sistema hematopoyético (linfopenia, plaquetopenia).

Cuando las inmunoglobulinas se hallan en los límites bajos de la normalidad y el paciente presenta sintomatología infecciosa, es necesario investigar su capacidad de formar anticuerpos (ac)<sup>30-33</sup>. Se valoran ac naturales como las isohemaglutininas (IgM) y ac anti-estreptolisinas (IgG), y ac específicos a diferentes vacunas (IgG). Se

valoran los ac anti-tétanos y difteria, para ver la capacidad de formación de ac en respuesta a los antígenos proteicos y ac anti-neumococo<sup>32</sup>, meningococo y hemofilus  $\beta$  (Hib)<sup>33</sup> para valorar la respuesta a polisacáridos.

Actualmente no existe ninguna prueba de certeza que permita confirmar el diagnóstico de la IDVC y este se basa en la exclusión de otras causas que produzcan hipogammaglobulinemia (Anexo N° 3), tanto de origen secundario<sup>1,17</sup> (enteropatías con pérdida de proteínas, síndrome nefrótico, enfermedad linfoproliferativa, algunas drogas, etc.), como primario (otras IDP con un defecto molecular conocido)<sup>1,2,10,16,34,35</sup>.

El valor de IgM es importante, ya que si es elevado hay que descartar, en varones, el síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X, cuyo tratamiento de primera elección es el trasplante de médula ósea<sup>6</sup>. También el número de células B es importante, ya que cuando está muy disminuido (<2%) se tiene que descartar una agammaglobulinemia autosómica recesiva o ligada al cromosoma X (ALX). Actualmente el diagnóstico molecular, con la detección de las mutaciones en el gen de la B-tirosin-kinasa (Btk), es posible en más del 90% de los casos de ALX<sup>1,2</sup>.

En los pacientes varones con síntomas linfoproliferativos hay que descartar el síndrome linfoproliferativo ligado a X<sup>36</sup>.

En niños menores de 2-3 años, que pueden presentar una hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, es difícil diagnosticar una IDVC. En esta fase, en la que disminuye la concentración de inmunoglobulinas maternas en el niño y se inicia su propia producción, hay cifras bajas de inmunoglobulinas, escasa respuesta a las vacunas y pueden aparecer infecciones más o menos graves. Habitualmente, el aumento progresivo de inmunoglobulinas, junto con la desaparición de la sintomatología, nos ayudan en el diagnóstico diferencial<sup>1,30</sup>.

### **1.2.5. DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON DIgA**

La mayoría de los pacientes con DIgA se diagnostican casualmente durante un análisis rutinario<sup>16,29</sup>, frecuentemente en los pacientes en estudio de una enfermedad alérgica o autoinmune o estudio familiar de IDVC.

El diagnóstico del DIgA (Anexo N°4) se establece después de los 4 años de vida ya que la IgA es la última en empezar a producirse dentro del proceso fisiológico de maduración de los isotipos de las inmunoglobulinas<sup>1</sup>.

La mayoría de los pacientes con DIgA presentan<sup>16</sup>: niveles de IgG normales o elevadas, niveles normales de IgM y las subpoblaciones linfocitarias dentro de los rangos de la normalidad. Un alto porcentaje de los pacientes con DIgA presenta también diferentes autoanticuerpos con valor clínico desconocido. Una minoría de DIgA manifiestan alguna otra disfunción inmunológica: incapacidad de producir ac específicos frente a antígenos polisacáridos, déficit de subclases de la IgG y alteración en la función de los LT<sup>16,37-39</sup>.

### **1.2.6. TRATAMIENTO DE IDVC**

El tratamiento de base de IDVC debe realizarse, en todos los casos, con gammaglobulina humana (GG.), a fin de aportar los anticuerpos deficitarios y apoyarse con antibióticoterapia en las infecciones intercurrentes y con fisioterapia en los procesos respiratorios crónicos<sup>1,30,31,40</sup>.

El tratamiento sustitutivo con GG. en pacientes con IDVC deberá mantenerse de por vida y no caer en el error de dejarlo de administrarlo por hallarse el paciente en fase asintomática. En la actualidad, el tratamiento con GG comerciales se puede administrar por vía endovenosa (0,2 a 0,6 gr/ kg/ cada 2-3 semanas), o subcutánea. Las dosis a administrar variarán en cantidad y tiempo según la vía de administración, pero éstas se ajustarán en cada paciente hasta conseguir unas concentraciones de IgG sérica superiores a 600 mg/dl y el control de la sintomatología clínica<sup>23</sup>.

En algunos pacientes con enfermedades autoinmunes o lesiones linfoproliferativas benignas e inflamatorias en el pulmón o tubo digestivo, está también indicado el tratamiento con corticosteroides locales o sistémicos<sup>1,16</sup>.

### 1.2.7. TRATAMIENTO DE DIgA

La administración de GG. a los pacientes con DIgA aislado está contraindicada, ya que éstos pueden producir anticuerpos tipo IgG y/o IgE frente a la IgG y/o IgA presente en los preparados comerciales de GG., con las consecuentes reacciones adversas<sup>1</sup>. En el caso del defecto funcional de IgG concomitante (incapacidad de producir ac específicos frente a antígenos polisacáridos, déficit de subclases de la IgG) y sintomatología infecciosa se pueden administrar los preparados de GG. con el contenido mínimo de IgA<sup>1,10</sup>.

El tratamiento de los pacientes con DIgA aislado se limita al tratamiento sintomático de las infecciones, pudiendo recurrir a la antibioticoterapia profiláctica o periódica en el caso de las infecciones recurrentes y con fisioterapia en los procesos supurativos crónicos<sup>1,10</sup>.

### 1.2.8. PRONÓSTICO DE IDVC

La evolución clínica y el pronóstico a largo plazo están en función de<sup>1,10,23</sup>:

- a) El diagnóstico precoz de la enfermedad.
- b) La instauración **temprana y permanente** del tratamiento con GG. endovenosa (GG.ev.) a dosis suficientes.
- c) La presencia de lesiones crónicas antes de su instauración.

Hacer un diagnóstico precoz es determinante para mejorar el pronóstico. El tratamiento continuado con GG.ev. es actualmente el único capaz de prevenir la aparición de las complicaciones respiratorias, digestivas y del resto de la patología asociada. Las complicaciones<sup>18</sup> y la mortalidad (aproximadamente de un 27%) aumentan cuanto mayor es el lapso de tiempo entre el inicio de síntomas y la confirmación del diagnóstico o la instauración del tratamiento. Las principales causas de muerte son las infecciones pulmonares crónicas (cor pulmonale) y el linfoma. En los últimos años, con el tratamiento adecuado, la supervivencia con buena calidad de vida ha mejorado notablemente<sup>10,18,23</sup>.

### **1.2.9. PRONÓSTICO DE DIgA**

En un subgrupo significativo de pacientes diagnosticados de DIgA, la concentración de IgA<sup>16</sup> alcanza los niveles normales en la segunda década de la vida.

La progresión de DIgA a IDVC ha sido documentada, por lo que los niños con DIgA deberían ser reevaluados en la edad adolescente, y los adultos jóvenes con historia familiar de IDP e infecciones sinopulmonares recurrentes requieren una reevaluación, a pesar de tener los niveles de IgG previamente normales<sup>16</sup>.

### **1.2.10. CONSEJO GENÉTICO**

El riesgo de IDP entre los parientes de primer grado de individuos con DIgA asintomáticos se desconoce. Entre los IDVC con el haplotipo, o parte de él, HLA-A1, -B8, DR3, el riesgo de IDVC y DIgA parece acercarse al 40% en sus hijos, mientras que sólo a un 5% en sus hermanos<sup>16</sup>.

En estos momentos se recomienda evaluar a los hijos de los pacientes IDVC a las edades de 5 y 10 años, y como adultos jóvenes, o cada vez que se evidencien infecciones repetitivas, enfermedad autoinmune o cáncer de origen linfóide<sup>16</sup>.

### **1.2.11. ETIOLOGÍA**

A pesar de los múltiples estudios realizados el origen genético de estas IDPs no es conocido<sup>2,10,16</sup>. Las hipótesis que se han barajado sobre el origen de la hipogammaglobulinemia como consecuencia de un bloqueo en el paso de linfocito B maduro a célula plasmática secretora de anticuerpos son: a) un defecto intrínseco del linfocito B, b) una actividad supresora excesiva de las células T, c) una colaboración defectuosa T-B, y d) un fallo en las células presentadoras de antígeno<sup>21,34</sup>.

En los pacientes con IDVC han sido identificados múltiples defectos en la expresión y función de diversas moléculas de la respuesta inmunológica<sup>21,22,41-43</sup>, imprescindibles para la colaboración efectiva entre la célula T y B. Las alteraciones

más frecuentemente halladas afectan a la función T (activación, proliferación, producción de citocinas), al inmunofenotipo T (expresión de moléculas de adhesión, marcadores de activación, memoria inmunológica, coestímulo), a la función B (producción de inmunoglobulinas *in vitro*), al fenotipo B (marcadores de madurez, coestímulo), a la función de los monocitos (producción de citocinas) y a la apoptosis (expresión de Fas/FasL, etc.). Ninguno de estos defectos inmunológicos ha podido esclarecer la etiología de la enfermedad.

Existen trabajos que demuestran que los linfocitos B de pacientes con IDVC y DIgA son capaces de producir y secretar todas las clases de inmunoglobulinas si se les da el estímulo apropiado<sup>44,45</sup>, por lo que el defecto B podría ser reversible. Se postula que el defecto primario responsable de la hipogammaglobulinemia en estos pacientes está en la colaboración T-B y no es intrínseco de la célula B.

En el 2003 se describió un defecto en la expresión del coestimulador inducible de los LT (ICOS), en un grupo de pacientes con IDVC, debido a una mutación del gen de esta proteína<sup>46</sup>. Este defecto molecular demostró ser el responsable de la hipogammaglobulinemia también en otro grupo de pacientes previamente diagnosticados de IDVC<sup>47</sup>. ICOS es una molécula coestimuladora de la familia de CD28, presente en los linfocitos T, implicada en la colaboración T-B. A diferencia del CD28, que se expresa constitutivamente en células en reposo, ICOS se expresa rápidamente en la membrana de la célula T después de la activación por la vía del TCR<sup>48</sup>.

En un otro grupo de pacientes con IDVC se han hallado (año 2004) defectos en las moléculas: BAFF-R (receptor for B cell-activating factor), y TACI (transmembrane activator, calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor), miembros de la familia del receptor de TNF<sup>49,50</sup>. Ambas moléculas están involucradas en la transducción de señal que resulta en el cambio de isotipo del linfocito B<sup>51</sup>. La mutación en un alelo del gen de TNFRSF13B, que codifica TACI, ha sido encontrado no solo en pacientes con IDVC sino también en uno de los 16 pacientes con DIgA estudiados por E. Castigli y colaboradores en un trabajo publicado recientemente (año 2005)<sup>52</sup>.

### 1.3. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ACTUALES

Una de las estrategias para investigar la etiología de la IDVC se basa en disminuir la diversidad del síndrome, clasificando a los pacientes en subgrupos, en función de sus características inmunológicas, y así, una vez obtenida una cierta homogeneidad en las muestras, intentar elucidar la/s posible/s etiología/s del síndrome<sup>21,43,53,54</sup>.

Bryant y colaboradores<sup>43</sup> describieron un método de clasificación de los enfermos con IDVC basándose en la capacidad de sus células B de producir inmunoglobulinas IgG e IgM *in vitro*. Los pacientes del grupo A fueron incapaces de producir ningún isotipo de inmunoglobulinas *in vitro*, los del grupo B secretaban sólo IgM y los pertenecientes al grupo C respondían como el grupo control de individuos sanos. La técnica de la producción de inmunoglobulinas "*in vitro*" es bastante laboriosa y su valoración requiere mucha experiencia. Seguramente esta sea una de las razones de la variación entre resultados de diferentes trabajos, dificultando la comparación entre sí. Por estos motivos, la clasificación ha caído en desuso.

Recientemente, un grupo científico de Freiburg (Alemania)<sup>53</sup> describió una nueva **clasificación de los pacientes con IDVC**, posteriormente modificada por otro grupo de París (Francia)<sup>54</sup>, basada en el inmunofenotipo de sus células B de memoria. Estas células son las responsables del rápido y eficaz inicio de la producción de anticuerpos específicos en respuesta repetida a cualquier patógeno. Desde que se identificó la molécula CD27, como el marcador de célula B de memoria<sup>55</sup>, varios grupos de investigación describieron su disminución en pacientes con IDVC<sup>53,54,56-58</sup>.

La gran heterogeneidad clínica del DlgA y la IDVC podría ser la consecuencia también de la actuación de factores moduladores secundarios a los defectos etiológicos primarios de base.

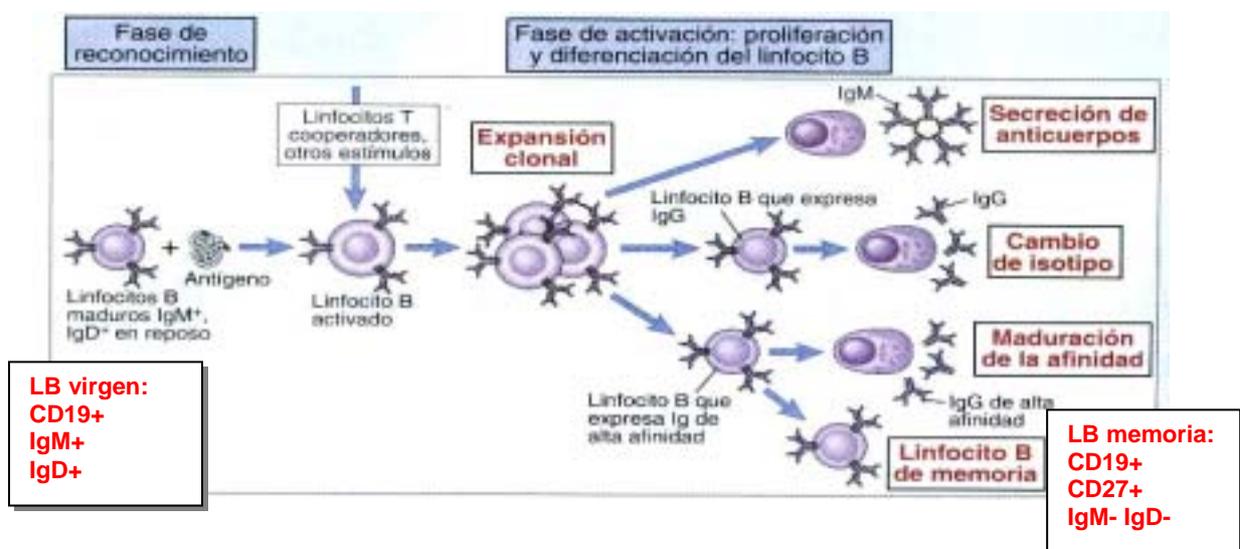
La teoría de los llamados **factores moduladores del fenotipo clínico** postula que el conjunto de las pequeñas variaciones genéticas del sistema inmunitario determina la capacidad individual para responder a los patógenos<sup>59</sup>. Los candidatos a estudiar como factores moduladores de la expresión clínica y su papel en las reacciones inflamatorias<sup>59,60</sup> son las moléculas de la respuesta innata del sistema inmunitario (lectina de unión a manosa, factor de necrosis tumoral, mieloperoxidasa, receptor gamma del fragmento Fc, etc.). Se ha demostrado que los polimorfismos de diferentes moléculas del sistema inmunitario innato están asociados a una mayor

susceptibilidad a las infecciones en pacientes con enfermedades crónicas<sup>61</sup>. En los últimos años, el interés ha recaído en el estudio de la lectina de unión a manosa (MBL), molécula sérica que juega un papel importante en la primera línea de defensa frente a múltiples bacterias y virus patógenos y en las reacciones inflamatorias consecuentes<sup>62</sup>.

### 1.3.1. NUEVA PROPUESTA PARA LA CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON IDVC

La clasificación propuesta por los grupos científicos de Freiburg (Alemania)<sup>53</sup> y Paris (Francia)<sup>54</sup> se basa en la cuantificación de las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria en sangre periférica, identificadas mediante citometría de flujo, utilizando como marcadores anticuerpos anti-IgD y CD27. La molécula CD27 pertenece a la familia de los genes del receptor de TNF. Se expresa en un subgrupo de linfocitos B en sangre y ganglios linfáticos y en la superficie de los linfocitos T circulantes<sup>64</sup>.

En el curso del desarrollo del LB virgen o *naive* (LB IgD+IgM+), que sale de médula ósea y sigue su proceso de maduración y diferenciación a célula plasmática, o LB de memoria, en los tejidos linfoides secundarios, la mayoría de los linfocitos pierde la expresión de IgD e IgM de su superficie, **figura 1.3**.



**Figura 1.3.** La activación de la célula B se inicia por el reconocimiento específico del antígeno, que junto a otros estímulos, y la acción de los linfocitos T cooperadores, promueve la proliferación y diferenciación del clon específico de linfocitos B. Parte de la progenie de este clon sintetiza IgM, otras células sufren un cambio de isotipo para producir otras clases de Igs (p.ej., IgG) y otras, después de un proceso de maduración de la afinidad, persisten como células de memoria, las principales efectoras de la respuesta humoral secundaria. Modificado de Abbas, 2002, p190, Fig 9-1.

En la sangre periférica humana, los linfocitos B que expresan CD27 (LB CD27+) se subdividen en al menos dos grupos: células que mantienen la expresión de IgD e IgM (LB CD27+IgD+IgM+) y células que no (LB CD27+IgM-IgD-)<sup>65,66</sup>. Los linfocitos B CD27+IgD-IgM- son los LB de memoria funcionales; es decir, son las células B que efectuaron el cambio de isotipo y son capaces de producir inmunoglobulinas de todo tipo (IgG, IgA, e IgE). Mientras que los LB CD27+IgD+IgM+ corresponden a los LB de memoria no funcionales, los que no han efectuado el cambio de isotipo y sintetizan únicamente la IgM.

Según la proporción de subpoblaciones de LB de memoria (BM) en sangre periférica, definidas en base a la expresión de los marcadores IgD y CD27, es posible clasificar a los pacientes con IDVC en 3 grandes grupos<sup>54</sup> (clasificación BM): 1.- **Grupo BM0**, pacientes sin LB de memoria (LB CD27-); 2.- **Grupo BM1**, pacientes con LB de memoria no funcionales (LB de memoria sin cambio de isotipo, LB CD27+IgD+); y 3.- **Grupo BM2**, pacientes con LB de memoria de ambos tipos (LB de memoria con cambio de isotipo, LB CD27+IgD- y LB de memoria sin cambio de isotipo LB CD27+IgD+) en una proporción igual a la población general sana.

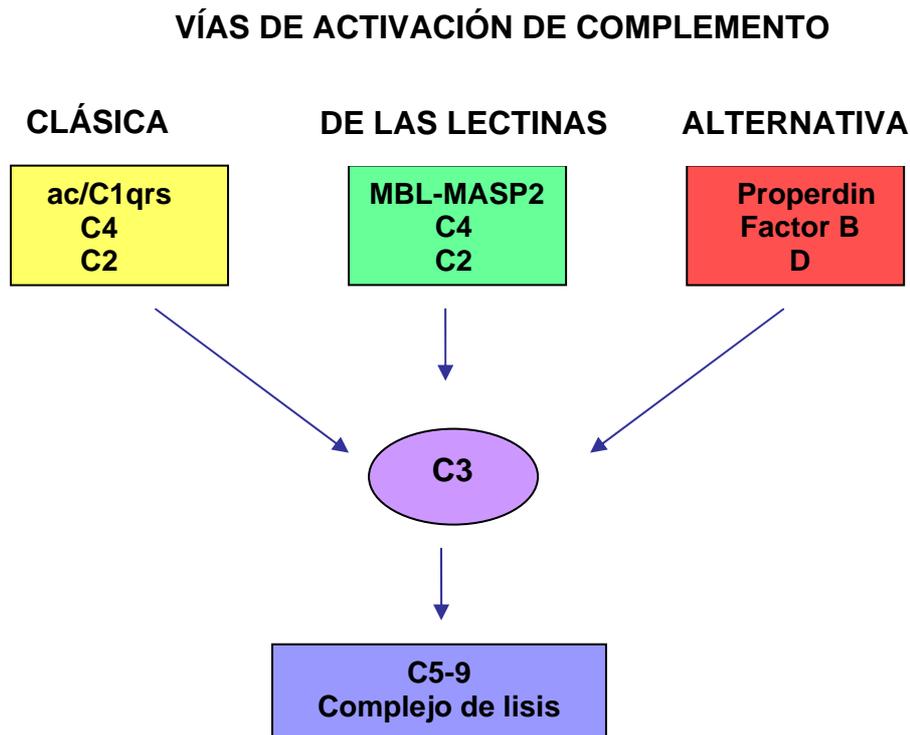
Se observó una proporción superior de manifestaciones linfoproliferativas y granulomatosas en los pacientes afectados de IDVC que pertenecían al grupo BM0 (sin linfocitos B de memoria) y de esplenomegalia en los pacientes del grupo BM0 y BM1 (presencia de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo)<sup>54</sup>.

### **1.3.2. MBL COMO FACTOR MODULADOR DEL FENOTIPO CLÍNICO**

La lectina de unión a manosa (MBL del inglés Mannose-binding lectin) es una molécula sérica producida por el hepatocito como proteína de fase aguda. Funciona como opsonina y activa al complemento por la vía de las lectinas. Sus defectos se han asociado a complicaciones infecciosas y autoinmunes y a un peor curso de la enfermedad, sobre todo en personas con defectos congénitos o adquiridos de la respuesta inmunitaria<sup>62</sup>. Un trabajo reciente sobre la asociación del déficit de MBL con el comienzo temprano de la sintomatología y el desarrollo de enfermedades autoinmunes en pacientes con IDVC, parece indicar su implicación en el fenotipo clínico de estos pacientes<sup>63</sup>.

### 1.3.2.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MBL HUMANA

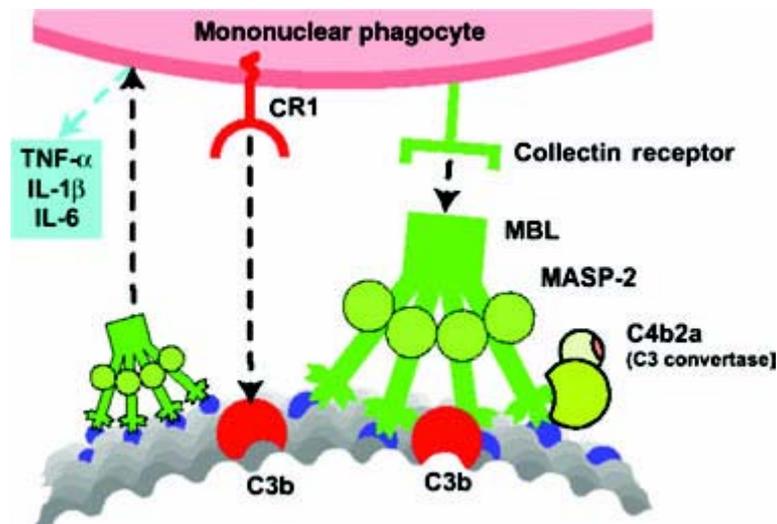
La MBL es una proteína de la familia de las colectinas. Se trata de una molécula multimérica que se une a los patógenos y activa al complemento, independientemente de los anticuerpos, por la vía de las lectinas<sup>62</sup>, **figura1.4**.



**Figura 1.4.** La MBL activa el complemento por una vía independiente de los anticuerpos (ac). Modificado de *Immunology Review* 2001, Jack, D.L. *et al.*

La unidad estructural primaria de la MBL consta de una molécula helicoidal de 96 kDa compuesta por tres cadenas idénticas de 32 kDa cada una, con su dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidrato<sup>62</sup>. La MBL se encuentra en la circulación en varias formas estructurales desde simples monómeros, dímeros o trímeros, hasta oligómeros. La capacidad de MBL de activar el complemento depende de la presencia, relativamente abundante, de los oligómeros, penta- y hexámeros en el plasma, ya que sólo éstos son capaces de unirse y activar a las serín-proteasas asociadas a la MBL, MASP-1 y MASP-2<sup>67</sup>.

La MBL se une a los motivos repetitivos de manosa y N-acetylglucosamina, expuestos con alta densidad en la superficie de bacterias, virus, hongos y protozoos, pero ausentes en la superficie de las células de los mamíferos. Una vez unida a los patógenos, la MBL sufre cambios conformacionales: las serín-proteasas asociadas a la MBL, MASP-1 y MASP-2, se activan y comienza la activación del complemento<sup>67</sup>. El sustrato de la MASP-2 (la serín proteasa más estudiada) son los componentes del complemento C2 y C4 y su actividad puede que esté inhibida por el inhibidor de esterasa C1<sup>67</sup>. En la **figura1.5** se explican de forma simplificada algunas de las funciones biológicas de la MBL.



**Figura1.5.** La MBL se une a superficies microbianas y facilita la opsonofagocitosis mediante varios mecanismos. Uno de los más importantes es la activación del complemento por la vía de las lectinas. Esta vía es mediada por la serín proteasa MASP-2 y lleva a la creación de la C3-convertasa, C4b2a. La C4b2a escinde el C3 y genera múltiples fragmentos C3b que se unen de forma covalente a la superficie del microbio. Estos fragmentos son reconocidos por los receptores CR1 (CD35) de los fagocitos. Además, varios trabajos sugieren que la MBL está siendo reconocida por algún receptor de colectinas todavía no identificado. Y por último, la MBL promueve la inflamación mediante su dosis dependiente modulación de la liberación de las citocinas de los monocitos. *Molecular Immunology* 2003, Turner, M.W.

### 1.3.2.2. EL GEN DE LA MBL HUMANA

El gen de la MBL humana<sup>68</sup>, el MBL2 (el MBL1 es un pseudogen), está en el cromosoma 10q11.2-q21. Se han descrito tres polimorfismos estructurales del exón 1, que junto con otros tres polimorfismos de su promotor, condicionan la concentración plasmática de MBL. Los polimorfismos del exón 1 consisten en la sustitución de un simple nucleótido en el codón 52 (Arg-Cys), comúnmente denominado alelo “D”, en el codón 54 (Gly-Asp), denominado alelo “B” y en el codón 57 (Gly-Glu), denominado alelo “C”. Estos polimorfismos estructurales interrumpen el motivo repetitivo de Gly-X-Y del exón 1 o interrumpen la unión disulfídica N-terminal e impiden el ensamblaje de las unidades estructurales básicas de la MBL (alelo B y C) o comprometen su estabilidad (alelo D). La presencia de cualquier alelo estructural mutado del gen MBL2 se denomina comúnmente “O” y el alelo sin mutaciones, “A” (wild-type). Los homocigotos para alelos no mutados son “A/A”, los individuos heterocigotos para la mutación estructural son “A/O” y los homocigotos o heterocigotos compuestos son “O/O”.

En la región promotora y la región 5'-no traducida del gen MBL2 se han descrito otros tres polimorfismos: la sustitución de un simple nucleótido en la posición -550 (G-C, alelos H/L), -221 (G-C, alelos X/Y) y +4 de la región 5'-no traducida (C-T, alelos P/Q). Los alelos -550 y -221 forman haplotipos HY, LY, LX que corresponden a los productores de niveles altos, medios y bajos de MBL plasmática, respectivamente. Los alelos P/Q son muy infrecuentes en la población caucasiana y no parecen tener repercusión sobre los niveles plasmáticos de la MBL<sup>68</sup>.

A causa de un gran desequilibrio de unión entre los polimorfismos presentes en el promotor y en el exón 1 del gen humano MBL2, sólo se han identificado siete haplotipos comunes (HYPA, LYPA, LXPA, LYQA, HYPD, LYPB, LYQC). Cada individuo presenta 2 de estos siete haplotipos. Por tanto estas combinaciones de haplotipos dan lugar a 28 genotipos de la MBL diferentes<sup>67</sup>.

La prevalencia de los polimorfismos estructurales de MBL entre la población caucasiana sana es aproximadamente 5% para los homocigotos y 30% para los heterocigotos<sup>62</sup>. Varía según la etnia y tipo de polimorfismo estudiados<sup>67,69,70</sup>. La prevalencia de los polimorfismos de MBL es más alta en pacientes con infecciones recurrentes<sup>71,72</sup> y enfermedades autoinmunes<sup>73-75</sup>.

### 1.3.2.3. CONCENTRACIÓN DE MBL

La MBL es una proteína de fase aguda de la inflamación y ha sido descrito que su concentración plasmática es más alta en pacientes con signos de inflamación que en controles sanos<sup>76</sup>. Los estudios sobre la cinética de la MBL en respuesta a la inflamación son escasos. Los cambios en su concentración durante la respuesta inflamatoria no parecen seguir el patrón de otros reactantes de fase aguda, como puede ser la proteína C reactiva o las citocinas proinflamatorias (interleucina-1 o 6)<sup>76</sup>.

En condiciones fisiológicas, la MBL aumenta después de nacimiento, alcanza el máximo a los 5 meses de vida y posteriormente disminuye hasta conseguir, pasados los 12 años de vida, los valores de adultos<sup>77</sup>. Los niveles de MBL más altos a los 5 meses de vida coinciden con el periodo de adaptación ambiental de los niños y reflejan la fase aguda de la respuesta inmune frente a la entrada masiva de los antígenos alimentarios. En comparación con los adultos, los niveles de MBL en los niños son superiores hasta pasados los 12 años. Esta diferencia se podría explicar por el número mayor de infecciones en este periodo de vida y por la subsiguiente necesidad aumentada de MBL<sup>77</sup>.

Los resultados de estudios asociando genotipo y niveles plasmáticos de MBL varían según la población seleccionada. Existe un importante solapamiento entre las concentraciones correspondientes a los diferentes polimorfismos del gen de la MBL<sup>78</sup>. Mientras que los homocigotos O/O tienen niveles plasmáticos de MBL proteica indetectables en casi todos los ensayos publicados, los niveles entre los A/O y A/A se solapan y este solapamiento no se puede explicar sólo por los diferentes polimorfismos del promotor del gen de la MBL asociado a los polimorfismos estructurales<sup>79</sup>.

Inicialmente se creyó que este solapamiento entre los genotipos A/O y A/A se podría resolver mediante ensayos específicos para la MBL funcional<sup>80</sup>. Éstos ensayos detectan sólo las formas oligoméricas grandes, las que son capaces de activar el complemento, dejando de lado a los dímeros y trímeros de la MBL no funcionales, detectados en los ensayos proteicos<sup>79</sup>.

Se crearon dos tipos de ensayos para la valoración de la MBL funcional<sup>80</sup>. Mientras que uno mide directamente la MBL unida a manosa en fase sólida, otro determina la

cantidad de C4b depositado, tras la activación de MBL por unión a manosa<sup>79</sup>. Ambos ensayos siguen mostrando solapamiento de concentraciones entre diferentes variantes genotípicas de MBL.

#### 1.3.2.4. DÉFICIT DE MBL Y LA CLÍNICA

Se ha descrito un amplio rango de infecciones asociadas al déficit de MBL, tales como: infecciones respiratorias (rinitis purulenta, amigdalitis pultácea, otitis media, bronquiolitis, neumonía), meningitis, septicemia, osteomielitis, diarrea crónica, infecciones del tracto urinario, de la piel (celulitis, abscesos) y también fiebre de origen desconocido.

Los gérmenes responsables de estas infecciones son mayoritariamente Neumococo, Meningococo, *Hemofilus Influenzae*, Estreptococo, *Estafilococcus Aureus* y *Estafilococcus Epidermidis*, *Neiseria Meningitidis*, *E. Coli*, Klebsiela, Proteus, Pseudomonas, *Candida Albicans*, Criptosporidium y Salmonella.

En el trabajo de Summerfield *et al*<sup>81</sup>, el 76% de los homocigotos O/O sufrieron infecciones severas (septicemia, meningococemia, amigdalitis pultácea) y el 69% de los heterocigotos presentaron infecciones menos severas. En un estudio prospectivo reciente, Koch *et al*<sup>82</sup> observaron que los niños con déficit de MBL tenían un riesgo dos veces mayor de padecer infecciones respiratorias agudas (IRA), que los niños con el genotipo MBL normal.

Otros estudios encuentran mayor susceptibilidad a las infecciones incluso en los adultos MBL-deficientes, con o sin otra patología de base<sup>71,83</sup>.

En el caso de las inmunodeficiencias adquiridas o congénitas, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades crónicas, la MBL se considera un factor modulador de la expresión clínica de la enfermedad, dando lugar a un mayor número de complicaciones infecciosas, autoinmunes y alérgicas y una mayor severidad y peor pronóstico de la enfermedad en los pacientes con déficit de MBL. Foster *et al*<sup>81</sup> publicaron la asociación de la presencia de variantes alélicas de MBL con el desarrollo de complicaciones autoinmunes en la enfermedad granulomatosa crónica. Garred *et al*<sup>84</sup> y Gabolde *et al*<sup>85</sup> encontraron la asociación de la presencia de variantes alélicas de MBL con una mayor gravedad y peor pronóstico de la

fibrosis quística. Garred *et al*<sup>66</sup> han hallado asociación entre el déficit de MBL y una mayor susceptibilidad para la infección por VIH y progresión al SIDA. Wang *et al*<sup>67</sup> sugieren que el polimorfismo de MBL es un factor genético para el desarrollo del síndrome de Sjögren. Jacobsen *et al*<sup>68</sup> concluyen que los pacientes con poliartritis juvenil, homocigotos para variantes alélicas de MBL, tienen mayor riesgo de desarrollar una artritis reumatoide erosiva.

No existe consenso sobre los criterios diagnósticos del déficit de MBL<sup>62,67</sup>. Los valores que se utilizan, de forma arbitraria para definir el déficit de MBL varían entre los indetectables, inferiores a 100, 160, 500 o incluso 1000ng/ml. Otros definen como el déficit la presencia de las variantes genotípicas de la MBL. Dada la reciente aparición de posibilidades de uso terapéutico de la MBL recombinante<sup>67,89</sup>, es muy importante llegar a definir el déficit de MBL en cuanto a la concentración plasmática de MBL y/o las variantes genotípicas correspondientes, que a su vez facilitarían la comparación entre los diferentes estudios poblacionales.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1. ANTECEDENTES

- En los pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC) y Déficit de IgA (DIgA) existe una gran heterogeneidad de manifestaciones clínicas, en cuanto a la incidencia y gravedad de las infecciones, enfermedades autoinmunes y manifestaciones linfoproliferativas.
- Se desconocen los defectos moleculares etiopatogénicos responsables de la IDVC y DIgA.
- Se desconoce si existen factores asociados a una peor evolución de estos pacientes.
- Los linfocitos B de memoria son células clave en el proceso de formación de los anticuerpos.
- Los pacientes con IDVC se pueden clasificar en grupos basándose en la cuantificación de las subpoblaciones de sus linfocitos B de memoria.
- La lectina de unión a manosa (MBL) actúa como un factor modulador del fenotipo clínico de diversas patologías, dando lugar al desarrollo de complicaciones infecciosas o autoinmunes en los individuos con déficit de MBL.
- No existe consenso sobre la definición del déficit de MBL, en cuanto a la concentración de la proteína y/o genotipo de la MBL.
- La MBL se considera reactante de fase aguda pero los estudios de la cinética de la misma durante la infección son escasos.
- Los resultados de estudios asociando genotipo y niveles plasmáticos de MBL varían según la población seleccionada.

## 2.2. HIPÓTESIS

- A) Existe una asociación entre los defectos en la presencia de subpoblaciones de los linfocitos B de memoria y el fenotipo clínico de los pacientes con IDVC.
- B) El estudio de las concentraciones plasmáticas de MBL en una población de individuos que no hayan padecido infecciones permitirá identificar los polimorfismos del gen de la MBL responsables de niveles plasmáticos de MBL bajos, intermedios y altos.
- C) La MBL actúa como factor modulador del fenotipo clínico en pacientes con DIgA y IDVC, dando lugar a una mayor gravedad de las infecciones y/o desarrollo de enfermedades autoinmunes en los pacientes con niveles bajos de MBL.

## 2.3 OBJETIVOS

**A) Estudiar la asociación entre los defectos en la presencia de las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria y las manifestaciones clínicas de los pacientes con IDVC.**

- 1) Clasificar a los pacientes con IDVC según la cuantificación de las subpoblaciones de sus LB de memoria.
- 2) Comparar las manifestaciones clínicas respiratorias, digestivas, autoinmunes y linfoproliferativas, y características inmunológicas entre los grupos de pacientes con IDVC, clasificados según la cuantificación de las subpoblaciones de los LB de memoria.

**B) Estudiar la posibilidad de clasificar los diferentes genotipos de la MBL en grupos, basándose en las determinaciones de concentraciones plasmáticas de MBL, en individuos que no hayan padecido infecciones.**

- 1) Estudiar la asociación entre las concentraciones plasmáticas de MBL proteica y funcional y los polimorfismos del gen de MBL en una población de individuos que no hayan padecido infecciones (recién nacidos seleccionados).
- 2) Identificar los genotipos de MBL responsables de valores plasmáticos de MBL bajos, intermedios y altos.

**C) Estudiar la influencia de MBL en la variabilidad clínica de los pacientes con IDVC y DIgA.**

- 1) Comparar las concentraciones plasmáticas de MBL proteica y funcional en los pacientes con IDVC y DIgA, agrupados según la patología clínica estudiada.
- 2) Clasificar a los pacientes con IDVC y DIgA en productores de MBL con valores bajos, intermedios y altos, según el modelo establecido en la población de recién nacidos.
- 3) Comparar las manifestaciones clínicas respiratorias, digestivas, autoinmunes, linfoproliferativas y alérgicas entre los pacientes con IDVC y DIgA, agrupados en productores de MBL con valores bajos, intermedios y altos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

### 3.1.1. GRUPO CONTROL

El grupo control estuvo formado por 45 individuos, 20 varones y 25 mujeres sanos, donantes del Banco de Sangre y Tejidos del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Su edad osciló entre 21 y 67 años, con una media de 38 años. La existencia de una hipogammaglobulinemia o DIgA en esta población se excluyó mediante una cuantificación de inmunoglobulinas.

### 3.1.2. GRUPOS DE PACIENTES

#### 3.1.2.1 PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

Este grupo estuvo formado por pacientes diagnosticados de IDVC, según los criterios establecidos por WHO immunodeficiency group IUIS<sup>2</sup>, y en seguimiento clínico en la Consulta de Inmunodeficiencias Primarias del Servicio de Neumología del Área General del Hospital Universitario Vall d'Hebron (30 pacientes), en la Consulta de Inmunodeficiencias del Área Infantil del Hospital Universitario Vall d'Hebron (4 pacientes) y en la consulta de Medicina Interna del Hospital de Bellvitge (7 pacientes).

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

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

En el estudio se incluyeron 41 pacientes, 20 mujeres y 21 varones, con edades comprendidas entre 14 y 64 años, con una media de 37 años. En las **tablas 3.1. y 3.2.** se resumen los datos clínicos y analíticos de los 41 pacientes en el momento del diagnóstico. Todos los pacientes presentaron valores de IgG < 450 mg/dl o valores de IgG < 600 mg/dl, IgA y/o IgM disminuidos y ausencia de la producción de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación.

### **3.1.2.2. PACIENTES CON DÉFICIT DE IgA**

Este grupo estuvo formado por pacientes diagnosticados del Déficit de IgA (DIgA), según los criterios establecidos por WHO immunodeficiency group IUIS<sup>2</sup>, que se visitaron en el periodo comprendido entre Junio y Diciembre de 2003 en las Consultas de Inmunodeficiencias Primarias del Servicio de Neumología y de Inmunología Clínica del Área General del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

En el estudio se incluyeron 46 pacientes, 25 varones y 21 mujeres, con diagnóstico inmunológico del DIgA (valor de la IgA sérica inferior a 7mg/dl), con edades comprendidas entre 16 y 77 años, con una media de 34 años.

### **3.1.3. GRUPO DE RECIÉN NACIDOS**

Este grupo estuvo formado por recién nacidos (RN) del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el periodo comprendido entre el 10 de Noviembre de 2002 y el 7 de Febrero de 2003, de padres españoles, caucasianos, de embarazo controlado y sin malformaciones congénitas cardíacas, digestivas o pulmonares conocidas.

**Se incluyeron** en el estudio niños nacidos a término o posteriormente a las 36 semanas de gestación, con peso al nacer superior a 2000 gramos y cuyas madres no hubieran padecido una infección grave o moderada, según los criterios definidos por la Infectious Diseases Society of America<sup>90</sup>, durante el último trimestre del embarazo.

Este grupo estuvo formado por 423 RN, 211 niños y 212 niñas, nacidos entre 36 y 42 semanas de gestación, con una media de 39,6 semanas, con un peso al nacer entre 2000g y 4430g, con una media de 3221g.

*Todos los pacientes o sus representantes legales, en el caso de los menores de edad, controles y padres de los RN recibieron la información verbal y escrita para el consentimiento firmado.*

Tabla 3.1. Datos clínicos iniciales y al diagnóstico de los pacientes con IDVC incluidos en el estudio.

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

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

Tabla 3.2. Datos inmunológicos al diagnóstico de los pacientes con IDVC incluidos en el estudio.

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

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

### **3.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS DE LOS PACIENTES CON IDVC Y DIgA**

Los datos clínicos e inmunológicos se obtuvieron mediante una revisión detallada de la historia clínica de los pacientes en cada uno de los centros clínicos y también mediante entrevista personal dirigida de todos los pacientes.

Los estudios analíticos y pruebas complementarias que se realizan a todos los pacientes con IDVC son: hemograma completo, cuantificación de inmunoglobulinas séricas, determinación de subpoblaciones y función linfocitarias, pruebas de función respiratoria (PFR), tomografía axial computarizada (TAC) de tórax y abdomen y radiografía de senos paranasales.

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

Todas las pruebas listadas arriba se realizan también a los pacientes con DIgA cuyas manifestaciones clínicas lo requieren, en el momento del diagnóstico y posteriormente siempre cuando es necesario.

Para el presente estudio se utilizaron los resultados más recientes de las pruebas descritas anteriormente. Para valorar las bronquiectasias, esplenomegalia y aumento de ganglios linfáticos, se recogieron los resultados del TAC toraco-abdominal realizado a cada paciente a lo largo de su último control clínico regular en el año 2004-2005. En los pacientes con bronquiectasias se valoró la presencia o no de expectoración. Los parámetros de función pulmonar que se valoraron fueron el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEMS) y la capacidad vital forzada (CVF). Los valores se expresaron como porcentaje de los predictivos establecidos por Roca *et al*<sup>91</sup>. Enfermedad pulmonar crónica (EPC) fue definida cuando en los pacientes con bronquiectasias los valores espirométricos fueron inferiores al 80% de los valores predictivos<sup>91</sup>.

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

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

### 3.2.1. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

La cuantificación de los linfocitos T, B y NK se realizó en la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) mediante citometría de flujo (CMF, ver plantillas de análisis de subpoblaciones linfocitarias, Anexo N°5) en un FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences (BDBs), San Jose, CA, EEUU) con los siguientes AcMo marcados con fluorocromos suministrados por la misma empresa comercial: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD16+anti-CD56. En la **tabla 3.3** se muestran las subpoblaciones linfocitarias así identificadas y los rangos de referencia, en porcentajes y números absolutos.

**Tabla 3.3.** Subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica. Se muestran los marcadores CD que identifican las subpoblaciones linfocitarias y sus rangos de normalidad para la población adulta.

Tipo de marcador anti-CD utilizado	Características linfocitarias	Rango de normalidad	
		%	x 10 <sup>9</sup> / L
CD3+	Linfocito T (LT)	55.0 – 84.0	0.69 – 2.54
CD4+ CD3+	LT Colaboradores	31.0 – 60.0	0.41 – 1.59
CD8+ CD3+	LT citotóxicos	13.0 – 41.0	0.19 – 1.14
Índex CD4+ / CD8+		1.1 – 1.4	
CD19+	Linfocitos B (LB)	6.0 – 25.0	0.09 – 0.66
CD56+ CD16+ CD3-	NK	5.0 – 27.0	0.09 – 0.59

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

### 3.2.2. FUNCIÓN LINFOCITARIA

La valoración de la función de los linfocitos T se realizó igualmente en la Unidad de de Inmunología del HUVH, mediante CMF en linfocitos previamente estimulados<sup>92</sup>. Se detectó la expresión de la molécula CD69 (con el AcMo anti-CD69 marcado con fluorocromo, suministrado por BDBs) en células T CD3+, CD4+ y CD8+ tras la estimulación con PHA (Phytohemagglutinin de GIBCO, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) y anti-CD3 (PeliCluster CD3 de Sanquin Amsterdam, Holanda) durante 16 horas.

Los rangos de referencia en porcentajes fueron los siguientes:

<u>CD69+ CD3+</u> en respuesta a PHA .....	> 65 %
<u>CD69+ CD4+</u> en respuesta a Anti- CD3.....	> 46 %
<u>CD69+ CD8+</u> en respuesta a Anti- CD3.....	> 31 %

### 3.2.3. INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS

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

### 3.2.4. SUBCLASES DE IgG

La cuantificación de subclases de IgG se realizó en la Unidad de Inmunología del HUVH por un método de ELISA. Los valores de referencia establecidos para la edad adulta fueron<sup>93</sup>: IgG1 = 261 - 1081 mg/dl, IgG2 = 112 - 408 mg/dl, IgG3 = 22 - 288 mg/dl, IgG4 = 5 - 156mg/dl.

### 3.2.5. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

La valoración de la capacidad de producción de anticuerpos específicos se realizó en la Unidad de Inmunología del HUVH por un método de ELISA. Se valoró la

producción de los anticuerpo frente a antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo B (HiB). Para la vacunación de los pacientes se utilizaron la vacuna pneumocócica PNU-Immune 23 polivalente (Lederle Laboratories División, Pearl River, NY), que incluía 23 serotipos y la vacuna PedvaxHiB (Merck Sharp & Dohme, West Point, PA). Para valorar la respuesta positiva se midió la concentración de los anticuerpos específicos en dos muestras, una antes de la administración de la vacuna y otra 21 días después<sup>32,33</sup>.

La determinación de anticuerpos específicos frente a *Streptococcus pneumoniae* se realizó por un método de ELISA utilizando como el antígeno la vacuna pneumocócica, la misma que se utilizó para la vacunación de los pacientes. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA) utilizando un suero de referencia calibrado frente a una preparación llamada PN-A, procedente de la European Quality Scheme (Oxfordshire Health Authority, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kindom) con el valor asignado de 70 unidades/ml de IgG anti-neumococo. Se consideró respuesta positiva, el aumento de la concentración de IgG anti-neumococo de al menos 395 UA/ml sobre el valor basal (el valor prevacunal)<sup>32</sup>.

La determinación de anticuerpos específicos frente a HiB se realizó por un método de ELISA utilizando como antígeno el polisacárido HiB conjugado a albúmina sérica humana, descrita por M.J. Rodrigo y colaboradores<sup>33</sup>. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/ml}$  utilizando el suero de referencia de 70  $\mu\text{g/ml}$  de Center of Biological Evaluation and Review, U.S. Food and Drug Administration (FDA). Se consideró respuesta positiva, el aumento de la concentración de IgG anti-HiB de al menos 2,28  $\mu\text{g/ml}$  sobre el valor basal (el valor prevacunal)<sup>33</sup>.

### **3.3. RECOGIDA DE DATOS DE LOS RECIÉN NACIDOS**

Los datos necesarios para la selección de RN para el estudio (ver población de estudio) se obtuvieron mediante revisión de las historias clínicas del seguimiento del embarazo y el informe de la sala del parto en el día del parto. Para completar o aclarar los datos del historial del embarazo y del parto se realizó una entrevista personal a los padres de RN seleccionados el primer día posparto.

Se recogieron y analizaron los siguientes datos de los RN: semanas de gestación, peso al nacer, presencia o no de la colonización rectovaginal maternal por *Streptococcus agalactiae*, presencia o no de diabetes gestacional, síndrome antifosfolípido y hipertensión gestacional. Número de cigarrillos que fumó la madre a diario durante el embarazo, presencia de procesos infecciosos agudos en el último trimestre del embarazo.

### **3.3. CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B**

La cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B (LB) se realizó según el protocolo cedido por el Dr. K. Warnatz del Hospital Universitario de Freiburg, Alemania<sup>53</sup>.

#### **3.3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

##### **3.3.1.1. TIPO DE MUESTRA**

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

##### **3.3.1.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS MEDIANTE UN GRADIENTE DE DENSIDAD**

1. La muestra de sangre periférica fue diluida a 1:2 con solución fisiológica y posteriormente depositada cuidadosamente sobre 3 ml de Lymphoprep (Fresenius Kabi Norge AS, Noruega) en tubo de plástico de 10 ml. La relación fue de 1/3 de Lymphoprep y 2/3 de sangre diluida.
2. Posteriormente se centrifugó a 1750 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente.

3. Una vez centrifugada se extrajo la capa blanca de células mononucleadas que apareció sobre la capa del Lymphoprep y se colocó en otro tubo de plástico de 10 ml para proceder a su lavado.
4. Finalmente se realizaron dos lavados con solución fisiológica a 1250 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

### **3.3.1.3. RECuento Y VIABILIDAD CELULAR, SUSPENSIÓN CELULAR**

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

### **3.3.1.4. TINCIÓN CELULAR**

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

1. Se colocó 50  $\mu$ l de la suspensión celular preparada en el paso anterior en un tubo de poliestireno
2. A dicha suspensión se añadieron los anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos, en la dilución y cantidad indicada en la **tabla 3.4**.
3. La suspensión celular así preparada se agitó suavemente y se incubó a 4°C, en la oscuridad durante 20 minutos.
4. A cada tubo se añadió 2 ml de Solución de lisis de BDBs y se incubó durante 5min a temperatura ambiente en oscuridad.
5. Los tubos se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a 20°C.

6. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de FACSFlow de BDBs.

**Tabla 3.4. AcMo utilizados para la tinción de las células mononucleadas.**

<b>Anticuerpo monoclonal</b>	<b>Dilución Previa</b>	<b><math>\mu</math>L /tubo</b>
Anti- <b>CD19</b> -PC7	Ninguna	2
Anti- <b>IgD</b> -PE	1:40	4
Anti- <b>CD27</b> -FITC	1:5	4

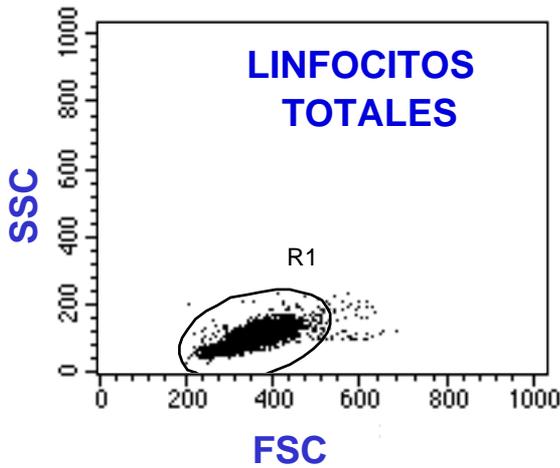
### **3.3.2. ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B**

Las muestras se adquirieron y analizaron en un citómetro FACSCalibur de BDBs que tiene incorporadas dos fuentes de laser (de 488 nm y de 633 nm). En la **figura 3.1.** se muestran las plantillas elaboradas con la versión 3.2 del programa CellQuest de BDBs para la adquisición y análisis de las muestras.

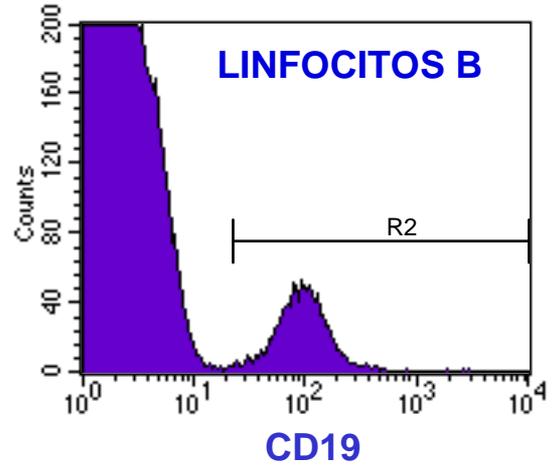
En cada estudio se incluyó una muestra de sangre control para establecer los límites de positividad y negatividad para cada fluorocromo y cada AcMo. La adquisición se limitó a la ventana creada en linfocitos, seleccionados en función de tamaño y granularidad (FSC y SSC, ver la región R1 en la **figura 3.1.**) y se terminó una vez adquiridas 5.000 células CD19+ (ventana en FL-3, ver la región R2 en la **figura 3.1.**).

Con este diseño de plantillas se pudo identificar y cuantificar las siguientes subpoblaciones de LB de sangre periférica<sup>54</sup>: a) Subpoblación de LB naive: LB CD27-IgD+, b) Subpoblación de LB de memoria sin cambio de isotipo: LB CD27+IgD+, y c) Subpoblación de LB de memoria con cambio de isotipo: LB CD27+IgD- (**figura 3.1.**).

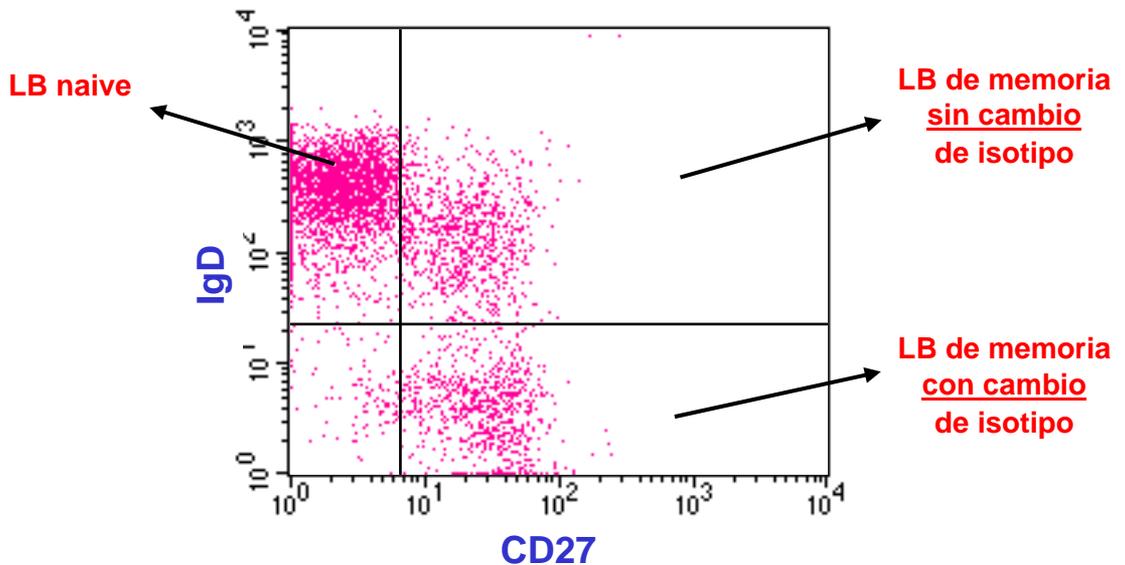
## Subpoblaciones de Linfocitos B (LB) determinadas mediante citometria de flujo.



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



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



Subpoblaciones de LB:

LB de memoria **sin cambio** de isotipo son células CD27+IgD+ (cuadrante superior derecha).

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

LB naive son células CD27-IgD+ (cuadrante superior izquierda).

**Figura 3.1.** Plantillas para la adquisición y análisis de las subpoblaciones de linfocitos B (LB) elaboradas con el programa CellQuest de Becton Dickinson Biosciencias (San José, California).

### 3.4. CUANTIFICACIÓN DE LA MBL PROTEICA Y FUNCIONAL

#### 3.4.1. TIPO DE MUESTRA

Se utilizó plasma obtenida a partir de la extracción de 5 ml de sangre total con EDTA 0,05% como anticoagulante del cordón umbilical de los recién nacidos y de la sangre venosa periférica de los controles y pacientes incluidos en el estudio. Las alícuotas de plasma se conservaron a -80°C hasta su estudio.

#### 3.4.2. MATERIALES

La detección de MBL proteica y MBL funcional en plasma se realizó mediante los equipos de ELISA de MBL oligomer ELISA Kit, (Kit 029) y MBL mannan-binding ELISA Kit, (Kit 030), respectivamente, ambas proporcionadas por el Antibodyshop de Gentofte, Dinamarca.

#### 3.4.3. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA MBL PROTEICA

##### 3.4.3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Es un ELISA tipo “*sándwich*” amplificado con el sistema de biotina-estreptavidina que utiliza como anticuerpo de captura y de detección anticuerpos IgG monoclonales de ratón anti-MBL humana (HYB 131-01 de Staten Serum Institute, Copenhagen de Dinamarca). Estudios mediante cromatografía demuestran que estos AcMo utilizados como Ac de captura y detección **son específicos para las formas de la MBL altamente oligomerizadas, no reconociendo los oligómeros más pequeños.**

Estos AcMo anti-MBL son específicos para su dominio de unión a carbohidrato. La MBL de las muestras unida a los AcMo en los pocillos es detectada con los mismos AcMo anti-MBL biotinilados. Los AcMo biotinilados se unen a las moléculas de la MBL oligoméricas vía el dominio de unión a carbohidrato que no está ocupado por la unión a los AcMo inmovilizados en el pocillo. La unión entre la MBL de las muestras y los AcMo biotinilados es revelada con HRP marcada con estreptavidina e

incubada con su sustrato para generar una reacción de color azul. La intensidad del color de la solución en cada pocillo es proporcional a la concentración de la MBL oligomérica en cada muestra y es cuantificada con la lectura a 450 nm de densidad óptica (DO) en un lector de microplacas de ELISAs. La concentración de la MBL oligomérica en cada muestra se calcula extrapolando la DO de la muestra problema en la curva estándar.

### **3.4.3.2. PROCEDIMIENTO**

1.- Cien  $\mu\text{L}$  de muestras de plasma diluidas a 1:100 y los calibradores de 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 40 ng/ml se incubaron por duplicado en los pocillos de placas de microtitulación sensibilizadas con AcMo anti-MBL durante 1 hora a temperatura ambiente. En cada una de las series analíticas se incluyeron dos pocillos “blancos” (pocillos con reactivos sin la muestra problema).

2.- Tras 3 lavados, cada pocillo de la placa de microtitulación se incubó con 100 $\mu\text{L}$  de solución de AcMo anti-MBL biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.- Tras 3 lavados, a cada pocillo se añadieron 100 $\mu\text{L}$  de solución de HRP conjugada con estreptavidina y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

4.- Tras 5 lavados, cada pocillo se incubó con 100 $\mu\text{L}$  de solución de tetrametilbencidina (TMB). Esta reacción enzimática se paró a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad añadiendo 100 $\mu\text{L}$  de solución de parado.

5.- La intensidad del color generado se cuantificó con la lectura a 450 nm de DO en el lector de microplacas de ELISA (Titertec Multiscan, Flow laboratories, Helsinki, Finlandia).

6.- La concentración de la MBL proteica en cada muestra se calculó extrapolando la DO de la muestra problema en la curva estandar y multiplicando el resultado por el factor de dilución.

### 3.4.4. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA MBL FUNCIONAL

#### 3.4.4.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Es un ELISA amplificado con el sistema de biotina-estreptavidina que utiliza como anticuerpo de detección anticuerpos IgG monoclonales de ratón anti-MBL humana (HYB 131-01 de Statens Serum Institute, Copenhagen de Dinamarca).

Se utilizan placas de microtitulación sensibilizadas con manosa de *Saccharomyces cerevisiae*. Las muestras son diluidas en el tampón que contiene calcio (la unión de la MBL con la manosa es calcio-dependiente) y la MBL unida a la manosa es detectada con los AcMo anti-MBL biotinilados. **La MBL pobremente oligomerizada (la MBL no funcional) no se une a la manosa o la unión con ésta es muy débil y es eliminada de los pocillos mediante los lavados. Así, bajo las condiciones específicas del procedimiento, la MBL no funcional, no se detecta.** Los AcMo anti-MBL se unen a la MBL cerca del dominio de unión a carbohidratos, que son los mismos dominios que utiliza la MBL para la unión a la manosa. Sólo la MBL altamente oligomerizada (MBL funcional) tiene suficientes dominios libres, una vez unida a la manosa, para la unión con los AcMo. Por eso, es un ensayo altamente selectivo para la MBL funcional.

La unión entre la MBL de las muestras y los AcMo biotinilados es revelada con HRP marcada con estreptavidina e incubada con su sustrato para generar la reacción de color. La intensidad del color de la solución en cada pocillo es proporcional a la concentración de la MBL funcional en cada muestra y es cuantificada con la lectura a 450 nm de densidad óptica (DO) en un lector de microplacas de ELISAs. La concentración de la MBL funcional en cada muestra se calcula extrapolando la DO de la muestra problema en la curva estándar.

#### 3.4.4.2. PROCEDIMIENTO

1.- Cien  $\mu\text{L}$  de muestras de plasma diluidas a 1:100 y los calibradores de 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ng/ml se incubaron por duplicado en los pocillos de placas de microtitulación sensibilizadas con manosa durante 1 hora a temperatura ambiente. En cada una de las series analíticas se incluyeron dos pocillos “blancos” (pocillos con reactivos sin la muestra problema).

2.- Tras 3 lavados, a cada pocillo de la placa de microtitulación se añadieron 100 $\mu$ L de solución de AcMo anti-MBL biotinilados durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.- Tras 3 lavados, cada pocillo se incubó con 100 $\mu$ L de solución de HRP conjugada con estreptavidina durante 1 hora a temperatura ambiente.

4.- Tras 5 lavados, a cada pocillo se añadió 100 $\mu$ L de solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB). Esta reacción enzimática se paró a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad añadiendo 100 $\mu$ l de solución de parado.

5.- La intensidad del color generado se cuantificó con la lectura a 450 nm de DO en el lector de microplacas de ELISA (Titertec Multiscan, Flow laboratories, Helsinki, Finlandia).

6.- La concentración de la MBL funcional en cada muestra se calculó extrapolando la DO de la muestra problema en la curva estandar.

### **3.4.5. CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN**

El límite de detección de la concentración de MBL, tanto proteica como y funcional mediante ELISA, se estableció como la concentración correspondiente a la media+3DE de la lectura de 8 “blancos”.

### **3.4.6. CALCULO DE LA PRECISIÓN INTRA- E INTERENSAYO**

**El coeficiente de variación (CV) intraensayo** se calculó como la media de los CV de los duplicados de las muestras. Se aceptó un CV intraensayo de hasta el 8%, el máximo generalmene aceptado para las técnicas de ELISA.

**Coeficiente de variación (CV) interensayo** se calculó a partir de los valores de 2 sueros de dos diferentes concentraciones analizados en 6 ensayos. Se aceptó un CV interensayo de hasta el 18%, el máximo generalmente aceptado para las técnicas funcionales de ELISA.

### **3.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA MBL**

El análisis genético se realizó con el objetivo de identificar los tres polimorfismos estructurales del primer exón (codón 52, 54 y 57) y los tres polimorfismos del promotor (-550 H/L, -221 X/Y, +4 P/Q) del gen de la MBL.

#### **3.5.1. TIPO DE MUESTRA**

Se utilizó ADN genómico extraído de células nucleadas obtenidas a partir de 5 ml de sangre total anticoagulada con EDTA 0,05% del cordón umbilical de los recién nacidos y de la sangre venosa periférica de los pacientes.

#### **3.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE TOTAL**

La extracción de ADN genómico de la sangre total anticoagulada se realizó mediante el método modificado de Cox *et al*<sup>95</sup> utilizando el reactivo de DNA-zol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).

##### **3.5.2.1. FUNDAMENTO**

Durante el procedimiento, las células blancas de sangre total, previa lisis de los eritrocitos, son homogenizadas en el reactivo de DNAzol (un detergente con contenido de sales de guanidina) seguido de la precipitación selectiva de ADN genómico con etanol. Tras el lavado con etanol rebajado al 95%, el ADN es solubilizado en NaOH 8mM.

El procedimiento consiste en las siguientes etapas:

- 1) Eliminación de glóbulos rojos con tampón de lisis de Tris-HCL 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 10mM.
- 2) Homogenización de células blancas en DNA-zol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).

- 3) Precipitación de ADN con etanol 100%.
- 4) Lavado de ADN con etanol 95%
- 5) Solubilización de ADN en NaOH 8mM.

### **3.5.2.2. PROCEDIMIENTO**

1. Se centrifugó la muestra de sangre total anticoagulada durante 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el plasma que apareció en la parte superior del tubo. El resto de la sangre se llevó a un tubo de 10 ml.
3. Se agregó 5 ml de tampón de lisis de eritrocitos de Tris-HCL 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y NaCl 10 mM.
4. La mezcla se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
5. Se eliminó el sobrenadante y se repitieron los pasos 3 y 4 hasta obtener un botón celular de color prácticamente blanco.
6. El botón celular blanco se mezcló por pipeteo con 1 ml de DNA-zol y se dejó actuar 1 hora a 4°C.
7. Se agregó 1 ml de etanol 100% y se mezcló invirtiendo el tubo hasta que apareció el precipitado del ADN en forma de medusa.
8. El ADN precipitado se trasladó a un tubo ependorf con 1 ml de etanol 95%. El ADN se lavó varias veces invirtiendo el ependorf, con etanol 95%.
9. Se retiró el etanol del último lavado y ADN se dejó secar a temperatura ambiente.
10. Una vez seco, el ADN se solubilizó en NaOH 8mM.
11. Las alícuotas de ADN se guardaron en el congelador -20°C hasta su utilización.

Para el genotipaje de la MBL se aceptaron muestras de ADN, cuyas purezas determinadas por el índice A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> oscilaron entre 1,61 y 2,32 y las concentraciones entre 0,05 µg/ml y 10 µg/ml.

### **3.5.3. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA MBL**

El análisis genético de las muestras se realizó en el laboratorio de Inmunología, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria por los Dres. Isabel García Laorden y Carlos Rodríguez Gallego.

### 3.5.3.1. TIPAJE GENÉTICO “COMERCIAL”

La mayor parte del análisis genético del gen de MBL2 se realizó utilizando el equipo de INNO-LiPA MBL2 (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica). El procedimiento se desarrolló en los siguientes pasos:

#### 1. AMPLIFICACIÓN

Se preparó el *master mix* de la reacción de amplificación:

N x 24.9  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril

N x 10  $\mu$ l de Buffer de amplificación (AB)

N x 10  $\mu$ l de solución de oligonucleótidos (Primer Solution = PS)

N x 0.1  $\mu$ l de Ampli Taq Polymerasa (Perkin-Elmer) (5U/ml)

(N=número de muestras + control negativo + 1)

Se repartieron 45  $\mu$ l de *master mix* en tubos de PCR (de 0.2 ml) y se añadieron 5  $\mu$ l del ADN genómico correspondiente en cada tubo. La concentración del ADN recomendada fue de entre 0.02-1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l. La concentración utilizada fue ajustada a unos 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l. En cada reacción se incluyó un control negativo con 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril. Para la amplificación se utilizó el termociclador PE9600 (9600 de Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, EEUU):

95°C	15'	1 ciclo
95°C	30"	} 35 ciclos
65°C	30'	
72°C	1'	
72°C	7'	1 ciclo
4°C		

Se visualizó el amplificado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 5  $\mu$ l de cada amplificado y una calle se reservó para un marcador de peso molecular. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV y fotografió. Aparecieron dos bandas de 473 y 379 pb por cada muestra.

## 2. HIBRIDACIÓN

Para la hibridación se utilizaron entre 7 y 10  $\mu$ l de los amplificadores (en función de la intensidad observada de las bandas en el gel). Para la hibridación reversa se utilizaron tiras de INNO-LiPA MBL2 (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica) con 12 sondas inmovilizadas.

Tanto la hibridación, como los posteriores pasos de lavado y revelado de color, se realizaron de forma automatizada en un aparato Auto-LiPA 48 (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica).

## 3. LECTURA DEL RESULTADO

La interpretación del patrón de reactividad de las sondas se realizó mediante el programa de análisis para Lipa MBL2 (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica).

### 3.5.3.2. TIPAJE GENÉTICO “MANUAL”

Parte de muestras se genotipó manualmente utilizando los protocolos modificados descritos por Madsen *et al*<sup>78</sup>, y Sullivan *et al*<sup>95</sup>. Los alelos B y C se detectaron por PCR con análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Los alelos D y P/Q se detectaron mediante PCR con mutagénesis dirigida de sitio (SDM)-RFLP. El genotipaje de las variantes del promotor H, L, X e Y, como y X e Y en relación a L y H se realizó mediante una PCR con primers específicos de secuencia. (PCR-SSP).

Para la PCR se utilizó el volumen de 50  $\mu$ l que contenía de 250 a 500 ng del ADN genómico, 1.25 U (para alelos estructurales) o 2 U (para variantes del promotor) de la polimerasa de ADN de AmpliTaq (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, EEUU), de 0.18 a 0.5  $\mu$ M de primers específicos, 0.2 mM de desoxinucleótidos trifosfato y 2.4 mM (PCR-SSP) o 1.5 (PCR y SDM-PCR) de MgCl<sub>2</sub>.

Los primers utilizados fueron los siguientes: PCR, directo: 5'-CCCAGATTGTAGGACAGAG-3' e inverso: 5'-AGTTGTTGTTCTCCT GTCCAG-3'; SDM-PCR para el alelo D, directo: 5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGACGCG-3' e inverso: 5'-CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3'; SDM-PCR para alelos P/Q,

directo: 5'- ACCCAGATTGTAGGACAGAGGGCAAGC-3' e inverso: 5'- TTGCAGAGACAGAACAGC-3'; PCR-SSP, directo para H y HY: 5'- GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3', para L, LX y LY 5'- TTACCCAGGCAAGCCTGTC-3', para X 5'-CATTTGTTCTCACTGCCACC-3', para Y 5'-CATTTGTTCTCACTGCCACG-3', e inverso para H, L, X e Y: el mismo primer utilizado en el SDM-PCR para alelo D, para LX 5'- GGAAGACTATAAACATGCTTTCCG-3' y para HY y LY 5'- GGAAGACTATAAACATGCTTTCC-3'.

Todas las PCR se iniciaron con un paso de desnaturalización de 2 minutos a 94°C y se finalizaron con un paso de extensión de 5 minutos a 72°C. Los ciclos de temperatura eran siguientes: PCR, 30 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 62°C y 120s a 72°C; SDM-PCR, 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 58°C (para el alelo D) o 55.5°C (para variantes P/Q) y 60s a 72°C; PCR-SSP, 30 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 65°C y 60s a 72°C; PCR-SSP para la posición cis/trans de las variantes de la región promotora, 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 60°C y 30s a 72°C. En cada reacción de SDM-PCR y PCR-SSP se incluyó un control no-polimórfico de amplificación.

Todas las amplificaciones eran visualizadas mediante electroforesis en el gel de agarosa al 2%. Para el análisis de RFLP de los alelos B y C, el producto de PCR 679 pb fue digerido con las enzimas de restricción BanI y MboI, respectivamente. La BanI actúa sobre una diana constitutiva que da lugar a dos fragmentos de 116 y 569 pb. En los alelos A, C y D (pero no el B), el fragmento de 569 es cortado en dos fragmentos de 308 y 255 pb. La MboI tiene dos sitios de actuación constitutivos y da lugar a aparición de tres fragmentos de 83, 94 y 502 bp. En el alelo C (pero no en los alelos A, B y D), el fragmento de 502 fue dividido en dos fragmentos de 274 y 228 bp. Todos estos fragmentos de restricción fueron separados en la electroforesis del gel de agarosa al 2%. Para el análisis por RFLP del alelo D, el producto de SDM-PCR de 119 bp fue digerido con las enzimas de restricción MluI y HhaI. La MluI divide el producto de la PCR específica para el alelo D en dos fragmentos de 94 y 25 bp, mientras que la HhaI divide los alelos A, B y C. Para el análisis por RFLP de los alelos P y Q, el producto de SDM-PCR fue digerido con la enzima de restricción HindIII, que divide el producto de PCR de 136bp específico para el alelo Q en dos fragmentos de 110 y 26bp. Para el análisis, tanto del alelo D como y P/Q, los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%.

### 3.6. ANÁLISIS DE DATOS CLÍNICOS

Se valoraron las manifestaciones clínicas presente en cada paciente con IDVC en tres diferentes períodos:

- a. al inicio de la sintomatología (debut clínico de la IDVC)
- b. al diagnóstico (motivo del diagnóstico)
- c. a lo largo del seguimiento clínico, una vez instaurado el tratamiento sustitutivo (evolución de la sintomatología y respuesta al tratamiento)

Se consideró como infecciones respiratorias recurrentes (IRR) la presencia de al menos tres episodios al año de bronquitis y/o sinusitis acompañadas de fiebre y temperatura superior a 37,5 °C. Se consideró como diarreas recidivantes (DR) la presencia de más de 2 episodios de diarrea al año.

En las tablas de datos clínicos (**tabla 3.1.** en la página 32 y **tabla 4.3.** en la página 66) se resume la patología más grave sufrida por cada paciente con IDVC en cada uno de estos períodos (síntomas iniciales, al diagnóstico y evolutivos). Los datos se analizaron en función de: 1) retraso en el diagnóstico en años (calculado a partir de la edad de inicio de síntomas y edad al diagnóstico) y 2) meses en tratamiento sustitutivo.

Los datos clínicos de los pacientes con DIgA se valoraron según criterios definidos por Infectious Diseases Society of America<sup>90</sup> como procesos infecciosos graves si se trataba de neumonías, sepsis, meningitis o abscesos pulmonares y como infecciones moderadas si se trataba de bronquitis con fiebre, sinusitis, otitis o episodios febriles >38°C.

### 3.7. ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES

#### 3.7.1. ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS B DE MEMORIA EN PACIENTES CON IDVC

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

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

#### 3.7.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MBL

Para el estudio de asociación entre el genotipo y la concentración plasmática de MBL, se utilizaron las muestras de cordón umbilical de los recién nacidos (RN), cuyas madres no padecieron infecciones graves/moderadas<sup>90</sup> en el último trimestre del embarazo. El objetivo de esta elección de individuos ha sido minimizar la influencia de una posible situación post-infecciosa sobre la concentración plasmática de la MBL<sup>76</sup>:

Además, la concentración de la MBL se valoró en función de las siguientes condiciones individuales de los RN: número de semanas de gestación, peso al nacer, número de cigarrillos que fumó la madre a diario durante el embarazo, el hecho de haber sufrido algún proceso infeccioso leve en el último trimestre y

especialmente en la última semana del embarazo, diabetes gestacional y la presencia del *Streptococcus agalactiae* en el cultivo vaginal y/o rectal materno.

El análisis genotípico de la MBL se realizó en 288 del total de 423 RN incluidos en el estudio. Los criterios que se utilizaron para esta selección de los individuos para análisis genotípico se explican en el capítulo de los resultados.

Las comparaciones de concentraciones plasmáticas de MBL proteica y funcional entre los diferentes genotipos de la MBL, se realizaron primero mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Este análisis fue seguido de las comparaciones múltiples de la “prueba a posteriori de Dunn”, para determinar de qué grupo o grupos provienen las diferencias detectadas en la prueba de Kruskal-Wallis. El objetivo de dicho análisis fue clasificar a los diferentes genotipos de la MBL en grupos con el mínimo solapamiento posible de rangos de concentraciones.

### **3.7.3. ESTUDIO DE MBL EN PACIENTES CON IDVC Y DIgA**

La concentración plasmática de MBL proteica y funcional se determinó en 39 de los 41 pacientes con IDVC y en 46 pacientes con DIgA. Los valores de MBL plasmática obtenidos en los pacientes estudiados se compararon con los resultados hallados en el grupo control (ver análisis estadístico). También se comparó la media o la mediana de las concentraciones plasmáticas de MBL proteica y funcional en los pacientes agrupados según las principales manifestaciones clínicas (ver resultados).

El análisis genotípico de la MBL se realizó en 27 pacientes con IDVC y en 23 pacientes con DIgA.

Una vez determinadas las concentraciones plasmáticas y el genotipo de la MBL, los pacientes con IDVC y DIgA se agruparon en productores de MBL con valores bajos, intermedios y altos según el modelo establecido para esta clasificación, en la población de RN. Finalmente se analizó la patología clínica presentada por los pacientes en cada grupo. Se compararon las frecuencias de las diferentes patologías estudiadas en los pacientes mediante la construcción de las tablas de contingencia y utilizando la prueba de independencia de la  $\chi^2$  de Pearson/Fisher.

### 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se emplearon los programas SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL) y G-Stat 2.0 (GlaxoSmithKline, CA) a partir de una base de datos con toda la información recogida (Microsoft Acces 2000).

Las variables cualitativas se describieron mediante su distribución de frecuencias. Para analizar la asociación entre dos variables cualitativas se utilizaron las tablas de contingencia, la prueba de independencia de la  $\chi^2$  de Pearson o la fórmula exacta de Fisher, cuando fue preciso.

Las variables cuantitativas se describieron con las medidas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica, intervalo de confianza del 95% para la media y con valores correspondientes al percentil 05 y 95 para las medianas).

Aplicando la prueba de Kolmogorov Smirnov se comprobó si la distribución de los valores seguía una distribución normal. Se utilizaron pruebas paramétricas para la comparación de medias de las variables continuas con una distribución normal y pruebas no paramétricas para comparar las medianas de las variables continuas que no siguieron una distribución normal.

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de t de Student, cuando los factores tenían dos categorías o mediante el Análisis de la Varianza de un factor (Anova), cuando las categorías del factor eran superiores a dos. En este último caso, en todas aquellas asociaciones que mostraron significación estadística se procedió a realizar test de comparaciones múltiples, basadas en el método de Tukey de diferencia significativa, para determinar entre cuáles de las categorías se observaban las diferencias.

La comparación de medianas se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Wilcoxon) o su equivalente para las comparaciones entre más de dos categorías de un factor, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En este último caso, en todas aquellas asociaciones que mostraron significación estadística se procedió a realizar tests de comparaciones múltiples, basados en el método de Dunn, para determinar entre cuáles de las categorías se observaban las diferencias.

Para el estudio de asociaciones entre dos variables continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Para todas las pruebas empleadas se consideró como significativo el valor de  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

## 4.1. ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS B DE MEMORIA EN PACIENTES CON IDVC

### 4.1.1. CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN CONTROLES Y PACIENTES CON IDVC

Se analizaron las subpoblaciones de linfocitos B (LB) en muestras de sangre periférica de 41 pacientes con IDVC y 29 controles. En los controles el porcentaje de LB *naive* (media  $\pm$  1DE) fue del 57%  $\pm$  14%, el de LB de memoria totales fue del 39%  $\pm$  13%, el de LB de memoria sin cambio de isotipo fue del 17%  $\pm$  6% y el de LB con cambio de isotipo fue del 22%  $\pm$  10%, **tabla 4.1**.

**Tabla 4.1.** Descripción estadística de subpoblaciones de LB en controles y pacientes con IDVC.

		LB	LB <i>naive</i>	LB de Memoria (% del total de LB)		
		(% de linf. tot)	(% del total de LB)	totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo
Grupo Control n=29	media	8	57	39	17	22
	DE	3	14	13	6	10
	Valor Mínimo	3	30	13	6	6
	Valor Máximo	16	85	67	32	40

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

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

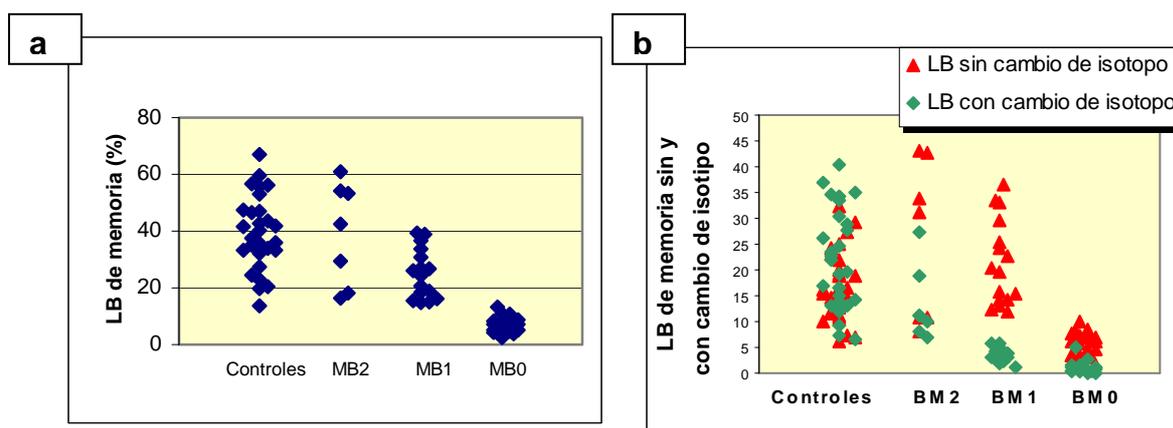
La distribución de estas subpoblaciones fue muy diferente en los pacientes. Se encontró por un lado, un aumento significativo de la proporción de los LB *naive* ( $p < 0.000001$ ), y por el otro, una disminución significativa de los LB de memoria ( $p < 0.000001$ ), sobre todo a expensas de los LB de memoria con cambio de isotipo, la subpoblación más alterada en la mayoría de los pacientes con IDVC. Estas diferencias no guardaron relación con el porcentaje de los LB totales que no difirió entre el grupo control y los pacientes, ( $8 \pm 3\%$  vs.  $7 \pm 3\%$ , **tabla 4.1**).

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

#### 4.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON IDVC EN GRUPOS SEGÚN LA CUANTIFICACIÓN DE LOS LB DE MEMORIA

En este estudio, para la clasificación de los pacientes con IDVC en grupos según la cuantificación de las subpoblaciones de los LB de memoria, se utilizó como punto de corte el valor mínimo obtenido de las determinaciones de las subpoblaciones de los LB en los controles. Así el punto de corte para los LB de memoria totales fue el **13%** (rombos azules en la **figura 4.1a**, sombreado azul en la **tabla 4.1.**) y para los LB de memoria con cambio de isotipo fue el **6%** (rombos verdes en la **figura 4.1b**, sombreado verde en la **tabla 4.1.**) del total de los LB de sangre periférica.

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



**Figura 4.1** Porcentajes de LB de memoria del total de los LB de sangre periférica en diferentes grupos de pacientes. Para más explicaciones ver el texto.

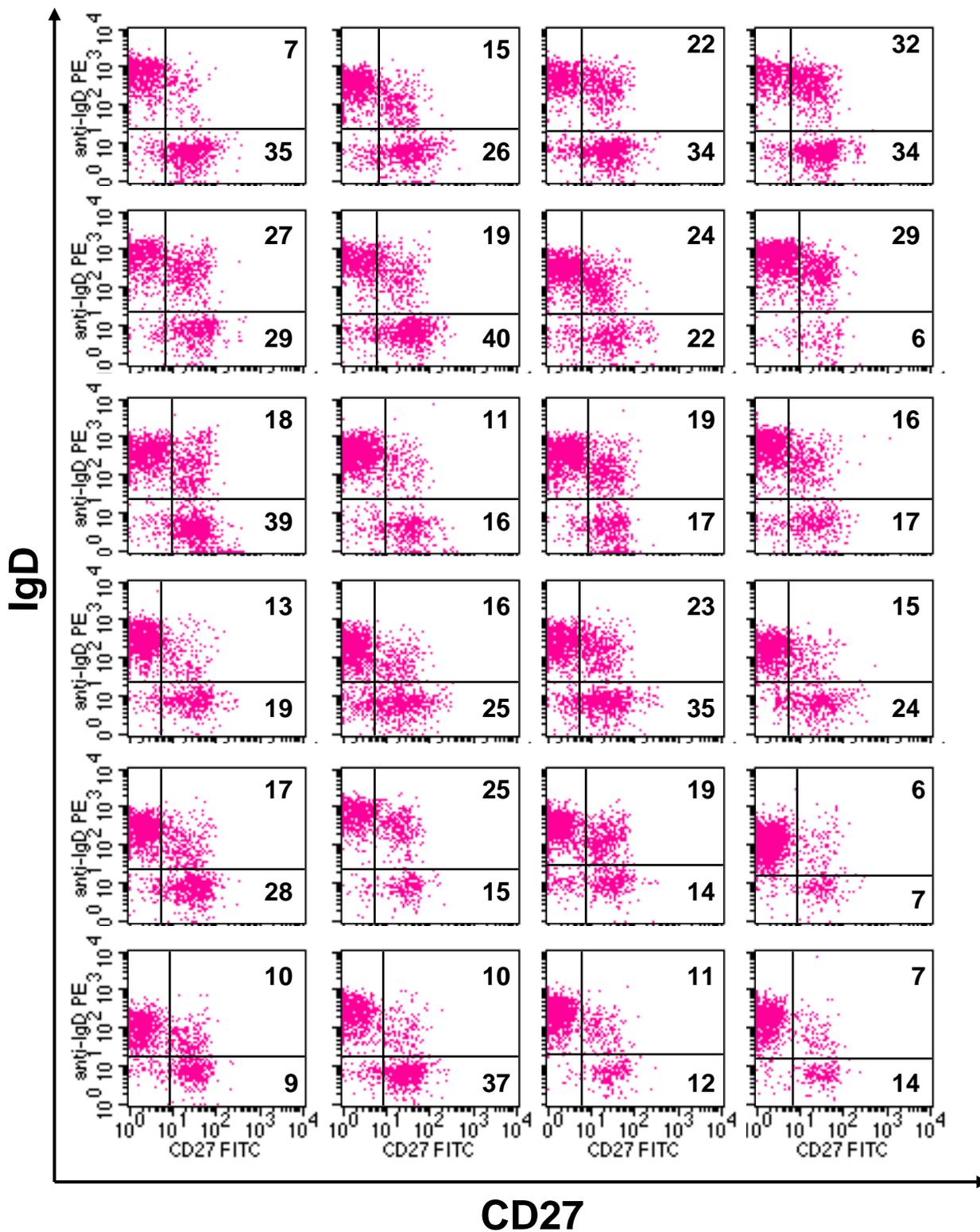
Los pacientes que presentaron un porcentaje de los LB de memoria totales superior al 13% pero los LB de memoria con cambio de isotipo inferior al 6,5% (rombos

verdes en la **figura 4.1b**) formaron el **grupo BM1**. Este grupo incluyó el 39% (16/41) de todos los pacientes estudiados.

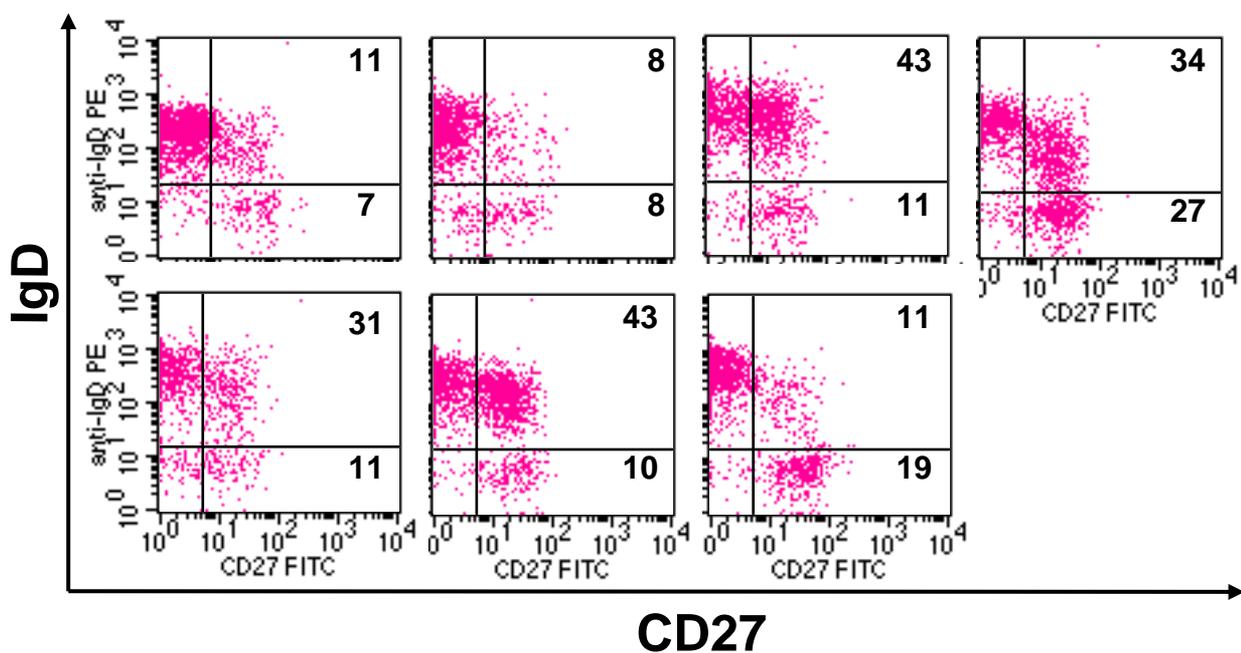
Los pacientes que presentaron tanto el porcentaje de los LB de memoria totales (**rombos azules** en la **figura 4.1a**) como el porcentaje de los LB de memoria con cambio de isotipo (**rombos verdes** en la **figura 4.1b**) superior a los respectivos puntos de corte, formaron el **grupo BM2**. Este grupo incluyó el 17% (7/41) de todos los pacientes estudiados.

En las páginas siguientes se detallan las imágenes de las subpoblaciones de LB, identificadas mediante citometría de flujo, utilizando los marcadores de CD27 e IgD, en todos los pacientes con IDVC estudiados y en 27 de los 29 controles analizados. Además, en la **tabla 4.2**. están resumidos los parámetros estadísticos descriptivos de las subpoblaciones de LB en cada grupo BM.

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



Subpoblaciones de LB en una muestra de **27 controles** del banco de sangre. El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecha) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecha).



Subpoblaciones de LB en los 7 pacientes del **grupo BM2**

El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecha) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecha).

**Tabla 4.2.** Descripción estadística de subpoblaciones de LB en los grupos de pacientes con IDVC .

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

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

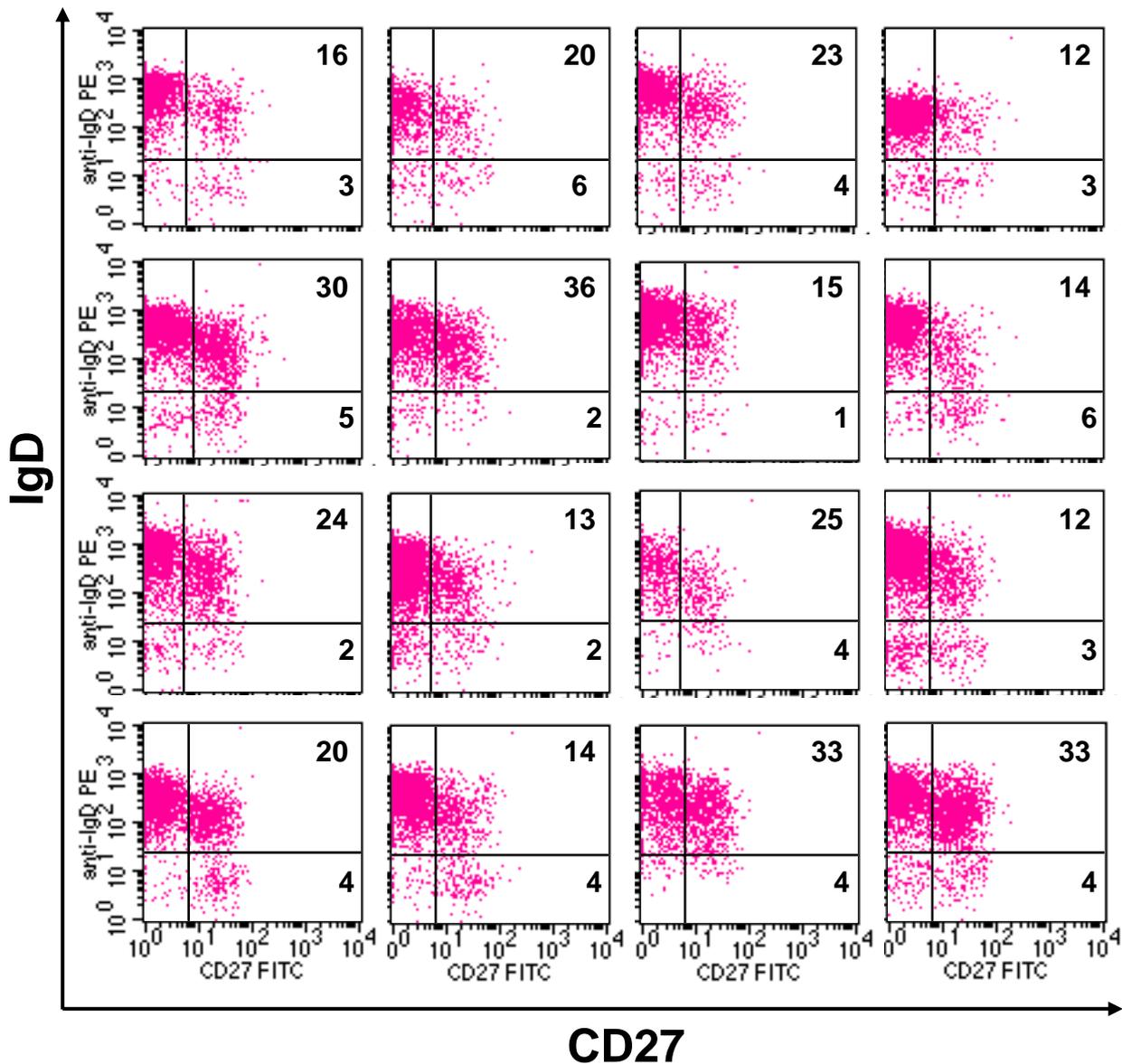
	LB (%de PB MNC)	LB naive (% del total de LB)	LB de Memoria (% del total de LB)			
			totales	sin cambio de isotipo	con cambio de isotipo	
<b>Grupo BM0</b> n=18/41 44%	media	7	91**	7**\$	6**\$	1**
	SD	3	3	3	2	1
	Valor Mínimo	3	86	2	2	0
	Valor Máximo	16	95	13	10	5

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

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

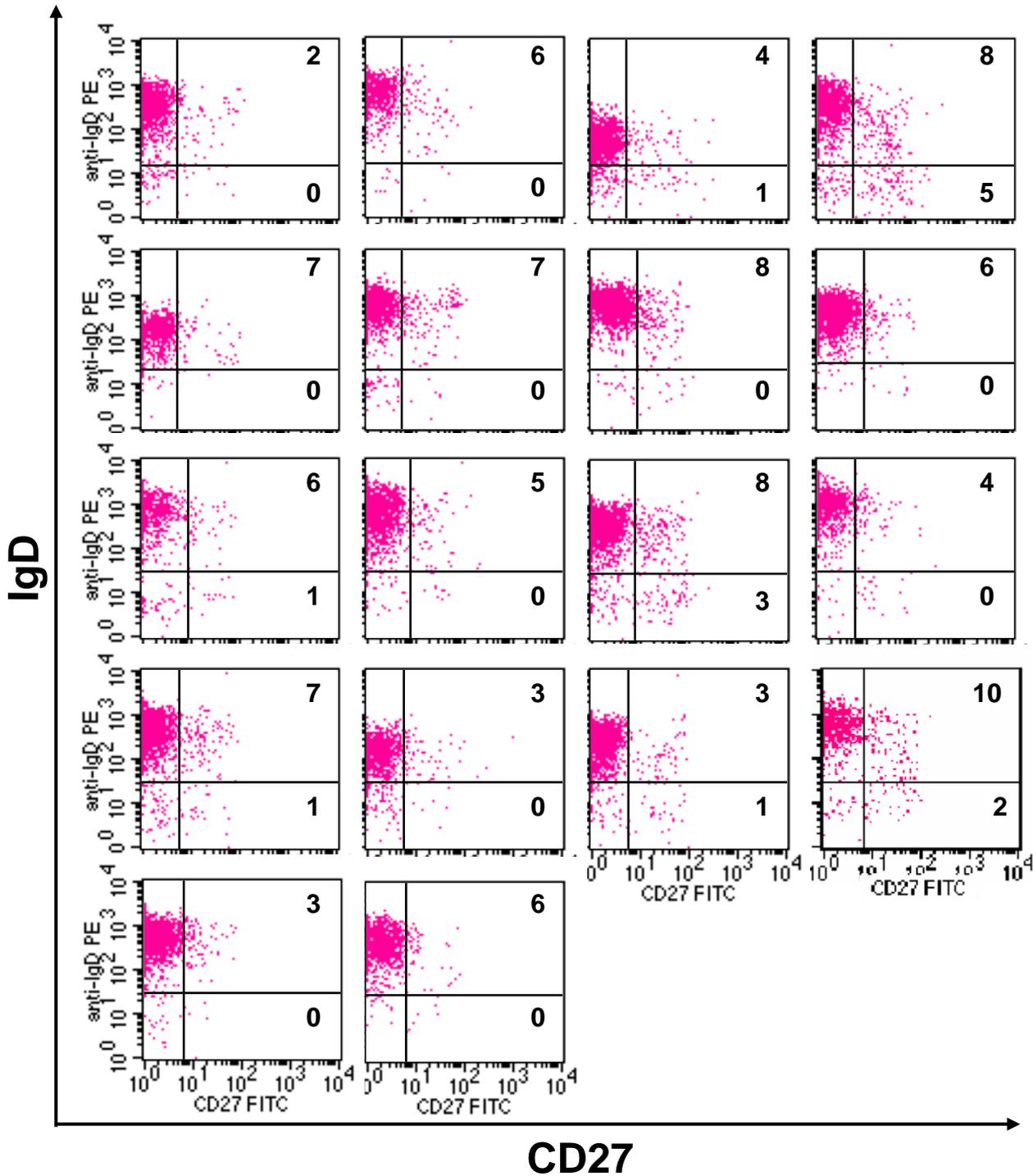
\$ diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.000001$ ) comparando con el grupo BM1

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



Subpoblaciones de LB en los 16 pacientes del **grupo BM1**.

El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecha) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecha).



Subpoblaciones de LB en los 18 pacientes del **grupo BM0**.

El número indica el porcentaje de LB de memoria sin cambio de isotipo (células B CD27+IgD+, cuadrante superior derecha) y con cambio de isotipo (células B CD27+IgD-, cuadrante inferior derecha).

### 4.1.3. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE LOS PACIENTES CON IDVC CLASIFICADOS EN GRUPOS BM

#### 4.1.3.1. DATOS GENERALES Y ANTECEDENTES FAMILIARES

En la **tabla 4.3.** se resumen los datos clínicos analizados de los 41 pacientes con IDVC incluidos en el estudio. La edad de inicio de los síntomas osciló entre 2 y 48 años, con una mediana de 11 años y la del diagnóstico entre 6 y 59 años, con una mediana de 29 años. El tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas y el inicio del tratamiento/diagnóstico, osciló entre 1 y 50 años, con una mediana de 13 años. En todos los pacientes, el tratamiento se inicio pocos meses después del diagnóstico.

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

En 35 del total de 41 pacientes con IDVC se estudiaron los familiares de primer grado. Destacó el hecho de que en 7 casos (20%) se halló otra IDP en uno o varios familiares, en forma de IDVC (6 casos) y déficit de IgA con déficit de IgG2 (un caso). En 5 (14%) de los pacientes había antecedentes familiares de enfermedad autoinmune. En la **tabla 4.4.** se muestra la distribución de los casos con historia familiar positiva, dentro de la clasificación BM. El 71,4% (5/7) de pacientes con historia familiar positiva para la IDP, pertenecieron al grupo BM0. Sin embargo, el riesgo relativo (RR) de transmisión de la enfermedad a los familiares de los pacientes en este grupo, no alcanzó el grado de la significación estadística (RR = 2,06; (el intervalo de confianza (IC) del 95% fue de 0,47 a 9,04; p=0,2).

**Tabla 4.4.** Distribución de pacientes con antecedentes familiares estudiados, según el grupo BM y la patología encontrada.

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

IDP: Inmunodeficiencia primaria, EAI: Enfermedad autoinmune

Tabla 4.3. Datos clínicos de pacientes con IDVC

Paciente	Edad actual / Sexo (años)	Edad de inicio de síntomas (años)	Edad al diagnóstico (años)	Meses en tratamiento	Manifestaciones clínicas al diagnóstico	Evolución clínica	Enfermedad Autoinmune	Sinusitis en Rx	Bronquiectasias***	CVF %	VEMS %	Esplenomegalia (TAC)	Linfadenopatías (TAC)	# Historia familiar
<b>Grupo BM0</b>														
1	44/V	17	34	123	IRR, DR	Malabsorción, Expectoración	AHAI, PTI, Alop. areata	sí	2	37	25	sí	sí	sp
2	40/V	34	37	36	IRR, DR	Expectoración, Diarreas no infecciosa	Alop. areata, Hipo T	no	2	83	98	sí	no	sp
3	18/V	2	6	132	IRR	Expectoración	no	no	2	91	92	no	no	IDVC
4	44/M	12	40	40	IRR, Leucopenia	Nada	Leucopenia	sí	1	67	75	no	sí	sp
5	42/M	13	30	144	IRR, DR	Malabsorción, artralgias	PTI	no	1	80	84	sí	sí	IDVC
6	53/M	37	50	36	IRR, Artralgias	Nada	AR	no	1	86	99	no	sí	EAI
7	15/M	10	12	39	IRR, DR	Malabsorción, Expectoración	AHAI, PTI	no	2	66	61	sí	sí	EAI
8	28/V	4	6	252	IRR, DR	Malabsorción	HipoT subclínico	sí	1	84	102	sí	sí	IDVC
9	34/V	6	24	120	IRR, DR	Malabsorción, Expectoración	Psoriasis	sí	2	89	87	sí	sí	DlgA
10	23/M	6	15	96	IRR, DR	Malabsorción	no	no	1	112	116	sí	sí	sp
11	24/M	13	16	96	IRR	Expectoración	no	sí	2	60	52	no	sí	sp
12	16/M	6	16	4	IRR	Nada	no	sí	0	nd	nd	sí	no	IDVC
13	25/V	4	11	2	IRR, Artralgias	Expectoración	no	no	2	73	80	no	no	sp
14	21/V	5	9	132	IRR, DR, Astenia	Expectoración, DR	no	sí	2	101	99	no	no	sp
15	61/M	9	59	28	IRR, DR	Expectoración, Diarreas no infecciosas	AR	sí	2	62	63	no	no	sp
16	54/M	7	41	156	IRR	Expectoración, Anorexia	A. perniciososa	sí	2	75	55	sí	no	nd
17	51/M	38	46	48	IRR, DR	Expectoración, DR	no	sí	2	78	51	sí	sí	sp
18	38/M	14	27	134	IRR, DR	Malabsorción	no	sí	1	72	71	sí	sí	EAI
media	31/38M	13,2	26,6	89,9						77,4	77,1			
<b>Grupo BM1</b>														
19	19/V	4	9	123	IRR	Expectoración	no	sí	2	91	95	no	no	sp
20	21/M	9	13	87	DR	Nada	no	no	0	81	84	no	no	sp
21	25/V	17	19	74	IRR, DR	Malabsorción	no	no	1	88	97	sí	sí	sp
22	20/V	8	16	25	IRR	Nada	no	no	0	94	105	no	no	sp
23	45/M	34	39	64	IRR, DR	Malabsorción	A. perniciososa	sí	1	88	88	no	no	sp
24	56/V	4	25	27	IRR	Nada	no	no	1	91	88	no	no	EAI
25	33/M	22	33	3	IRR	Expectoración	no	no	2	nd	nd	no	no	IDVC
26	63/M	40	59	45	IRR	Nada	PTI, Leucopenia	no	1	63	66	no	no	sp
27	61/V	30	54	84	IRR, DR	Nada	no	no	1	142	112	no	no	nd
28	44/V	16	34	88	IRR, DR	Malabsorción	A. perniciososa	sí	1	76	70	sí	no	sp
29	58/V	30	54	36	IRR	Nada	PTI	no	0	95	102	sí	sí	nd
30	33/V	12	23	120	IRR, DR	Nada	no	no	1	97	112	no	sí	sp
31	44/M	25	41	27	IRR	Nada	AHAI, Psoriasis	no	1	106	107	no	no	EAI
32	38/M	13	37	5	IRR	Nada	no	sí	0	95	94	no	no	sp
33	64/V	33	43	240	IRR	Expectoración	no	sí	2	97	94	sí	sí	sp
34	25/M	9	10	192	HAI, Vitiligo	Nada	HAI, Vitiligo	no	0	87	87	no	no	sp
media	42/40M	19,1	31,8	77,5						92,7	93,4			
<b>Grupo BM2</b>														
35	14/V	5	7	80	IRR, DR	IRR	no	no	0	nd	nd	no	no	IDVC
36	18/V	5	6	120	IRR	Nada	no	no	0	115	134	no	no	sp
37	53/V	46	51	24	Alop. areata	Nada	Alop. areata	no	0	100	115	sí	no	nd
38	30/M	11	21	108	IRR, DR	Nada	no	no	0	115	125	no	no	nd
39	50/M	48	49	12	IRR, DR	Nada	no	no	0	nd	nd	no	no	nd
40	34/V	4	33	9	IRR	Nada	no	sí	0	100	106	no	no	sp
41	28/V	4	6	252	IRR	Nada	no	no	0	nd	nd	no	no	sp
media	29/40M	17,6	24,7	86,4						107,5	120,0			
<b>Todos</b>														
media	25V/34M	16	28,7	82,4										

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

\$ Los valores de CVF y VEMS se expresaron como porcentaje de los predictivos establecidos por Roca *et al* (ref. 92). CVF: Capacidad vital forzada, VEMS: volumen espiratorio máximo en el primer segundo.

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

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

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

#### **4.1.3.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON IDVC CLASIFICADOS EN GRUPOS BM**

En las **tablas 3.1.** y **4.3.** se resumen los datos clínicos analizados de los 41 pacientes con IDVC incluidos en el estudio. Las infecciones respiratorias fueron las más frecuentes, siendo las **manifestaciones clínicas iniciales** en el 87,8% (36/41) de los pacientes, **tabla 3.1.** El 46,3% (19/41) de pacientes presentó neumonía, el 24,4% (10/41) bronquitis y el 17,1% (7/41) infecciones de vías altas. El resto de los pacientes (5/41, 12,2%) debutó con enfermedad autoinmune. El 17% (7/41) de los pacientes presentó, además, síntomas digestivos.

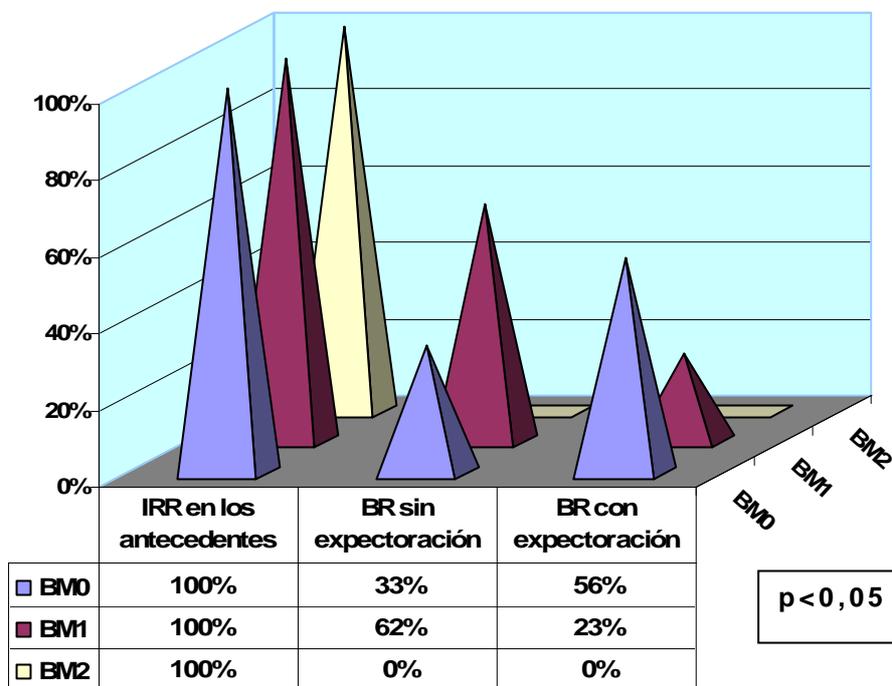
Entre las **manifestaciones clínicas que llevaron al diagnóstico**, también destacó la presencia de infecciones respiratorias, **tabla 3.1.** o **4.3.** Éstas afectaron al 90% (37/41) de los pacientes. El 10% (4/41) restante padeció enfermedad autoinmune (3 casos) o patología digestiva aislada (1 caso). El 46% (19/41) de los pacientes presentaron en el momento del diagnóstico junto con las infecciones respiratorias recurrentes las diarreas recidivantes.

##### **4.1.3.2.1. MANIFESTACIONES RESPIRATORIAS**

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

En la **figura 4.2.** se muestra la distribución de pacientes con infecciones respiratorias recurrentes (IRR) en el momento del diagnóstico que desarrollaron, a lo largo del seguimiento clínico, bronquiectasias (BR), con o sin expectoración, en los tres grupos BM de pacientes. Del total de pacientes con antecedentes de IRR en el grupo BM0, el 56% (10/18) desarrollaron bronquiectasias con expectoración, frente al 23% (3/13) del grupo BM1 y el 0% (0/6) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

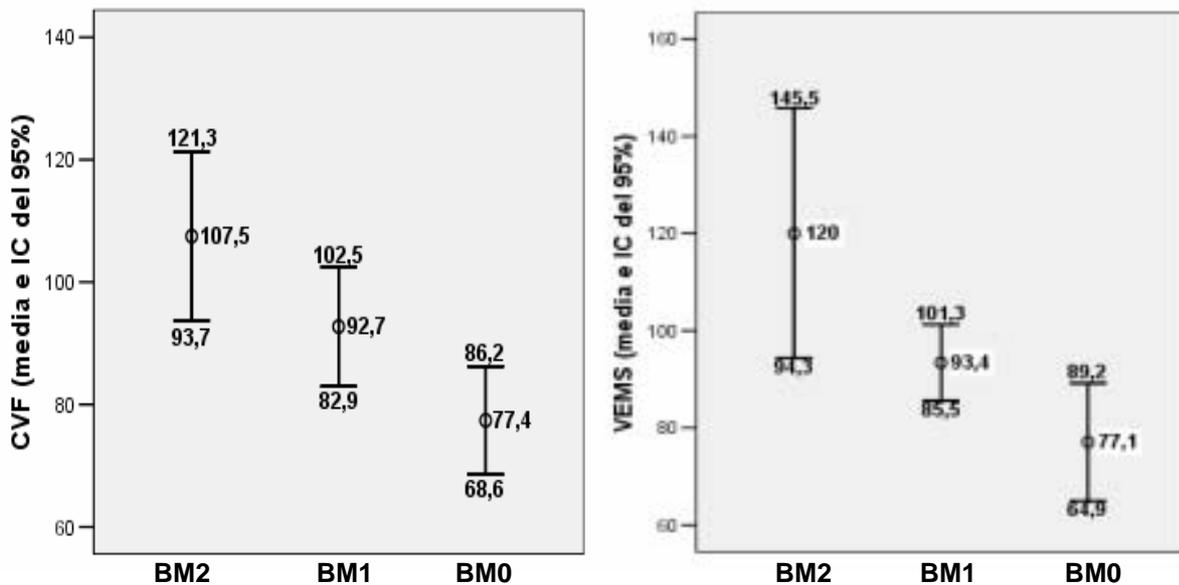
**DESARROLLO DE LAS BRONQUIECTASIAS EN PACIENTES CON IDVC POR GRUPOS BM**



**Figura 4.2:** Desarrollo de bronquiectasias (BR), con o sin expectoración, en pacientes con antecedentes de Infecciones Respiratorias Recurrentes (IRR). El total de pacientes con IRR (100%) en cada grupo BM fueron: 18 pacientes en el grupo BM0, 13 en el BM1 y 6 en el BM2. El 56% (10/18) de pacientes del grupo BM0 desarrollaron bronquiectasias con expectoración, frente al 23% (3/13) de pacientes del grupo BM1 y 0% (0/6) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

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

Se analizaron los resultados de las pruebas de función respiratoria (PFR), la capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (VEMS) en 17 de 18 pacientes del grupo BM0, en 15 de 16 pacientes del BM1 y en 4 de 7 del grupo BM2, **tabla 4.3**. En la **figura 4.3**. se muestran los valores de la media (IC del 95%) de CVF y VEMS obtenidas en cada grupo BM.



**Figura 4.3** Valores de las pruebas de función respiratoria (PFR) en pacientes con IDVC por grupos BM. Tanto la capacidad vital forzada (CVF) como el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (VEMS) eran significativamente mas bajos en el grupo BM0 que en el grupo BM1 y BM2,  $p < 0,005$ .

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

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

bronquiectasias,  $p < 0,03$ . La VEMS más disminuida ( $77\% \pm 17\%$ ) fue observada en los pacientes con bronquiectasias con expectoración.

La enfermedad pulmonar crónica (EPC), definida como la disminución de la CVF y/o la VEMS por debajo del 80% del valor teórico establecido por Roca y colaboradores<sup>91</sup> en los pacientes con bronquiectasias, se evidenció en 11 pacientes, 9 del grupo BM0 y 2 del grupo BM1,  $p < 0,05$ . Cabe destacar, a modo descriptivo, que 4 de los pacientes del grupo BM0 y ninguno del grupo BM1 presentaron PFR inferiores al 60%, lo que se considera, según Roca y col<sup>91</sup>, una EPC grave. No encontramos diferencias significativas entre grupos de pacientes con o sin enfermedad crónica pulmonar, en cuanto a edad actual, edad de inicio de síntomas, retraso en el diagnóstico o meses en tratamiento.

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

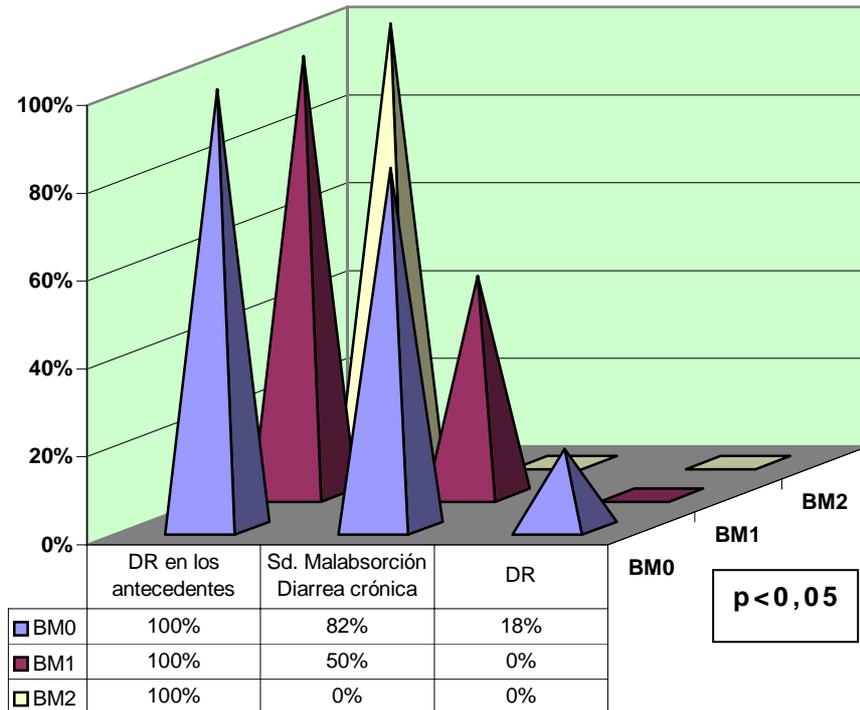
#### **4.1.3.2.2. MANIFESTACIONES DIGESTIVAS**

En el momento del diagnóstico el 49% (20/41) de los pacientes presentaron diarreas recidivantes (DR), **tabla 4.3**. El patógeno detectado con mayor frecuencia en estos pacientes fue la *Giardia lamblia* (datos no mostrados). A lo largo del seguimiento clínico se objetivó un síndrome de malabsorción o diarrea crónica, con clara repercusión en el estado general con bajo peso, astenia y malnutrición (datos no mostrados) en doce pacientes: 9 pertenecieron al grupo BM0 y 3 al grupo BM1. Ningún paciente del grupo BM2 desarrolló un síndrome de malabsorción o diarrea crónica. En la **figura 4.4** se muestra la evolución de las DR a un síndrome de malabsorción y/o diarreas crónicas en los pacientes por grupos BM.

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

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

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



**Figura 4.4:** Evolución de las diarreas recidivantes (DR) a síndrome de malabsorción y/o diarrea crónica en los tres grupos de pacientes. El total de pacientes con DR (100%) en cada grupo BM fueron: 11 pacientes en el grupo BM0, 6 en el BM1 y 3 en el BM2. El 82% de pacientes (9/11) del grupo BM0 desarrollaron síndrome de malabsorción o diarrea crónica, frente al 50% (3/6) del grupo BM1 y 0% del grupo BM2, **p<0,05**. Las DR persistieron en el 18% de pacientes (2/11) del grupo BM0.

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

#### 4.1.3.2.3. MANIFESTACIONES LINFOPROLIFERATIVAS

En 16 de 41 pacientes (39%) se detectó esplenomegalia en el TAC toraco-abdominal, **tabla 4.3**. De éstos, 11 pacientes pertenecieron al grupo BM0, 4 al grupo BM1, y 1 al grupo MB2, ( $p < 0,05$ ). Es decir, la esplenomegalia se detectó en el 61% (11/18) de pacientes del grupo BM0, en el 25% (4/16) del grupo BM1 y en el 14% (1/7) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

Se objetivaron linfadenopatías en el TAC toraco-abdominal en 15 de 41 pacientes (37%), **tabla 4.3**. De éstos, 11 pacientes pertenecieron al grupo BM0 y 4 al grupo BM1, ( $p < 0,01$ ). Es decir, la presencia de linfadenopatías se detectó en el 61% (11/18) de pacientes del grupo BM0, en el 25% (4/16) del grupo BM1 y en el 0% (0/7) del grupo BM2,  $p < 0,05$ .

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

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

#### 4.1.3.2.4. MANIFESTACIONES AUTOINMUNES

Al momento del diagnóstico y/o a lo largo del seguimiento clínico, 17 (41%) pacientes presentaron patología autoinmune, **tabla 4.3**. De éstos, 10 pacientes pertenecieron al grupo BM0, 6 al grupo BM1, y 1 al grupo MB2. La patología autoinmune se diagnosticó en el 55% (10/18) de pacientes del grupo BM0, en el 38% (6/16) del grupo BM1 y en el 14% (1/7) del grupo BM2, ( $p = 0,1$ ).

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

los pacientes estaban en remisión clínica y ningún paciente recibía tratamiento inmunosupresor.

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

#### **4.1.3.3. DATOS INMUNOLÓGICOS DE PACIENTES CON IDVC**

En la **tabla 4.5.** se resumen los datos inmunológicos analizados en 41 pacientes con IDVC incluidos en el estudio. Entre los datos más relevantes destaca la presencia de niveles indetectables de la IgA y/o IgM en 29 (71%) de pacientes, 14 del grupo BM0 (14/18, 77%), 14 del grupo BM1 (14/16, 88%) y uno del grupo BM2 (1/7, 14%), (p<0,001).

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

La función linfocitaria valorada mediante la cuantificación de los linfocitos T que expresaron el CD69 tras la estimulación con anti-CD3 se realizó en 16 de 18 pacientes del grupo BM0, en 14 de 16 pacientes del BM1 y en 5 de 7 del grupo BM2. El 69% (11/16) de pacientes del grupo BM0, el 50% (7/14) del grupo BM1 y el 60% (3/5) del grupo BM2 presentaron una baja respuesta a estimulación de las células T CD4+ con anti-CD3. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores medios de células T activadas, CD4+HLA-DR+ y CD8+HLA-DR+, entre los grupos BM de pacientes, **tabla 4.5.**

Diez pacientes presentaron linfopenia, 6 leucocitosis y 5 plaquetopenia, **tabla 4.5.** En 18 pacientes se encontraron valores de hemoglobina por debajo de los límites normales, que junto con el volumen corpuscular medio de eritrocitos disminuido, indica la presencia de una anemia microcítica ferropénica (datos no mostrados) que se encuentra en los cuadros inflamatorios crónicos. El 50% de los pacientes del

grupo BM0 y del BM1 pero ninguno del grupo BM2 presentaron estos rasgos de anemia microcítica. El 72% (13/18) de pacientes del grupo BM0, el 50% (8/16) del grupo BM1 y el 43% (3/7) del grupo BM2 presentó algunas de las alteraciones en el hemograma descritas.

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

#### **4.1.3.4. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE LOS PACIENTES CON IDVC CLASIFICADOS EN GRUPOS BM- RESUMEN**

El grupo de pacientes con ausencia de LB de memoria, grupo BM0, presentó la patología clínica más grave. El 89% de estos pacientes presentaron bronquiectasias, acompañadas de expectoración habitual en más de la mitad de los casos (56%). En el 50% (9/18) de los pacientes se evidenció la enfermedad pulmonar crónica (EPC), definida como una disminución de la CVF y/o la VEMS por debajo del 80% del valor teórico establecido por Roca y colaboradores<sup>92</sup> en presencia de bronquiectasias. El 61% presentaron clínica digestiva en el momento del diagnóstico y el 50% desarrollaron síndrome de malabsorción o diarrea crónica con repercusión importante en el estado general. La patología autoinmune se diagnosticó en el 55% y las manifestaciones linfoproliferativas se objetivaron en el 78% de los pacientes de este grupo.

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

Tabla 4.5. Datos inmunológicos de pacientes con IDVC

Paciente	Edad actual / Sexo (años)	Linfocitos mm3	CD3 mm3	CD3 (%)	CD4 mm3	CD4 (%)	CD8 mm3	CD8 (%)	Index CD4/CD8	CD19 mm3	CD19 (%)	NK mm3	NK (%)	CD4 HLA-DR	CD8 HLA-DR	CD3CD69 (%)	CD4CD69 (%)	CD8CD69 (%)	IgG (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgM (mg/dL)	Leucocitos mm3	Plaquetas mm3	Hemoglobina g/dL	Ult IgG1	Ult IgG2	Ult IgG3	IgG1 al diagnost (mg/dL)	IgG2 al diagnost (mg/dL)	IgG3 al diagnost (mg/dL)	
<b>Grupo BM0</b>																															
1	44/V	3100	2170	70	1023	33	868	28	1,2	527	17	341	11	19	43	79	54	34	538	<7	77	7500	231	12,8				560	116	90	
2	40/V	1000	660	66	450	45	190	19	2,4	120	12	200	20	10	25	91	35	20	846	<7	10	5500	209	13,5	541	214	21	513	33	162	
3	18/V	1400	1064	76	700	50	322	23	2,2	210	15	84	6	6	25	90	65	50	776	308	33	8300	323	12,3	607	231	103	513	33	162	
4	44/M	2600	2340	90	598	23	1768	68	0,3	182	7	52	2	32	67	77	36	48	663	<7	<5	6200	315	11,5	nh	nh	nh	247	5	88	
5	42/M	4100	2501	61	861	21	1599	39	0,5	123	3	1353	33	45	71	78	48	66	443	<7	11	11200	547	8,3	340	313	6	88	23	<5	
6	53/M	900	639	71	270	30	342	38	0,8	135	15	117	13	16	32	nd	nd	nd	972	23	35	4700	260	13	430	172	20	200	60	8	
7	15/M	3300	2706	82	2112	64	594	18	3,6	462	14	99	3	17	11	61	31	32	660	14	59	11400	327	14,3	775	216	15	252	37	8	
8	28/V	2000	1580	79	860	43	620	31	1,4	240	12	180	9	10	9	89	61	48	683	<7	46	6600	193	13,9	466	178	43	288	52	95	
9	34/V	1600	1424	89	768	48	592	37	1,3	64	4	80	5	3	9	nd	nd	nd	687	<7	<10	7700	208	14,5	287	214	5	88	23	<5	
10	23/M	800	536	67	240	30	264	33	0,9	48	6	208	26	9	29	87	31	42	797	<7	<10	6200	214	13,4	353	187	33	ND	ND	ND	
11	24/M	3300	2376	72	957	29	1386	42	0,7	594	18	297	9	45	27	87	56	61	688	<7	16	12800	226	15,8	613	205	16	ND	ND	ND	
12	16/M	1200	960	80	576	48	348	29	1,7	108	9	108	9	12	22	69	36	33	725	<7	<10	5000	146	13,3	272	185	23	122	5	9	
13	25/V	3500	2905	83	665	19	2030	58	0,3	385	11	140	4	46	41	86	45	43	729	<7	<10	9000	265	14,3	262	241	7	ND	ND	ND	
14	21/V	2600	2158	83	1274	49	598	23	2,1	312	12	130	5	6	8	91	40	42	415	<7	<10	11400	249	15,4	413	206	13	103	5	49	
15	61/M	900	666	74	495	55	171	19	2,9	171	19	54	6	7	17	88	20	31	894	77	90	5100	181	12	nh	nh	nh	177	170	7	
16	54/M	1242	1018	82	435	35	559	45	0,8	87	7	124	10	36	81	76	32	24	591	23	<10	3270	103	13	nh	nh	nh	419	59	21	
17	51/M	800	640	80	440	55	184	23	2,4	96	12	64	8	17	28	86	43	36	600	23	<10	5100	201	11,9	396	181	10	ND	ND	ND	
18	38/M	1700	1241	73	884	52	306	18	2,9	272	16	153	9	16	9	92	34	33	721	<7	21	5600	262	12,7	277	281	5	170	46	11	
media	31V/38	2002	1532	77	766	41	708	33	1,6	230	12	210	10	20	31	74	37	36	690			7365	248	13,1	376	178	17	ND	ND	ND	
<b>Grupo BM1</b>																															
19	19/V	1000	710	71	430	43	200	20	2,2	180	18	90	9	6	9	95	35	31	537	<7	<10	5300	224	16,2	165	136	10	80	39	14	
20	21/M	2100	1659	79	1197	57	441	21	2,7	315	15	105	5	5	9	85	51	40	497	<7	16	11700	292	12,4	240	114	12	244	44	39	
21	25/V	1000	730	73	400	40	490	49	0,8	80	8	130	13	nd	nd	79	47	38	550	<7	<10	6600	149	13	268	144	9	185	67	23	
22	20/V	2400	1632	68	1104	46	456	19	2,4	408	17	288	12	6	13	85	61	57	449	17	12	8000	202	14,4	342	86	5	352	5	<5	
23	45/M	2000	1520	76	880	44	580	29	1,5	220	11	200	10	4	6	44	68	76	413	<7	46	9100	509	8,9	194	191	5	151	96	<5	
24	56/V	2100	1449	69	399	19	987	47	0,4	273	13	336	16	19	30	68	26	39	695	<7	<10	10000	243	12,3	611	210	28	ND	ND	ND	
25	33/M	1500	1125	75	495	33	585	39	0,8	180	12	135	9	14	49	80	56	56	334	<7	30	4900	232	8,7	181	104	6	130	5	9	
26	63/M	800	560	70	296	37	224	28	1,3	168	21	64	8	20	28	nd	nd	nd	992	<7	<10	3300	77	12,4	531	242	28	209	23	<5	
27	61/V	2400	1512	63	624	26	744	31	0,8	216	9	600	25	nd	nd	51	32	27	669	<7	45	9730	252	13,1	468	187	74	146	73	27	
28	44/V	1500	1275	85	645	43	570	38	1,1	75	5	135	9	20	51	91	53	42	863	<7	10	5800	199	14,3	630	179	26	168	11	<5	
29	58/V	1510	1208	80	725	48	483	32	1,5	121	8	181	12	37	52	88	30	37	542	<7	48	5650	186	15	nh	nh	nh	ND	ND	ND	
30	33/V	1600	1152	72	672	42	416	26	1,6	176	11	256	16	nd	nd	nd	nd	nd	508	<7	<10	7900	193	14,1	210	208	27	ND	ND	ND	
31	44/M	1600	1136	71	688	43	384	24	1,8	176	11	256	16	3	5	86	68	56	903	277	138	8400	292	12,3	662	243	31	381	10	22	
32	38/M	2000	1520	76	740	37	800	40	0,9	220	11	240	12	7	28	95	43	52	696	<7	<10	5400	184	13,2	291	261	5	75	40	<5	
33	64/V	700	637	91	315	45	294	42	1,1	42	6	14	2	38	45	78	28	31	499	<7	<10	2200	87	12,2	200	248	<5	200	248	<5	
34	25/M	2900	2320	80	1131	39	1102	38	1,0	435	15	116	4	12	14	92	45	40	610	<7	52	9300	186	13,2	289	203	<5	348	5	12	
media	42V/40	1694	1259	75	671	40	547	33	1,4	205	12	197	11	12	21	70	40	39	610			7080	219	12,9							
<b>Grupo BM2</b>																															
35	14/V	2900	2204	76	1450	50	696	24	2,1	406	14	232	8	4	8	95	65	59	689	21	55	6000	234	13,8	376	198	16	309	45	21	
36	18/V	2200	1826	83	1166	53	506	23	2,3	154	7	176	8	6	11	97	65	58	611	24	20	5900	186	14,6	204	100	9	290	60	34	
37	53/V	1210	871	72	593	49	290	24	2,0	169	14	85	7	21	33	86	44	42	687	35	40	4120	145	15	nh	nh	nh	281	83	5	
38	30/M	2210	1790	81	1260	57	508	23	2,5	243	11	133	6	nd	nd	76	42	33	635	85	98	6680	139	13,6	301	153	15	275	128	44	
39	50/M	1370	1123	82	452	33	534	39	0,8	55	4	178	13	18	37	nd	nd	nd	621	<7	16	5910	180	12,9	424	218	9	ND	ND	ND	
40	34/V	1600	1216	76	800	50	352	22	2,3	208	13	96	6	nd	nd	85	39	39	667	59	38	5200	264	15,8	416	257	13	75	16	8	
41	28/V	1800	1134	63	666	37	414	23	1,6	378	21	234	13	7	14	87	58	43	566	81	16	6300	173	15,1	334	190	29	280	34	32	
media	29V/40	1899	1452	76	912	47	472	25	1,9	230	12	162	9	8	15	75	45	39	639			5730	189	14,4							
<b>Todos</b>																															
media	25/34M	1700		76		43		29			12		9	13	26	86	44	41	663			6975	227	13,2							

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

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

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

Los pacientes con el fenotipo de LB de memoria menos alterado formaron el tercer grupo. La proporción de los LB de memoria totales y los con cambio de isotipo en el **grupo BM2** fue similar a la del grupo control. El fenotipo clínico fue también más leve. Los pacientes de este grupo no presentaron bronquiectasias ni desarrollaron síndrome de malabsorción. Se detectó enfermedad autoinmune y esplenomegalia en un sólo paciente de este grupo, otro presentó déficit de IgA, junto con una disminución de los linfocitos CD19+ y disminución de los valores de hemoglobina, otro presentó una disminución de las células NK, leucopenia y plaquetopenia. Plaquetopenia se evidenció también en un otro paciente de este grupo, **tabla 4.5**.

## **4.2. ESTUDIO DE MBL EN EL GRUPO DE RECIÉN NACIDOS**

### **4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA PARA LA CONCENTRACIÓN DE MBL PROTEICA**

#### **4.2.1.1. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO**

Se midió la concentración plasmática de MBL proteica en la sangre de cordón umbilical de 423 RN. El límite de detección de la técnica se calculó a partir de la media + 3DS de 8 blancos y fue de 13ng/ml. Para el cálculo estadístico, a todos los resultados obtenidos por debajo de este límite se les atribuyó el valor de 13ng/ml. El 97,6% de las muestras dieron resultados por encima de este límite de detección.

Aplicando la prueba de Kolmogorov Smirnov se demostró que la distribución de los valores no siguió una distribución normal. Los valores obtenidos oscilaron entre 13ng/ml y 4053ng/ml. La media y la mediana de las concentraciones fueron 1644ng/ml y 2050ng/ml respectivamente, con una desviación estándar (DE) de 964ng/ml. Diecisiete muestras (4,01%) dieron una lectura por debajo de 100ng/ml, 100 muestras (23,64%) dieron una lectura entre 100ng/ml y 1000ng/ml, y 306 muestras (72,34%) dieron una lectura por encima de 1000ng/ml.

#### **4.2.1.2. COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTRAENSAYO E INTERENSAYO**

El coeficiente de variación (CV) intraensayo para la MBL proteica, calculado a partir de los duplicados de las muestras fue 2,61%, inferior al valor generalmente aceptado para este tipo de ensayos (8%).

El coeficiente de variación (CV) interensayo para la MBL proteica calculado a partir de los valores de 2 sueros de diferente concentración, analizados en 6 ensayos se muestra en la **tabla 4.6**. El CV interensayo para ambas muestras testadas fue inferior al 18%, valor generalmente aceptado para este tipo de ensayos.

Tabla 4.6. Coeficiente de variación interensayo para la MBL proteica

	Muestra N° 1	Muestra N° 2
Media $\pm$ DE (ng/ml)	105 $\pm$ 8.2	1072 $\pm$ 67
Rango (ng/ml)	94 – 114	994 – 1172
<b>CV* (%)</b>	<b>7.8</b>	<b>6.2</b>

\*CV coeficiente de variación

## 4.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA PARA LA CONCENTRACIÓN DE MBL FUNCIONAL

### 4.2.2.1. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

Se midió la concentración plasmática de MBL funcional en la sangre de cordón umbilical de 423 RN. El límite de detección de la técnica calculado a partir de la media + 3DS de 8 blancos fue de 24ng/ml. Para el cálculo estadístico, a todos los resultados obtenidos por debajo de este límite se le atribuyó el valor de 24ng/ml. El porcentaje de los resultados por encima del límite de detección fue el 96,7%.

Aplicando la prueba de Kolmogorov Smirnov se demostró que la distribución de los valores no siguió una distribución normal. Los valores obtenidos oscilaron entre 24ng/ml y 7953ng/ml. La media y la mediana de las concentraciones fueron 3099ng/ml y 3527ng/ml respectivamente, con la desviación estándar (DE) de 2011ng/ml. Veintidós muestras (5,2%) dieron una lectura por debajo de 100 ng/ml, 81 muestras (19,15%) dieron una lectura entre 100ng/ml y 1000ng/ml, y 320 muestras (75,65%) dieron una lectura por encima de 1000 ng/ml.

### 4.2.2.2. COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTRAENSAYO E INTERENSAYO

El coeficiente de variación (CV) intraensayo para la MBL funcional calculado a partir de los duplicados de las muestras fue 5,06%, inferior al 8% que es el valor generalmente aceptado para este tipo de ensayos.

El coeficiente de variación (CV) interensayo para la MBL funcional, calculado a partir de los valores de 2 sueros de diferente concentración, analizados en 6 ensayos se muestra en la **tabla 4.7**. El CV interensayo para ambas muestras testadas fue <18%, el valor generalmente aceptado para este tipo de pruebas.

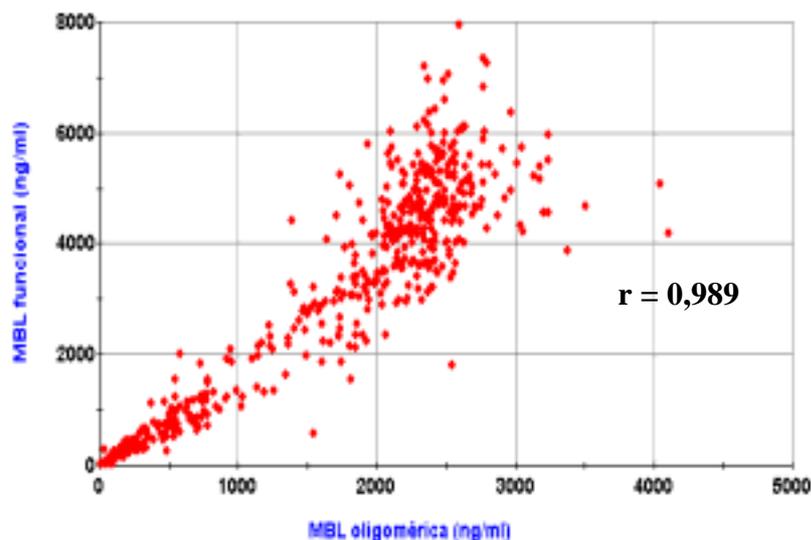
**Tabla 4.7. Coeficiente de variación interensayo para la MBL funcional**

	Muestra Nº 1	Muestra Nº 2
Media ± DE (ng/ml)	144 ± 25	1162 ± 124
Rango (ng/ml)	122 – 176	985- 1292
CV* (%)	<b>15.2</b>	<b>10.7</b>

\*CV coeficiente de variación

### 4.2.3. CORRELACIÓN ENTRE MBL PROTEICA Y FUNCIONAL

La correlación entre MBL proteica y MBL funcional, ambas detectadas por un método de ELISA, calculada mediante el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,989, **figura 4.5**.



**Figura 4.5.** Se representan todas las determinaciones de MBL proteica (aquí denominada oligomérica) (en abscisas) y MBL funcional (en ordenadas) realizadas en sangre de cordón umbilical de 423 recién nacidos.

#### **4.2.4. DATOS GENERALES DE RN Y CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MBL**

Los análisis estadísticos demostraron que los niveles de MBL plasmática, tanto proteica como funcional, en los 423 RN estudiados no guardaron relación ni con el número de semanas de gestación ni con el peso de RN al nacer. Tampoco se observó relación entre los niveles de MBL plasmática y el número de cigarrillos que fumó la madre a diario durante el embarazo o el hecho de haber sufrido algún proceso infeccioso leve en el último trimestre y sobre todo en el último mes de embarazo (datos no mostrados).

No se observaron diferencias en los niveles de MBL plasmática entre varones y mujeres, entre la presencia o no de diabetes gestacional de la madre, y la presencia o no del *Streptococcus agalactiae* en el cultivo vaginal y/o rectal (datos no mostrados).

***La concentración plasmática de MBL proteica y funcional en el grupo de RN estudiado, no mostró estar influenciado por los factores individuales aquí analizados.***

#### **4.2.5. CORRELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MBL**

##### **4.2.5.1. SELECCIÓN DE INDIVIDUOS PARA EL ESTUDIO GENOTÍPICO**

En una primera fase se analizó el genotipo de MBL en los primeros 83, del total de 423, recién nacidos incluidos en este estudio. Se observó que, exceptuando un caso, todos los individuos con el genotipo HYA/HYA o HYA/LYA (28%), presentaban concentraciones de MBL proteica superiores a 2000ng/ml y concentraciones de MBL funcional superiores a 3000ng/ml, de forma simultánea. Por otro lado, esta condición no se dio en ningún individuo portador del alelo estructural mutado.

En una segunda fase se realizó el estudio genotípico de MBL a individuos escogidos al azar, de entre todos los RN que presentaron de forma simultánea niveles de MBL proteica y funcional superiores a 2000ng/ml y 3000ng/ml, respectivamente. Este

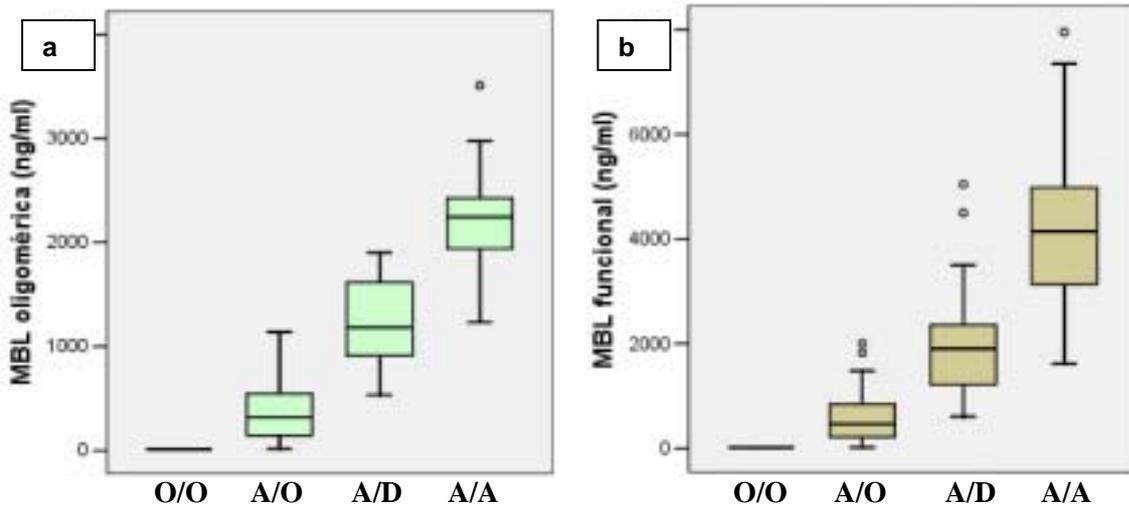
estudio se realizó para confirmar la hipótesis de que no existen portadores de alelos estructurales mutados en dicha población, definida según los valores de la concentración de MBL. Esta condición se dio en 172 de los 340 RN hasta entonces no genotipados. De estos 172 RN se escogieron 49 al azar. El análisis genotípico de MBL confirmó que todos eran homocigotos para el alelo estructural no mutado (A/A) y la mayoría (34/49) con la variante del promotor tipo HY. El genotipo HYA/HYA se detectó en 9 individuos, HYA/LYA en 13 y HYA/LXA en 12. El resto de los 49 individuos tenían los siguientes genotipos: LYA/LYA en 2 individuos, LYA/LXA en 10 y LXA/LXA en 3. No se detectó ningún portador del alelo estructural mutado entre estos 49 individuos.

***Según los resultados obtenidos, a los RN estudiados con niveles simultáneos de MBL proteica y funcional superiores a 2000ng/ml y 3000ng/ml, respectivamente, se les podría considerar como genotipo A/A. Estos RN fueron excluidos del siguiente estudio genotípico.***

#### **4.2.5.2. ESTUDIO GENOTÍPICO DE LA MBL EN RN SELECCIONADOS**

En total se analizó el genotipo de la MBL en 288 recién nacidos. De éstos, 138 (47,9%) eran homocigotos para el alelo estructural no mutado (A/A), 87 (30,2%) heterocigotos para el alelo estructural mutado B, 19 (6,6%) heterocigotos para el alelo estructural mutado C, 34 (11,8%) heterocigotos para el alelo estructural mutado D y 10 (3,4%) eran homocigotos O/O para el alelo estructural mutado B, C o D: cuatro eran B/B, tres B/D, dos B/C y uno D/D.

En la **figura 4.6.** se muestra la representación gráfica de los parámetros estadísticos descriptivos de la determinación de MBL proteica y funcional en los diferentes genotipos estructurales del gen de la MBL.



**Figura 4.6.** Representación gráfica de la determinación de MBL proteica (denominada aquí oligomérica) (a) y funcional (b) en los diferentes genotipos estructurales del gen de la MBL: individuos homocigotos A/A, heterocigotos A/D, A/O (A/O incluye los heterocigotos con el alelo estructural mutado B y C) y homocigotos O/O (donde la O es cualquiera de los alelos estructurales mutados B, C, o D).

Los niveles de MBL proteica y funcional fueron significativamente más altos en los individuos A/A, seguidos de los A/D, con niveles significativamente más altos que en los individuos A/O (A/O incluye los heterocigotos con el alelo estructural mutado B y C),  $p < 0,0001$ . Todos los individuos O/O tuvieron tanto los niveles de MBL proteica como y funcional indetectables o en el límite de la sensibilidad de la técnica.

Existe solapamiento tanto en niveles de MBL proteica como funcional entre los heterocigotos A/D y los homocigotos A/A y entre los heterocigotos A/O y A/D. Este solapamiento se podría explicar, en parte, con la presencia de diferentes variantes del promotor, así que analizamos los homocigotos A/A y los heterocigotos A/O y A/D según el tipo del promotor asociado.

En total se identificaron 25 diferentes genotipos de la MBL (**tabla 4.8**). Los alelos P/Q no parecen tener repercusión sobre los niveles plasmáticos de la MBL<sup>68</sup> igual que los haplotipos que acompañan al alelo polimórfico „O“. Por tanto, para el estudio estadístico, los genotipos identificados se abreviaron obviando la variante del promotor del gen de la MBL P/Q, y en los heterocigotos A/O, obviando el haplotipo que acompañaba al alelo polimórfico „O“. Así se consiguió reducir los diferentes genotipos de la MBL de 25 al total de 13.

En las **tablas 4.8.** y **4.9.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de la determinación de MBL proteica y funcional en los diferentes genotipos de la MBL en los 288 RN analizados.

**Tabla 4.8.** Concentración de MBL proteica (media, mediana, desviación estandar (DE) y valores del percentil 5 y 95) correspondiente a los diferentes genotipos del gen de la MBL (MBL2) detectados en una muestra de 288 recién nacidos.

Genotipo MBL2 estructural	Genotipo MBL2 abreviado*	Genotipo MBL2 completo	MBL proteica (ng/ml)					
			n	Media	Mediana	DE	Percentil 05	Percentil 95
A/A n = 138	HYA/HYA	HYP A/HYP A	25	2382	2401	446	1530	2972
	HYA/LYA	HYP A/LYP A	5	2271	2326	157	2049	2454
		HYP A/LYP A	23	2350	2330	234	1830	2599
		HYP A/LXP A	31	2283	2293	317	1719	2792
		LYP A/LYP A	1	2409	2409		2409	2409
		LYP A/LYP A	1	2180	2180		2180	2180
		LYP A/LYP A	4	2295	2338	102	2144	2361
		LYP A/LXP A	4	2116	2149	368	1693	2474
		LYP A/LXP A	27	1961	1986	349	1437	2426
		LXP A/LXP A	17	1856	1844	301	1347	2604
A/D n = 34	HYA/D	HYP D/HYP A	10	1764	1768	107	1609	1905
	L YA/D	HYP D/LYP A	3	1545	1545	63	1482	1607
		HYP D/LYP A	11	1064	1100	219	633	1365
		HYP D/LXP A	10	779	716	242	536	1256
A/O** n = 106	HYA/O	LYP B/HYP A	36	606	571	180	341	916
		LYP C/HYP A	7	635	656	274	176	1030
	L YA/O	LYP B/LYP A	7	359	501	211	110	565
		LYP B/LYP A	27	226	210	109	93	540
		LYP C/LYP A	9	310	339	46	233	351
		LYP B/LXP A	17	79	72	35	19	177
O/O*** n = 10	O/O	HYP D/HYP D	1	13	13		13	13
		LYP B/HYP D	3	13	13	0	13	13
		LYP B/LYP B	4	13	13	0	13	13
		LYP B/LYP B	4	13	13	0	13	13
		LYP B/LYP C	2	13	13	0	13	13

\*Para el genotipo abreviado no se tuvieron en cuenta las variantes del promotor P/Q.

\*\*Los heterocigotos A/O agrupan los A/B y los A/C. Los heterocigotos A/D se muestran y se analizan por separado. **En los heterocigotos A/O, el genotipo abreviado indica el haplotipo del promotor asociado al alelo estructural no mutado.**

\*\*\* Los homocigotos O/O agrupan los individuos con cualquier combinación de los alelos mutados B, C, o D.

**Tabla 4.9.** Concentración de MBL funcional (media, mediana, desviación estandar (DE) y valores del percentil 5 y 95) correspondiente a los diferentes genotipos del gen de la MBL (MBL2) detectados en una muestra de población de recién nacidos.

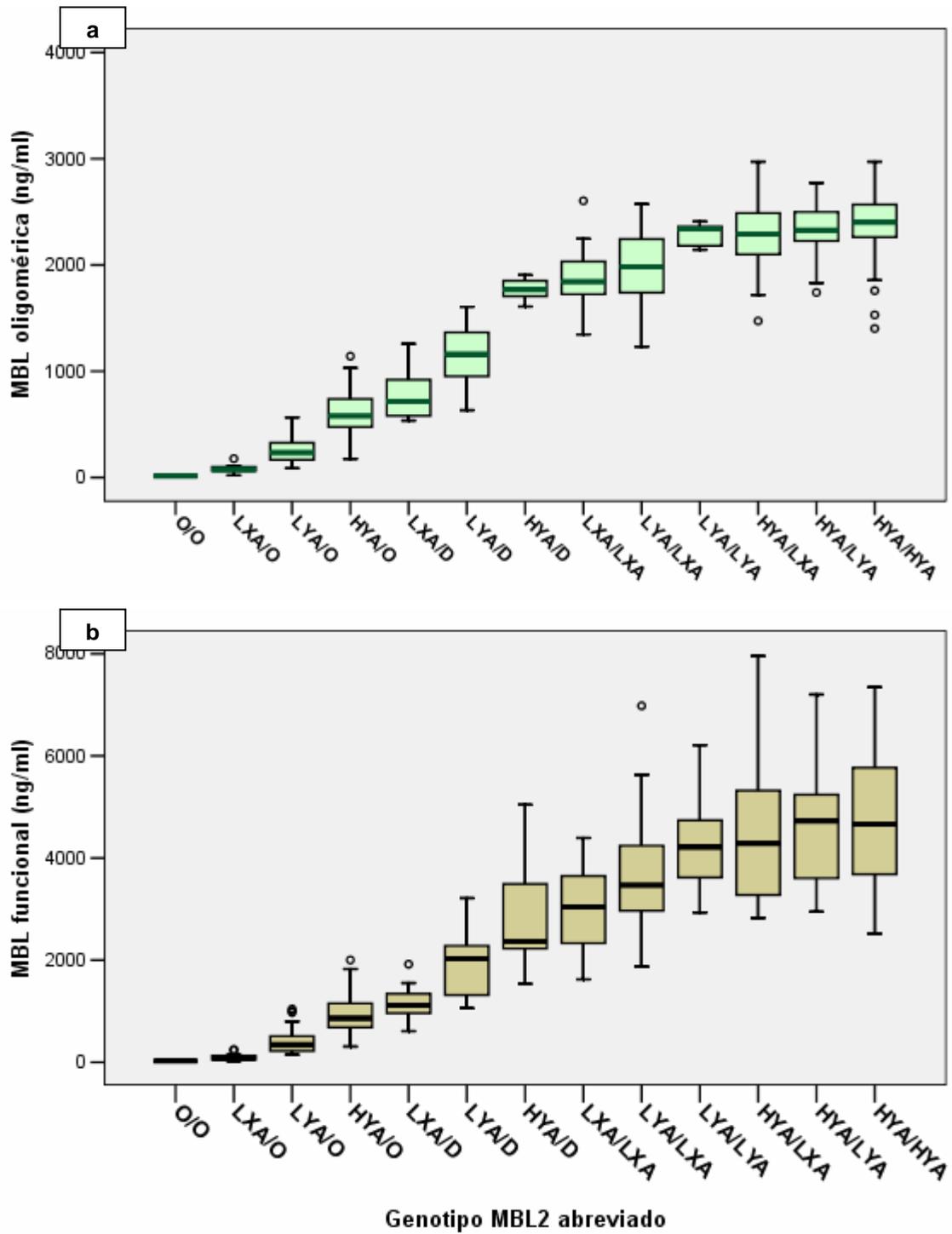
Genotipo MBL2 estructural	Genotipo MBL2 abreviado*	Genotipo MBL2 completo	MBL funcional (ng/ml)					
			n	Media	Mediana	DE	Percentil 05	Percentil 95
A/A n =138	HYA/HYA	HYP A/HYP A	25	4751	4664	1418	2557	7251
		HYP A/LYP A	5	4814	5067	1659	2981	7202
	HYA/LYA	HYP A/LYP A	23	4603	4689	1086	2995	6818
		HYP A/LYP Q	31	4442	4284	1292	2891	7049
	LYA/LYA	LYP B/LYP B	1	3896	3896		3896	3896
		LYP B/LYP Q	1	3618	3618		3618	3618
	LYA/LXA	LYP Q/LYP Q	4	4603	4634	1341	2933	6211
		LYP A/LXP A	4	4163	3354	1896	2964	6980
		LYP Q/LXP A	27	3640	3466	1013	1984	5386
	LXA/LXA	LXP A/LXP A	17	2998	3043	816	1622	4394
A/D n =34	HYA/D	HYP D/HYP A	10	2889	2370	1146	1535	5045
		HYP D/LYP A	3	2734	2563	421	2425	3213
	LYA/D	HYP D/LYP Q	11	1735	1862	467	1059	2281
		LXP A/D	10	1163	1119	382	609	1921
A/O** n = 106	HYA/O	LYP B/HYP A	36	941	855	380	469	1826
		LYP Q/HYP A	7	835	889	290	312	1237
	LYA/O	LYP B/LYP A	7	596	696	381	189	1044
		LYP B/LYP Q	27	340	313	179	164	657
	LYQ C/LYP Q	LYP Q/LYP Q	9	464	454	96	329	571
		LXP A/O	17	89	77	60	24	250
	LYP Q/LXP A	3	127	88	93	60	234	
O/O*** n =10	O/O	HYP D/HYP D	1	24	24		24	24
		LYP B/HYP D	3	24	24	0	24	24
		LYP B/LYP B	4	24	24	0	24	24
		LYP B/LYP Q	2	24	24	0	24	24

\*Para el genotipo abreviado no se tuvieron en cuenta las variantes del promotor P/Q.

\*\*Los heterocigotos A/O agrupan los A/B y los A/C. Los heterocigotos A/D se muestran y se analizan por separado. **En los heterocigotos A/O, el genotipo abreviado indica el haplotipo del promotor asociado al alelo estructural no mutado.**

\*\*\* Los homocigotos O/O agrupan los individuos con cualquier combinación de los alelos mutados B, C, o D.

En la **figura 4.7.** se muestra la representación gráfica de la determinación de MBL proteica y funcional en los diferentes genotipos de la MBL abreviados según se indica en las **tablas 4.8. y 4.9.**



**Figura 4.7.** Representación gráfica de la determinación de MBL proteica (aquí denominada oligomérica) (a) y funcional (b) en los diferentes genotipos del gen de la MBL (MBL2) abreviados. Para ver los genotipos MBL2 concretos, incluidos en cada uno de los genotipos abreviados, consultar “Genotipo MBL2 abreviado” en la **taba 4.8.** o **4.9.**

No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de MBL proteica y funcional entre los homocigotos A/A con el genotipo de la MBL que contenía el haplotipo HYA: individuos HYA/HYA, HYA/LYA, HYA/LXA. En cuanto al resto de los homocigotos A/A, individuos con el genotipo LYA/LYA tenían niveles tanto de MBL proteica como funcional comparables con los obtenidos en los individuos con el haplotipo HYA y significativamente más altos comparado con los LYA/LXA y LXA/LXA, ( $p < 0,01$ ). Los individuos LXA/LXA tenían niveles de MBL proteica comparables con los LYA/LXA ( $p = 0,17$ ), mientras que los niveles de MBL funcional eran significativamente más bajos, ( $p < 0,03$ ).

El solapamiento en los valores de MBL proteica y funcional entre los individuos A/A y A/D se debió fundamentalmente a los valores presentes en los individuos A/D con la variante del promotor HY (individuos HYA/D). Los niveles de MBL proteica y funcional en estos individuos fueron comparables con los obtenidos en los LXA/LXA. Igual que los individuos LXA/LXA, los HYA/D tenían niveles de MBL proteica comparables con los LYA/LXA ( $p = 0,07$ ), mientras que los niveles de MBL funcional eran significativamente más bajos, ( $p < 0,03$ ).

El solapamiento de los valores de MBL proteica y funcional entre los individuos A/D y A/O se debió fundamentalmente a los valores presentes en los individuos LXA/D. Los niveles de MBL proteica y funcional fueron en éstos individuos significativamente más bajos que en los A/D con el haplotipo LYA (individuos LYA/D), ( $p < 0,003$ ) y fueron comparables con valores en los individuos A/O con el genotipo HYA/O ( $p = 0,06$ ). Los individuos LYA/D tenían valores de MBL proteica y funcional significativamente más bajos que los HYA/D ( $p < 0,03$ ) y más altos que los LXA/D, ( $p < 0,003$ ).

En cuanto a los A/O, los individuos con el haplotipo HYA tenían niveles de MBL proteica y funcional significativamente más altos que los individuos con el haplotipo LYA ( $p < 0,00001$ ) y éstos a su vez niveles significativamente más altos que los LXA, ( $p < 0,00001$ ).

***En los homocigotos A/A, los niveles de MBL proteica fueron significativamente más altos en los individuos con cualquiera de las diferentes combinaciones de la variante del promotor HY (HY/HY, HY/LY, HY/LX) y con el promotor de tipo LY/LY comparados con los individuos con el promotor tipo LY/LX o LX/LX, ( $p < 0,00001$ ). Los niveles de MBL funcional fueron***

*significativamente más bajos en los individuos con el genotipo del promotor LX/LX, ( $p < 0,00001$ ).*

*En los heterocigotos A/D, los niveles de MBL proteica y funcional fueron significativamente más altos en los individuos con el haplotipo HYA comparados con los individuos con el haplotipo LYA o LXA, ( $p < 0,003$ ). Los individuos A/D con el haplotipo HYA, tenían niveles de MBL proteica comparables con los homocigotos A/A con el genotipo LYA/LXA y LXA/LXA y los niveles de MBL funcional comparables con los individuos A/A con el genotipo LXA/LXA.*

*En los individuos A/O, los niveles de MBL proteica y funcional fueron significativamente más altos en los individuos con el genotipo HYA/O comparados con los individuos con el genotipo LYA/O o LXA/O, ( $p < 0,00001$ ). Los individuos con el genotipo HYA/O tenían niveles de MBL proteica y funcional comparables con los heterocigotos A/D con el haplotipo LXA (los individuos LXA/D).*

#### **4.2.5.3. GRUPOS DE GENOTIPOS DE LA MBL SEGÚN LOS NIVELES DE MBL PLASMÁTICA**

Las comparaciones múltiples de las concentraciones de MBL proteica y funcional correspondientes a los diferentes genotipos MBL2 estudiados en los 288 recién nacidos permitieron agrupar a los individuos en:

##### **1.- PRODUCTORES DE MBL CON VALORES INTERMEDIOS – ALTOS**

En este grupo se incluyeron los individuos con los siguientes genotipos MBL2: todos los A/A y de los A/D los genotipos HYA/D y LYA/D. Éstos condicionaron en sus portadores **niveles intermedios – altos** de MBL proteica y funcional.

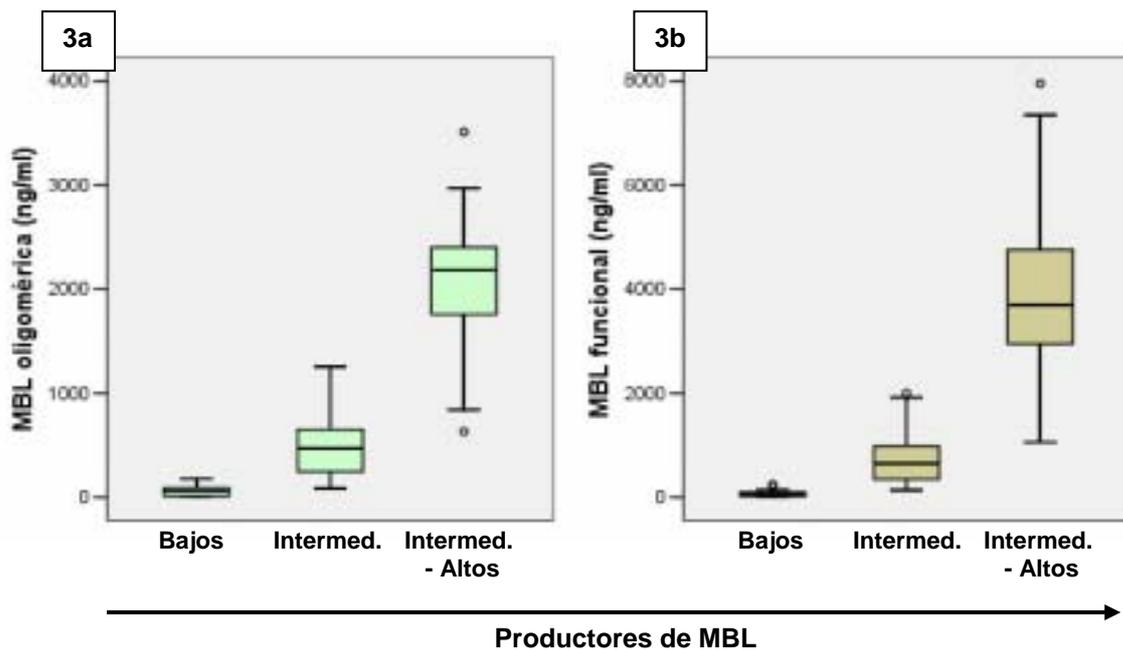
##### **2.- PRODUCTORES DE MBL CON VALORES INTERMEDIOS**

En este grupo se incluyeron los individuos A/D con el genotipo LXA/D y los A/O con el genotipo HYA/O o LYA/O. Estos genotipos condicionaron **niveles intermedios** de MBL proteica y funcional.

### 3.- PRODUCTORES DE MBL CON VALORES BAJOS

En este grupo se incluyeron los individuos A/O con el genotipo LXA/O y todos los O/O. Estos genotipos condicionaron **niveles bajos** de MBL proteica y funcional.

En la **figura 4.8.** se muestra la representación gráfica y en la **tabla 4.10.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de MBL proteica y funcional correspondiente a los productores de MBL con valores bajos, intermedios e intermedios – altos en la población de 288 RN estudiados.



**Figura 4.8.** Representación gráfica de valores de MBL proteica (aquí denominada oligomérica) (3a) y funcional (3b) en los diferentes genotipos MBL2 agrupados según la producción de MBL en productores de MBL con valores bajos, intermedios e intermedios- altos.

Para establecer el valor límite superior de concentración de MBL para los productores bajos, se tomó el valor correspondiente al percentil 95 obtenido en los individuos con el genotipo de este grupo de productores. Este valor fue 112 ng/ml para MBL proteica y 234 ng/ml para MBL funcional, (tabla 4.10.). En base a este criterio, sólo uno de los 30 individuos del grupo de productores de MBL con niveles bajos presentó un valor de MBL proteica inferior a 112 ng/ml y tres de 96 individuos del grupo de productores de MBL con niveles intermedios presentaron valores

inferiores a dicho valor límite. El solapamiento de valores de concentraciones de MBL proteica entre estos dos grupos fue del 3% (4/126)

Para MBL funcional, sólo uno de los 30 individuos del grupo de productores de MBL con niveles bajos presentó un valor de MBL funcional inferior a 234 ng/ml y doce de 96 individuos del grupo de productores de MBL con niveles intermedios presentaron valores inferiores a dicho valor límite. El solapamiento de valores de concentraciones de MBL funcional entre estos dos grupos fue del 9,5% (13/126).

**Tabla 4.10.** Concentración de MBL proteica (arriba) y funcional (abajo) obtenidos en 288 RN. Se muestran valores de media, mediana, desviación estandar (DE) y valores del percentil 5 y 95.

PRODUCTORES DE MBL	MBL proteica (ng/ml)					
	n	Media	Mediana	DE	Percentil 5	Percentil 95
<b>Bajos</b>	30	58	62	42	13	112
<b>Intermedios</b>	96	473	475	260	137	920
<b>Intermedios - Altos</b>	162	2077	2179	466	1187	2750

PRODUCTORES DE MBL	MBL funcional (ng/ml)					
	n	Media	Mediana	DE	Percentil 5	Percentil 95
<b>Bajos</b>	30	71	53	62	24	234
<b>Intermedios</b>	96	718	658	424	214	1479
<b>Intermedios - Altos</b>	162	3916	3693	1431	1871	6602

Para establecer el valor límite superior de concentración de MBL para los productores intermedios se ha tomado la media + 2DE de los valores de MBL proteica y funcional obtenida en este grupo de individuos. Fue el 993 ng/ml para la MBL proteica y 1566 ng/ml para la MBL funcional. En base a este criterio, solo cuatro de los 96 individuos del grupo de los productores de MBL con valores intermedios tenían valores de MBL proteica superior a 993 ng/ml y tres de 162 individuos del grupo de productores de MBL con valores intermedios-altos presentaron valores inferiores a dicho valor límite. El solapamiento de valores de concentraciones de MBL proteica entre estos dos grupos fue del 2,7% (7/258)

Para la MBL funcional, tres de los 96 individuos del grupo de los productores de MBL con valores intermedios tenían valores de MBL funcional superior a 1566 ng/ml

y cinco de los 162 individuos del grupo de productores de MBL con valores intermedios-altos presentaron valores inferiores a dicho valor límite. El solapamiento de valores de concentraciones de MBL funcional entre estos dos grupos fue del 3,1% (8/258)

***Los resultados apoyan la posibilidad de subdividir a los diferentes genotipos de la MBL en tres grupos diferenciados basándose en la concentración de MBL proteica o funcional. Los genotipos O/O y LXA/O condicionaron niveles de MBL plasmática más bajos. Los genotipos LYA/O, HYA/O y LXA/D condicionaron niveles de MBL plasmática intermedios. El resto de los genotipos estudiados condicionaron niveles de MBL plasmática intermedios-altos.***

### 4.3. ESTUDIO DE MBL EN EL GRUPO DE PACIENTES CON IDVC Y DIgA

#### 4.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MBL PROTEICA

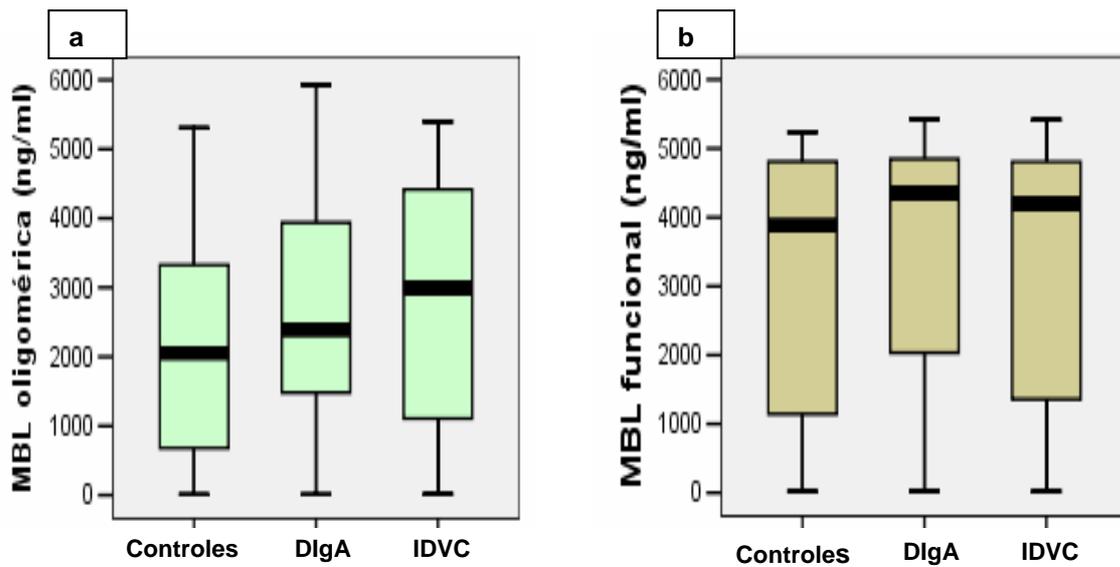
Se determinó la concentración de MBL proteica en el plasma de 45 controles, 46 pacientes con Déficit de IgA (DIgA) y 39 pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC). A todos los resultados obtenidos por debajo del límite de detección se les atribuyó el valor del límite de sensibilidad de método (13 ng/ml), previamente calculado. El porcentaje de los valores indetectables en el grupo control fue el 6,6%, en el de DIgA el 6,5% y en el de IDVC el 2,6%, sin diferencias significativas ( $p=0,3$ ).

En la **tabla 4.11.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de determinación de MBL proteica en el grupo control y en los pacientes con DIgA e IDVC.

**Tabla 4.11. Datos descriptivos de MBL proteica en grupo control, DIgA y IDVC.**

		Grupos de estudio		
		Controles	DIgA	IDVC
<b>MBL proteica (ng/ml)</b>	n	45	46	39
	Media	2257	2649	2745
	Desviación estandar	1669	1704	1825
	Mediana	2283	2393	3000
	Rango	13 -5307	13 - 5930	13 - 5396

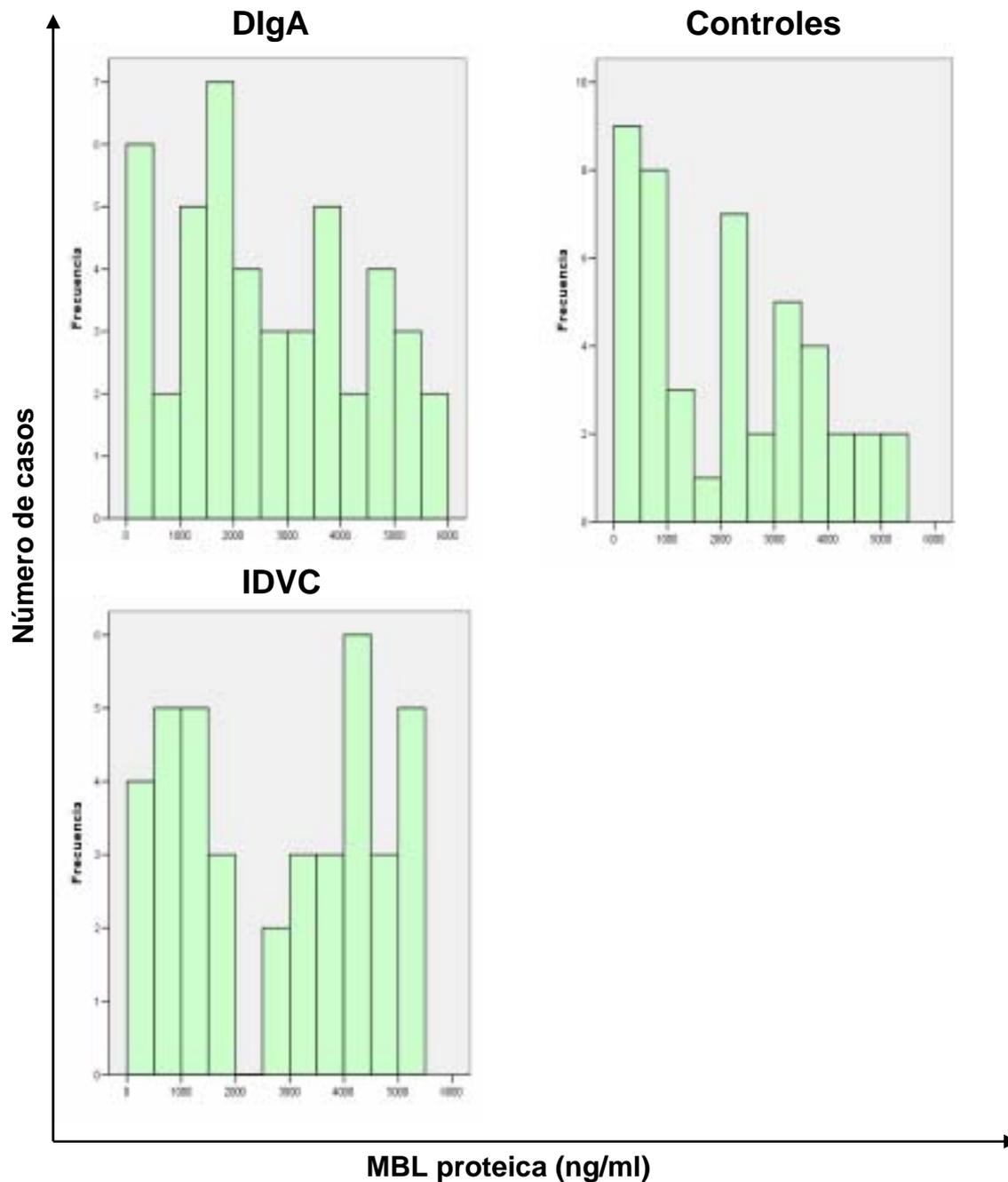
En la **figura 4.9a)** se muestra la representación gráfica de determinación de MBL proteica en las poblaciones estudiadas. Aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov se demostró que la distribución de los valores no sigue una distribución normal. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MBL funcional entre los pacientes con DIgA e IDVC; y entre ambos grupos de pacientes y el grupo control, ( $p=0,16$ ).



**Figura 4.9.** Representación gráfica de determinación de MBL proteica (aquí denominada oligomérica) (a) y de MBL funcional (b), en las poblaciones estudiadas. Las cajas representan los cuartiles 1º y 3º, respectivamente y la mediana corresponde a la línea central.

En los histogramas de la **figura 4.10.** se representa la distribución de los valores de MBL proteica en el grupo control y pacientes con DlgA e IDVC. Estratificando valores de MBL oligomérica y comparando la frecuencia de intervalos de concentraciones entre los grupos estudiados, se observó una mayor frecuencia de valores más altos en los DlgA e IDVC comparado con el grupo control. En concreto, encontramos una frecuencia más alta de los valores superiores a 1000 ng/ml en los pacientes con DlgA y superiores a 2800 ng/ml en los pacientes con IDVC. Así, el 83% de los pacientes con DlgA presenta valores superiores a 1000 ng/ml frente al 62% de controles ( $p < 0,03$ ). En cuanto a los pacientes con IDVC, el 56% de ellos presentan valores de MBL proteica superiores a 2800 ng/ml frente al 33% de controles ( $p < 0,03$ ).

### MBL PROTEICA EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS



**Figura 4.10** Histogramas de frecuencias de los valores de MBL proteica en los grupos estudiados.

*Estratificando los valores de la concentración de MBL encontramos diferencias estadísticamente significativas para valores superiores a 1000ng/ml en DlgA y para valores superiores a 2800ng/ml en IDVC, comparado con el grupo control, ( $p < 0,03$ ).*

### 4.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MBL FUNCIONAL

Se determinó la concentración de MBL funcional en el plasma de 29 controles, 46 DIgA y 39 IDVC. A todos los resultados obtenidos por debajo del límite de detección se les atribuyó el valor del límite de sensibilidad (24 ng/ml), previamente calculado. El porcentaje de los valores indetectables en el grupo control fue el 10,3%, en el de DIgA el 8,6% y en el de IDVC el 10,2%, sin diferencias significativas ( $p=0,3$ ).

En la **tabla 4.12.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de determinación de MBL funcional en el grupo control y en los pacientes con DIgA e IDVC.

**Tabla 4.12. Datos descriptivos de MBL funcional en grupo control, DIgA y IDVC.**

		Grupos de estudio		
		Controles	DIgA	IDVC
<b>MBL funcional (ng/ml)</b>	N	29	46	39
	Media	3087	3483	3162
	Desviación estandar	1930	1703	1895
	Mediana	3882	4352	4193
	Rango	24 - 5236	24 - 5430	24 - 5418

En la **figura 4.9b)** se muestra la representación gráfica de determinación de MBL funcional en las poblaciones estudiadas. Aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov se demostró que la distribución de los valores no sigue una distribución normal. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MBL funcional entre los pacientes con DIgA e IDVC; y entre ambos grupos de pacientes y el grupo control, ( $p=0,63$ ). En los histogramas de la **figura 4.11.** se representa la distribución de los valores de MBL funcional en el grupo control y pacientes con DIgA e IDVC. Estratificando los valores por intervalos de concentraciones no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados

### MBL FUNCIONAL EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

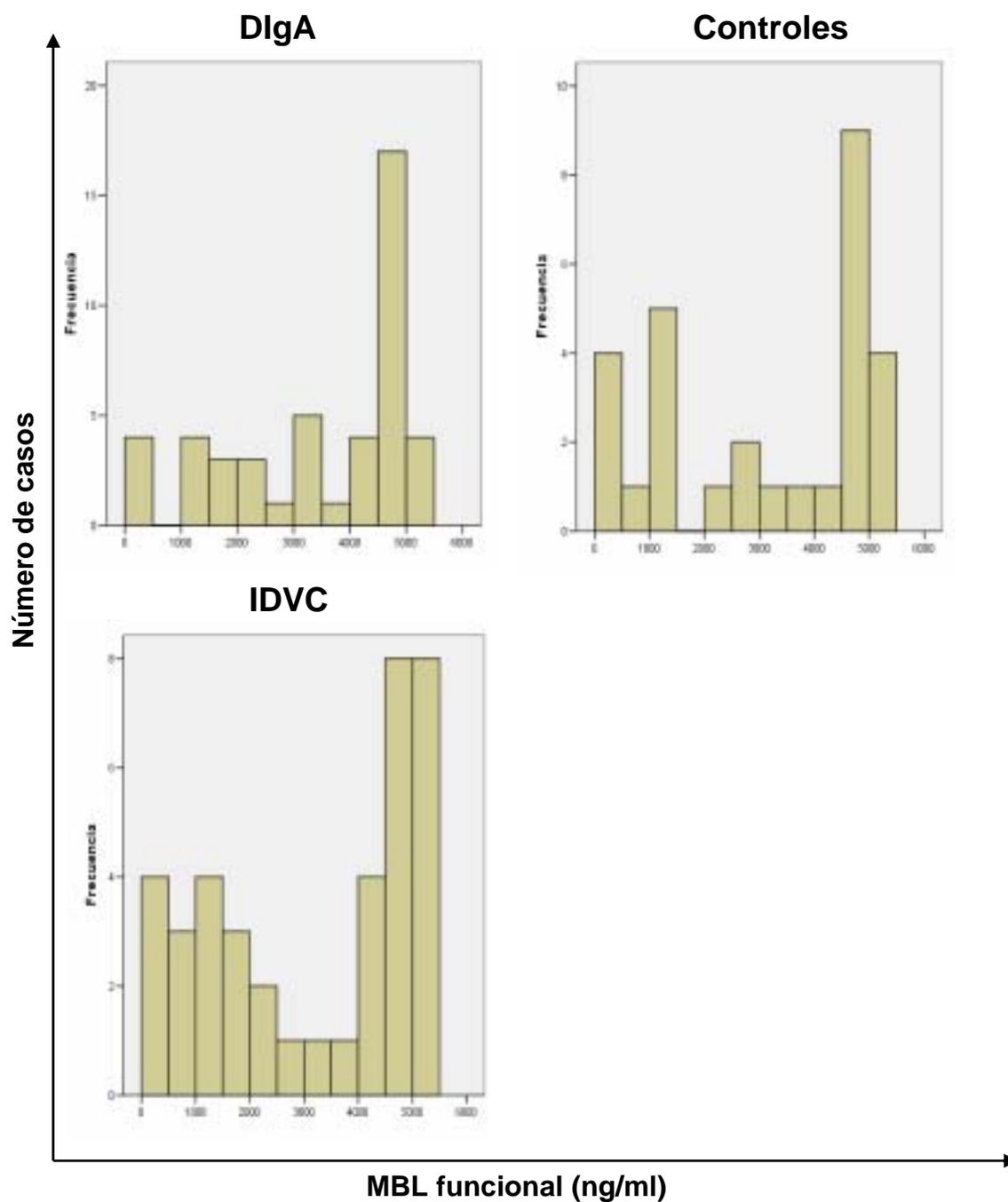


Figura 4.11. Histogramas de frecuencias de los valores de MBL funcional en los grupos estudiados.

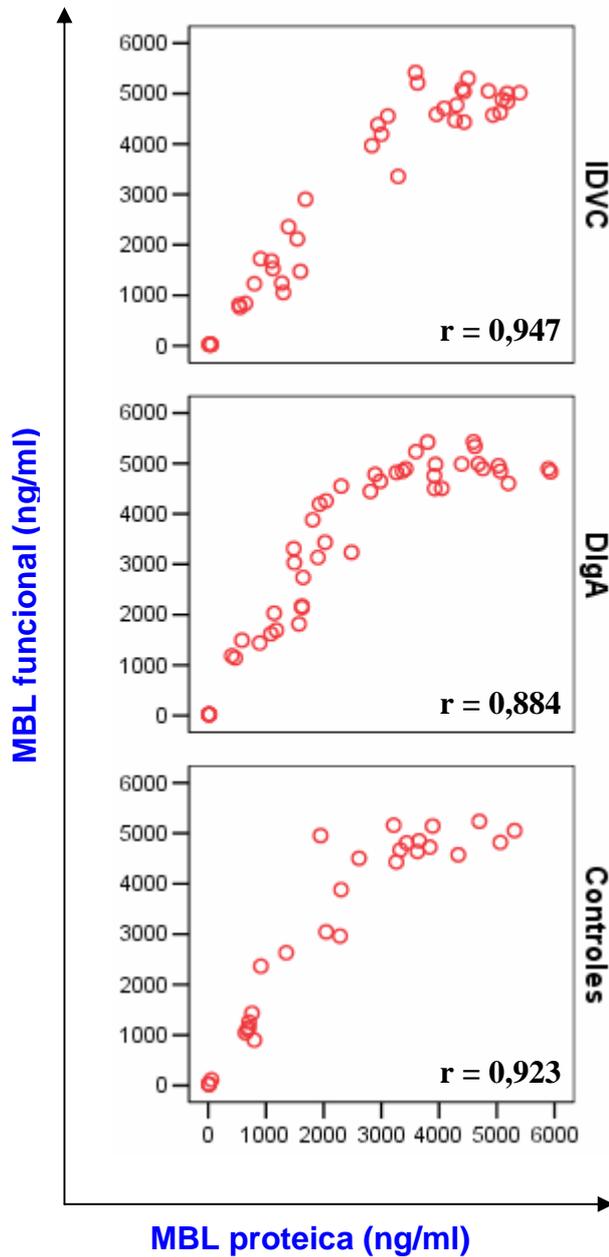
**No existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de MBL funcional entre los pacientes con DlgA e IDVC y el grupo control .**

### **4.3.3. CORRELACIÓN ENTRE MBL PROTEICA Y FUNCIONAL**

En la **figura 4.12.** se muestra la representación gráfica de los valores de MBL proteica y funcional obtenidos en las poblaciones de estudio. Existe una buena correlación entre MBL proteica y MBL funcional tanto en el grupo control ( $r = 0,923$ ) como en pacientes con DIgA ( $r = 0,884$ ) e IDVC ( $r = 0,947$ ).

***Existe una buena correlación entre MBL proteica y MBL funcional tanto en el grupo control como en los pacientes con DIgA e IDVC.***

### CORRELACIÓN ENTRE MBL PROTEICA Y FUNCIONAL EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS



**Figura 4.12.** La representación gráfica de todas las determinaciones de MBL en las poblaciones de estudio. En abscisas se representa MBL proteica y en ordenadas MBL funcional. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson entre MBL proteica y funcional en cada grupo estudiado.

#### **4.3.4. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MBL Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON IDVC Y DlgA**

##### **4.3.4.1. PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN**

En las **tablas 4.13.** y **4.14.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de la determinación de MBL proteica y funcional en los 39 pacientes con IDVC agrupados según las manifestaciones clínicas analizadas. Se exponen los datos sólo de los grupos con más de tres pacientes. La nomenclatura coincide con la utilizada en la **tabla 4.3.** en las columnas de “Manifestaciones clínicas al diagnóstico” y “Evolución clínica”.

**Tabla 4.13.** Concentración de MBL proteica (mediana y valores del percentil 5 y 95) correspondiente a los principales grupos de patologías estudiadas en los pacientes con IDVC.

		MBL proteica ng/ml			
		n	Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Manifest. clínicas al Diagnóstico	IRR	17	3441	644	5183
	IRR, DR	18	3111	535	5396
Bronquiectasias	Sí	26	3592	644	5057
	No	13	2917	535	5396
Bronquiectasias con expectoración	Sí	12	3592	644	4434
	No	14	3689	550	5095
EPC	Sí	11	3954	1120	4933
	No	23	3000	550	5179
Evolución de la patología digestiva	Malabsorción o Diarreas crónicas	9	3447	907	5095
	Patología no digestiva	10	4304	644	5179
Nada en "Evolución clínica"		18	2917	550	5396
EAI	Citopenias	8	3954	1302	5095
	Otras	8	4182	907	5179
	Ninguna	23	2917	542	5290
Esplenomegalia (TAC)	Sí	15	4021	1276	5095
	No	24	3000	550	5183
Linfadenopatías (TAC)	Sí	12	2941	550	5095
	No	27	3441	644	5183
Clasificación BM	BM0	17	4129	535	5095
	BM1	16	1685	550	5179
	BM2	6	3556	799	5396

**Tabla 4.14.** Concentración de MBL funcional (mediana y valores del percentil 5 y 95) correspondiente a los principales grupos de las patologías estudiadas en los pacientes con IDVC.

		n	MBL funcional ng/ml		
			Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Manifest. Clínicas al Diagnóstico	IRR	17	3991	840	5418
	IRR, DR	18	4435	760	5210
Bronquiectasias	Sí	26	4555	840	5298
	No	13	4081	813	5016
Bronquiectasias con expectoración	Sí	12	4555	840	5418
	No	14	4477	760	5298
EPC	Sí	11	4589	1053	5298
	No	23	4193	813	5092
Evolución de la patología digestiva	Malabsorción o Diarreas crónicas	9	4477	1053	4887
	Patología no digestiva	10	4774	840	5418
Nada en "Evolución clínica"		18	3663	760	5298
EAI	Citopenias	8	4435	1053	5298
	Otras	8	4590	1725	5039
	Ninguna	23	3663	786	5314
Esplenomegalia (TAC)	Sí	15	4521	1053	5210
	No	24	3968	813	5298
Linfadenopatías (TAC)	Sí	12	4382	760	5210
	No	27	4453	840	5298
Clasificación BM	BM0	17	4581	813	5210
	BM1	16	2904	760	5418
	BM2	6	4219	1230	5016

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MBL proteica y/o funcional en los pacientes con IDVC con diferente fenotipo clínico. Comparando los valores de MBL proteica y funcional entre los pacientes clasificados según los linfocitos B de memoria (clasificación BM), tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas, **tabla 4.13.** y **4.14.**

***No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MBL proteica o funcional en los pacientes con IDVC con diferente presentación clínica.***

#### **4.3.4.2. PACIENTES CON DÉFICIT DE IgA**

Se recogieron los datos clínicos de 46 pacientes con DIgA. La patología infecciosa respiratoria grave<sup>90</sup> se halló en 9/46 (19,6%), moderada<sup>90</sup> en 12/46 (26,1%) y ninguna o leve en los restantes 25/46 pacientes (54,3%). Procesos diarreicos frecuentes fueron la patología digestiva más destacable en 8/46 (17,4%) mientras que 33/46 pacientes (71,7%) no presentaron ninguna patología gastrointestinal. El 17,4% (8/46) de pacientes tenían alergia, 5 pacientes a aeroalergenos y tres a alergenos alimentarios o medicamentosos. La Enfermedad de Crohn se objetivó en 2 y la celiaquía en 5 pacientes. Entre otras enfermedades autoinmunes se halló la artritis reumatoide en 4 pacientes, diabetes mellitus insulina-dependiente, lupus eritematoso sistémico, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis de Hashimoto y esclerosis múltiple, cada una en un paciente. Dos pacientes tuvieron un título de anticuerpos antinucleares superior a 1/160 sin presentar síntomas de una EAI.

En la **tabla 4.15.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de la determinación de MBL proteica y funcional en los pacientes con DIgA agrupados según las manifestaciones clínicas analizadas. Se exponen los datos sólo de los grupos con más de tres pacientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MBL oligomérica y/o funcional en los pacientes con DIgA con diferente presentación clínica.

***No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MBL proteica y/o funcional en los pacientes con DIgA con diferente presentación clínica***

**Tabla 4.15.** Concentración de MBL proteica (arriba) y funcional (abajo) correspondiente a los principales grupos de patologías de los pacientes con DIgA. Se muestra la mediana y valores del percentil 5 y 95.

		MBL proteica (ng/ml)			
		n	Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Clínica infecciosa grave	Sí	9	3078	1180	4682
	No	37	2646	469	5891
Clínica infecciosa respiratoria	Grave	9	3078	1180	4682
	Moderada	12	2924	409	5930
	Ninguna – Leve	25	2557	892	5200
Patología digestiva	Diarreas recidivantes	8	2863	1180	4619
	Ninguna	33	2892	469	5891
Alergias	Aeroalergenicos	5	1974	1481	3599
	Otros alergenicos	3	1809	585	4619
	Ninguna	36	2892	469	5891
EAI	Celiaquia / Enf.Crohn	7	1625	1086	5891
	Otras	12	3924	1572	5200
	Ninguna	25	2173	469	4758

		MBL funcional (ng/ml)			
		n	Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Clínica infecciosa grave	Sí	9	4644	1694	5340
	No	37	4472	1187	5424
Clínica infecciosa respiratoria	Grave	9	4644	1694	5340
	Moderada	12	4135	1142	5424
	Ninguna – Leve	25	4472	1494	5233
Patología digestiva	Diarreas recidivantes	8	4654	1694	5424
	Ninguna	33	4499	1187	5233
Alergias	Aeroalergenicos	5	3931	2739	5233
	Otros alergenicos	3	3882	1494	5340
	Ninguna	36	4499	1187	5424
EAI	Celiaca / Enf.Crohn	7	2171	1622	4895
	Otras	12	4847	1817	5340
	Ninguna	25	4381	1187	5424

EAI: enfermedad autoinmune

#### **4.3.5. ESTUDIO DEL GENOTIPO DE LA MBL EN PACIENTES CON IDVC Y DIgA**

El genotipo de la MBL se identificó en 50 pacientes (23 pacientes con DIgA y 27 pacientes con IDVC). (Nota: El diseño experimental del presente estudio no consideraba necesario la realización del estudio genotípico de la MBL en el grupo control.) En la **tabla 4.16.** se resumen los parámetros estadísticos descriptivos de la concentración de MBL proteica y funcional correspondiente a los diferentes genotipos de la MBL en los 50 pacientes analizados.

**Tabla 4.16** Concentración de MBL proteica (arriba) y funcional (abajo) correspondiente a los diferentes genotipos MBL2 detectados en 50 pacientes con DIgA e IDVC. Se muestra la media, la mediana, desviación estandar y valores del percentil 5 y 95.

Genotipo MBL2 estructural	Genotipo MBL2 abreviado	MBL proteica (ng/ml)					
		n	Media	Mediana	Desviación estandar	Percentil 5	Percentil 95
A/A	HYA/HYA	4	3988	3938	977	2892	5183
	HYA/LYA	6	4187	4185	769	3000	5095
	HYA/LXA	7	3516	3954	1567	1492	5179
	LYA/LYA	3	4242	4933	2084	1900	5891
	LYA/LXA	4	3521	3983	1288	1685	4434
	LXA/LXA	2	1695	1302	681	1302	2482
A/D	HYA /D	3	2070	2304	881	1095	2810
	LYA/D	2	2467	2467	1165	1643	3290
	LXA/D	2	526	526	166	409	644
A/O*	HYA /O	6	1075	1126	326	535	1481
	LYA/O	7	1061	1143	433	550	1597
	LXA/O	2	35	35	25	18	53
O/O**	O/O	2	13	13	0	13	13

		MBL funcional (ng/ml)					
		n	Media	Mediana	Desviación estandar	Percentil 5	Percentil 95
A/A	HYA/HYA	4	4832	4812	313	4470	5233
	HYA/LYA	6	4929	5011	404	4193	5424
	HYA/LXA	7	4135	4589	1177	2118	5341
	LYA/LYA	3	4201	4573	937	3135	4895
	LYA/LXA	4	4258	4518	945	2904	5092
	LXA/LXA	2	1781	1053	1260	1053	3236
A/D	HYA/D	3	3559	4445	1629	1679	4552
	LYA/D	2	3049	3049	438	2739	3358
	LXA/D	2	1013	1013	245	840	1187
A/O*	HYA/O	6	1848	1627	903	813	3311
	LYA/O	7	1500	1494	417	760	2031
	LXA/O	2	24	24	1	24	25
O/O**	O/O	2	24	24	0	24	24

\*Los heterocigotos A/O agrupan los A/B y los A/C. Los heterocigotos A/D se muestran y se analizan por separado.

\*\*Los homocigotos O/O agrupan los individuos con cualquier combinación de los alelos mutados B, C, o D. Con diferente color de sombreado se diferencian los genotipos pertenecientes a los tres grupos de productores de niveles de MBL. (Para más detalles ver el siguiente capítulo.)

### 4.3.6. CORRELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO DE LA MBL Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON IDVC Y DlgA

#### 4.3.6.1. PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

Los genotipos identificados en los 27 pacientes con IDVC se clasificaron, según el modelo establecido en la población de 288 RN analizados, en grupos de productores de MBL con valores bajos (sombreado amarillo en la tabla 4.16.), intermedios (sombreado verde en la tabla 4.16.) e intermedios–altos (sombreado azul en la tabla 4.16.) . Los valores de MBL proteica y funcional correspondientes a estos grupos se resumen en la **tabla 4.17.**

**Tabla 4.17.** Concentración de MBL proteica (arriba) y MBL funcional (abajo), correspondiente a los 27 pacientes con IDVC genotipados agrupados por los productores de MBL. Se muestra la mediana y valores del percentil 5 y 95.

		MBL proteica (ng/ml)			
		n	Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Productores	Bajos	2	35	18	53
	Intermedios	8	853	535	1276
	Intermedios – Altos	17	4276	1302	5183
	Total	27	1685	53	5179

		MBL funcional ng/ml			
		n	Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Productores	Bajos	2	24	24	29
	Intermedios	8	1236	760	1529
	Intermedios – Altos	17	4470	1679	5092
	Total	27	2904	24	5049

El valor correspondiente al percentil 5 y 95 de la concentración de MBL proteica y funcional obtenido en el grupo de productores de MBL con valores intermedios, **tabla 4.17.** se utilizó como valor límite para dividir a los pacientes no genotipados en productores bajos, intermedios e intermedios–altos. De los pacientes no genotipados, 2 presentaron niveles compatibles con el grupo de productores de niveles de MBL bajos (presentaron niveles en el límite de detección de ambas técnicas de ELISAs utilizadas), y 10 tenían niveles de MBL compatibles con los productores intermedios–altos (todos tenían niveles superiores a 1391ng/ml de MBL proteica y 2359ng/ml de MBL funcional).

En la **tabla 4.18.** se resumen las manifestaciones clínicas de los productores de MBL con valores bajos, intermedios e intermedios–altos. La nomenclatura coincide con la utilizada en la **tabla 4.3.** en las columnas de “Manifestaciones clínicas al diagnóstico” y “Evolución clínica”.

***No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de las manifestaciones clínicas estudiadas entre los diferentes grupos de pacientes con IDVC clasificados por productores de MBL.***

**Tabla 4.18.** Presentación clínica de los pacientes con IDVC por productores de MBL

IDVC		Productores de MBL con valores:			
		Bajos n = 4	Intermedios n = 9	Intermedios- Altos n = 28	Total N = 41
Manifest. Clínicas al Diagnóstico	EAI	0	0	3	3
	DR	0	0	1	1
	IRR	3	6	9	18
	IRR, DR	1	3	15	19
Bronquiectasias	Sí	3	6	18	27
	No	1	3	10	14
Bronquiectasias con expectoración	Sí	1	3	9	13
	No	2	3	9	14
	El resto de pacientes	1	3	10	14
EPC	Sí	2	1	8	11
	No	2	7	16	25
	PFR nr	0	1	4	5
Evolución de la patología digestiva	Malabsorción o Diarreas crónicas	1	10	10	21
	DR	0	1	1	2
	Patología no digestiva	3	3	6	12
Nada en "Evolución clínica"		1	3	15	19
EAI	Citopenias	1	1	6	8
	Ninguna	3	7	14	27
	Otras	0	1	8	9
Esplenomegalia (TAC)	No	3	8	14	25
	Sí	1	1	14	16
Linfadenopatias (TAC)	No	1	7	18	26
	Sí	3	2	10	15
Clasificación BM	BM0	3	2	13	18
	BM1	1	5	10	16
	BM2	0	2	5	7
<b>MBL ng/ml</b>		32	853	4088	3000
Mediana	Proteica	18 - 53	535 - 1276	1302 - 5183	22 - 5183
Percentil 05 – percentil 95	Funcional	24	1236	4589	4193
		24 - 24	760 - 1529	1679 - 5298	24 - 5298

Nuevas abreviaturas: PFR nr Pruebas de función respiratoria no realizadas

#### 4.3.6.2. PACIENTES CON DÉFICIT DE IgA

Los genotipos identificados en los 23 pacientes con DIgA se agruparon, según el modelo establecido en la población de 288 RN analizados, en grupos de productores de MBL con valores bajos (sombreado rojizo en la tabla 4.16.), intermedios (sombreado verde en la tabla 4.16.) e intermedios–altos (sombreado azul en la tabla 4.16.) Los valores de MBL proteica y funcional correspondientes a estos grupos se resumen en la **tabla 4.19.**

**Tabla 4.19.** Concentración de MBL proteica (arriba) y MBL funcional (abajo) correspondiente a los 23 pacientes con DIgA por productores de MBL. Se muestra la mediana y valores del percentil 5 y 95.

		MBL proteica (ng/ml)			
		n	Mediana	Percentil 05	Percentil 95
Productores	Bajos	2	13	13	13
	Intermedios	7	1180	409	1572
	Intermedios – Altos	14	3157	1492	5891
	Total	23	1900	13	4758

		MBL funcional (ng/ml)			
		n	Mediana	Percentil 05	Percentil 95
Productores	Bajos	2	24	24	24
	Intermedios	7	1817	1140	3311
	Intermedios - Altos	14	4839	2739	5424
	Total	23	3236	24	5233

El valor correspondiente al percentil 5 y 95 de la concentración de MBL proteica y funcional obtenido en el grupo de productores intermedios, **tabla 4.19.**, se utilizó como valor límite para dividir a los pacientes no genotipados en productores de MBL con valores bajos, intermedios e intermedios–altos. De los pacientes no genotipados 2 presentaron niveles compatibles con el grupo de productores de MBL con valores bajos (presentaron niveles de MBL, tanto proteica como funcional, indetectables), 4 niveles intermedios (sus niveles de MBL proteica oscilaron entre 469ng/ml y 1520ng/ml, y para MBL funcional entre 1142ng/ml y 2144ng/ml) y 17 pacientes tenían niveles superiores a 1800ng/ml para MBL proteica y 3436ng/ml para MBL funcional.

En la **tabla 4.20.** se resumen las manifestaciones clínicas de los pacientes con DlgA clasificados en productores de MBL con valores bajos, intermedios e intermedios–altos.

**Tabla 4.20.** Presentación clínica de los pacientes con DlgA por productores de MBL

DlgA		Productores de MBL con valores			
		Bajos	Intermedios	Intmedios-Altos	Total
		n = 4	n = 11	n = 31	n = 46
Clínica infecciosa grave	Si	1	2	6	9
	No	3	9	25	37
Clínica infecciosa respiratoria	Grave	1	2	6	9
	Moderada	0	3	9	12
	Ninguna – Leve	3	6	16	25
Patología digestiva	Diarreas frecuentes	0	3	5	8
	Ninguna	4	6	23	33
Alergias	Aeroalergenos	1	1	3	5
	Otros alergenicos	0	1	2	3
	Ninguna	3	9	24	36
EAI	Celiaquia / Enf.Crohn	0	4	3	7
	Otras	1	1	10	12
	Ninguna	3	5	17	25
<b>MBL ng/ml</b>	Proteica	13	1143	3599	2393
	Mediana	13 - 13	409 - 1625	1643 - 5200	13 – 5200
Percentil 05 – percentil 95	Funcional	24	1694	4783	4352
		24 - 24	1140 - 3311	3031 - 5340	24 – 5340

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de las manifestaciones clínicas estudiadas entre los diferentes grupos de productores de MBL.

***En los pacientes con DlgA, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de las manifestaciones clínicas estudiadas entre los diferentes grupos de productores de MBL.***

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1 ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS B DE MEMORIA EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN (IDVC)

Corroboramos que mediante la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos B de memoria, los pacientes con IDVC se pueden clasificar en tres grupos<sup>54</sup>: el grupo BM2 incluye pacientes con un número normal de linfocitos B (LB) de memoria con y sin cambio de isotipo, el grupo BM1 incluye pacientes con una reducción significativa de los LB de memoria con cambio de isotipo y finalmente el grupo BM0 incluye pacientes que presentan una reducción significativa de los dos tipos de LB de memoria.

El estudio del fenotipo clínico de los pacientes con IDVC, así clasificados, ha puesto en evidencia que los defectos de células B de memoria en sangre periférica, podrían estar relacionados con algunos aspectos clínicos de estos pacientes. La ausencia de LB de memoria (el defecto de LB más grave) se correspondió con una mayor gravedad en la evolución clínica, observando mayor incidencia de enfermedad pulmonar crónica, bronquiectasias con expectoración, síndrome de malabsorción y manifestaciones linfoproliferativas.

Warnatz *et al*<sup>63</sup> de Freiburg, Alemania, en el año 2002, han propuesto la primera clasificación de los pacientes con IDVC basada en el número y tipo de los LB de memoria (Clasificación de Freiburg). Según esta clasificación, los pacientes del grupo 1 presentan una disminución del porcentaje de células B de memoria (CD27+IgM-IgD-), mientras que el grupo 2 tiene un porcentaje de estas células similar al presente en los individuos sanos. A su vez, el grupo 1 se subdivide en 1a (pacientes con una proporción incrementada de linfocitos B inmaduros (CD21-) y en 1b (pacientes con un porcentaje normal de linfocitos B CD21-). Sin embargo, la imagen citométrica de los LB CD21- es muy dispersa, con límites de positividad o negatividad difícil de definir. Por todo ello, la valoración de las imágenes citométricas y por consiguiente la clasificación de los pacientes podría no ser unívoca. Poco después, en el año 2003, Piqueras *et al*<sup>64</sup> de París, Francia, simplificaron esta clasificación, basándose sólo en la expresión de CD27 e IgD (Clasificación de París). Estos dos marcadores proporcionan unas imágenes citométricas más claras y reproducibles. Por dichos motivos, para clasificar a los pacientes con IDVC hemos utilizado la Clasificación de París<sup>54</sup>.

Los linfocitos B (LB) de memoria son células clave en el proceso de formación de los anticuerpos y desde que se describió la molécula CD27 como su marcador<sup>55</sup>, la disminución de estas células en los pacientes con IDVC ha sido documentada<sup>53,54,56-58</sup>. La molécula CD27<sup>53-48</sup> es una glicoproteína transmembrana de la familia del receptor de TNF y la interacción con su ligando CD70, en las células T activadas, juega un papel crucial en la diferenciación de la célula B a célula plasmática<sup>56</sup>. Por tanto, no es de extrañar que los defectos de LB CD27+ (memoria) sean útiles para clasificar a los pacientes con IDVC<sup>53,54</sup>.

Bryant y col<sup>43</sup>. describieron en 1990 un método de clasificación funcional de los enfermos con IDVC en base a la capacidad de sus células B de producir inmunoglobulinas (Igs) *in vitro*. Según esta clasificación, los pacientes del grupo A no producen ningún isotipo de Igs, los del grupo B secretan IgM y los pertenecientes al grupo C son capaces de producir tanto IgM como IgG. Diversos estudios describieron una buena correlación entre las clasificaciones basadas en la expresión de CD27 y las basadas en la producción de Igs *in vitro*<sup>53,56,58</sup>, ya que la secreción de IgG depende de la presencia de LB de memoria con cambio de isotipo. Por lo tanto, el grupo A de la clasificación de Bryant se corresponde al grupo BM0 de la clasificación de París, el grupo B al grupo BM1 y el C al BM2<sup>54</sup>. La producción de Igs *in vitro* es una técnica laboriosa cuyos resultados son difícilmente extrapolables y comparables entre laboratorios. Las ventajas de utilizar la citometría de flujo son su accesibilidad, su estandarización relativamente fácil y la buena reproducibilidad de los resultados.

Utilizando la citometría de flujo y basándonos en la expresión de IgD y CD27, identificamos tres subpoblaciones de LB (CD19+) en la sangre de donantes sanos: los LB *naïve*-vírgenes, CD27-IgD+ (57 ± 14%), las células CD27+IgD+ (17 ± 7%), que representan los LB de memoria sin cambio de isotipo, y la subpoblación CD27+IgD- (22 ± 10%) que define a los LB de memoria con cambio de isotipo. El porcentaje de LB de memoria totales fue del 39 ± 13%. Estos valores no difieren de los publicados por los autores de Freiburg<sup>53</sup> y París<sup>54</sup> en controles sanos.

En los pacientes con IDVC estudiados por nosotros, la distribución de las subpoblaciones de LB fue muy diferente a la hallada en los controles. Se observó una profunda disminución de los LB de memoria ( $p < 0.0001$ ), al igual que han descrito otros grupos de trabajo<sup>53-58</sup>.

Para la clasificación de los pacientes con IDVC en grupos, según la cuantificación de las subpoblaciones de LB de memoria, se ha utilizado como punto de corte el valor mínimo obtenido de las determinaciones de estas subpoblaciones en los controles. Así, el punto de corte para los LB de memoria totales fue 13% y para los LB de memoria con cambio de isotipo fue 6% del total de los LB de sangre periférica. Dichos valores fueron los que mejor diferenciaban a los pacientes de los controles y que a su vez permitieron diferenciar los tres grupos de pacientes. Estos valores son similares a los establecidos por Piqueras *et al.*<sup>54</sup>, del 11% para los LB de memoria totales y el 8% para los LB de memoria con cambio de isotipo. De los 57 pacientes estudiados en el mencionado trabajo<sup>54</sup>, el 47% de los pacientes pertenecieron al grupo BM0, el 33% al grupo BM1 y el 19% restante al grupo BM2. La distribución por grupos de los 41 pacientes estudiados en nuestro trabajo (44%, 39% y 17% respectivamente) fue muy parecida, por lo que se podría considerar que nuestra muestra de pacientes, aunque más pequeña, es igualmente representativa de los pacientes con IDVC.

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

El grupo BM2 incluyó pacientes cuyos LB expresaban el fenotipo más parecido a los controles sanos, con presencia de ambos tipos de LB de memoria estudiados. A este fenotipo inmunológico le correspondieron unas manifestaciones clínicas más leves: ningún paciente de este grupo desarrolló complicaciones respiratorias o gastrointestinales graves, un enfermo sufrió alopecia areata, vasculitis con manifestaciones únicas a nivel del sistema nervioso central, esplenomegalia, leuco y plaquetopenia (paciente 37), un paciente presentó déficit de IgA y anemia ferropénica y otro plaquetopenia. Piqueras *et al.*<sup>54</sup> estudiaron marcadores de activación de LB y LT en los pacientes con IDVC, clasificados en grupos BM. Encontraron que los pacientes del grupo BM2 presentaron patrones de expresión de marcadores de activación muy similares a los hallados en los controles sanos. Tanto el fenotipo inmunológico como clínico (Piqueras *et al.*<sup>54</sup> y nuestras observaciones)

diferenciaron claramente a los pacientes del grupo BM2 de los otros dos grupos. Estas observaciones, junto con el hecho de que los LB, bajo las condiciones experimentales *in vitro*, son capaces de producir IgG e IgM<sup>43</sup>, sugieren que una característica principal de los pacientes en el grupo BM2 podría ser un defecto en la fase final de la producción de inmunoglobulinas<sup>96</sup>.

Al grupo BM1, caracterizado por un fallo en el desarrollo de los LB de memoria con cambio de isotipo, le correspondió el fenotipo clínico intermedio, entre los pacientes con sintomatología mínima del grupo BM2 y los pacientes del grupo BM0 con la sintomatología más grave. Agematsu *et al*<sup>68</sup> estudiaron la frecuencia de hipermutación somática de la región variable de los genes de las inmunoglobulinas expresados en los LB de pacientes con mayoría de LB sin cambio de isotipo (LB CD27+IgD+) en sangre periférica. (Nota: En los individuos sanos todos los LB de memoria pasan por el proceso de maduración de afinidad de los anticuerpos, llamado hipermutación somática). En los pacientes estudiados encontraron una frecuencia de hipermutación somática muy inferior a la frecuencia encontrada en los controles sanos, indicando que la mayoría de los LB de estos pacientes son fenotípica y funcionalmente *naïve* y que los LB CD27+IgD+ de pacientes con IDVC no son LB de memoria funcionales. Los LB en estos pacientes no pueden responder a la señal proporcionada por los LT o no la reciben debido a un defecto intrínseco del LT<sup>97-99</sup>. Como resultado, los LB CD27+IgD+ no progresan a LB de memoria con cambio de isotipo. Los pacientes del grupo BM1 serían candidatos al estudio de las alteraciones de moléculas co-estimuladoras de los LT activados (p.ej. CD40L<sup>100,101</sup>, ICOSL<sup>102</sup>, etc.).

Al grupo BM0, caracterizado por una reducción importante de todos los LB de memoria le correspondieron manifestaciones clínicas más graves. El desarrollo de los LB de memoria está fuertemente ligado a la formación de los centros germinales en los órganos linfoides secundarios<sup>97-99</sup>. El hallazgo de una reducción significativa de los LB de memoria en el grupo BM0 apoya fuertemente la hipótesis de que existan alteraciones en los centros germinales de los pacientes de este grupo. Se han descrito varias posibles causas de alteración de las interacciones en los centros germinales: mutaciones en el gen del ligando de CD40<sup>103</sup>, defectos en la familia del TNF $\alpha$  y su receptor<sup>104</sup> y fallo en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86)<sup>105</sup> o quimiocinas (quimioatrayente de los LB)<sup>106</sup>. Todas estas moléculas son necesarias para la formación de los centros germinales y una interacción bien coordinada entre las células T y B.

Los estudios clínicos publicados hasta la actualidad no valoraron la asociación entre la patología respiratoria o digestiva y los defectos de LB de memoria<sup>53,54</sup>. Piqueras y col.<sup>54</sup>, autores de la clasificación utilizada en este trabajo, encontraron una distribución similar de manifestaciones autoinmunes entre los tres grupos: BM0, BM1 y BM2, mayor incidencia de enfermedad granulomatosa y proliferación linfoide secundaria en los pacientes del grupo BM0 y finalmente, esplenomegalia en el 59% de los pacientes del grupo BM0 y en el 50% de los pacientes del grupo BM1. Dichos autores<sup>54</sup> no valoraron la presencia de bronquiectasias, enfermedad pulmonar crónica o síndrome de malabsorción. Por otra parte, valoraron la presencia de infecciones piógenas, víricas o causadas por patógenos intestinales, no encontrando diferencias en la incidencia de las mismas entre los diferentes grupos de enfermos. Dichos investigadores describieron episodios infecciosos sufridos por los pacientes en algún momento de la vida, pero no valoraron la presencia de éstas al inicio de la enfermedad, al diagnóstico y una vez establecido el tratamiento sustitutivo. Por otro lado, la falta de relación entre subgrupos de células B y episodios de infección no es sorprendente, ya que el estudio fue realizado en pacientes sometidos a tratamiento sustitutivo con gammaglobulinas y este tratamiento ha demostrado ser muy eficaz en la prevención de procesos infecciosos agudos<sup>23</sup>.

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

La infección no sólo debe valorarse como incidencia de episodios agudos graves, sino también como procesos de infección-inflamación crónica. En el caso del aparato respiratorio, éstos son los procesos responsables de la aparición de patología supurativa crónica, como bronquiectasias, que son la causa principal del

deterioro progresivo de la función pulmonar y de muerte en la evolución natural de esta enfermedad<sup>18,23,107</sup>.

Kainulainen *et al*<sup>107</sup>, en un estudio prospectivo de 14 pacientes con hipogammaglobulinemia primaria, demostró la progresión de las bronquiectasias en 5 pacientes, a pesar de que todos ellos recibían tratamiento sustitutivo regular, con niveles preinfusionales de IgG de más de 500 mg/dl (Nota: niveles de acuerdo con los actuales criterios de tratamiento<sup>31</sup>) y no presentaron ninguna infección respiratoria aguda.

No conocemos el número de pacientes que ya tenían bronquiectasias en el momento del diagnóstico, pero comparando la edad de inicio de los síntomas, retraso diagnóstico, el tiempo en tratamiento o edad actual, todos ellos factores descritos previamente, que potencian el desarrollo del daño pulmonar irreversible<sup>16-20</sup>, no hubo diferencias entre el grupo de pacientes con y sin bronquiectasias y con y sin enfermedad pulmonar crónica. Por eso, creemos que la evolución clínica de los pacientes estudiados es debida al defecto primario de base y/o a otros factores inmunomoduladores de la respuesta inflamatoria<sup>108</sup>.

Los autores<sup>54</sup> que han investigado el fenotipo de los LB y LT en los pacientes con IDVC más detalladamente, han encontrado alteraciones en la expresión de algunos de los marcadores de activación (CD25, CD21, CD80 y CD86) en las células B y una hiperexpresión de marcadores de activación crónica (HLA-DR, CD95, CD57) en las células T CD4+ y CD8+, en los pacientes de los grupos BM0 y BM1. Este resultado va en línea con nuestra observación de una afectación clínica e inmunológica importante en estos dos grupos de pacientes. En nuestro estudio, la mayor diferencia hallada al comparar los tres grupos de pacientes entre sí, fue la clínica más grave en el grupo BM0. Las alteraciones del fenotipo inmunológico encontradas en los pacientes del grupo BM0 concordaron con una actividad inflamatoria aumentada en éstos (aumento de CD8, leucocitosis, rasgos de anemia ferropénica).

El tratamiento actual de los pacientes inmunocompetentes con bronquiectasias incluye antibioticoterapia profiláctica continuada<sup>109</sup>, glucocorticoides inhalados<sup>110</sup> y antiinflamatorios no esteroideos<sup>111</sup>, dirigidos a disminuir la actividad inflamatoria en los bronquios. Aunque actualmente el empleo de agentes inmunosupresores/antiinflamatorios en los pacientes con IDP está reservado a las

complicaciones autoinmunes<sup>112</sup>, creemos que al menos en los pacientes del grupo BM0 debería ser considerado como un tratamiento adicional a una sustitución adecuada con gammaglobulina intravenosa<sup>107</sup>.

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

En cuanto a la incidencia de manifestaciones autoinmunes, cerca del 41% de los pacientes las presentaron en algún momento de su vida. Los porcentajes descritos en la literatura varían entre el 19% (18/95)<sup>20</sup>, 35% (20/57)<sup>54</sup> y 50% (15/30)<sup>53</sup>. En la IDVC han sido asociadas sobre todo las citopenias autoinmunes presentes en el 4%<sup>20</sup>, 17%<sup>54</sup> y 23%<sup>53</sup> de los pacientes con IDVC estudiados en los trabajos arriba mencionados, respectivamente. En nuestro trabajo hemos observado la presencia de citopenias autoinmunes en el 19% de los pacientes. Piqueras *et al.*<sup>54</sup> encontraron manifestaciones autoinmunes en los tres grupos de pacientes, BM2(27%), BM1(39%) y BM0(37%). En nuestro estudio, las diferencias de frecuencia de procesos autoinmunes en el grupo BM0(55%), BM1(38%) y BM2(14%) tampoco fueron estadísticamente significativas, aunque mostraron una cierta tendencia a ser más frecuentes en el grupo BM0.

La etiología de los procesos autoinmunes es un tema de discusión actual y es más complejo entre los pacientes con IDVC<sup>112,113</sup>, ya que son conocidos tanto los casos en los que los fenómenos autoinmunes desaparecen una vez establecida y tratada la IDVC (casos de debut clínico con enfermedad autoinmune), como los casos en los que la enfermedad autoinmune aparece como una complicación a lo largo de la evolución clínica de la IDVC. En los pacientes con una actividad inflamatoria elevada, como en el caso del grupo BM0, los fenómenos autoinmunes se podrían considerar secundarios a una disregulación inmunológica en pacientes con defectos en la capacidad de respuesta anti-infecciosa<sup>108</sup>. La desaparición de los fenómenos

autoinmunes una vez controladas las infecciones, hace sospechar un desencadenante infeccioso de éstos. Por otro lado, la ausencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes del grupo BM2 (con la excepción de un único paciente), indicaría la posible menor afectación de dicha capacidad de respuesta anti-infecciosa en los pacientes de este grupo.

Los pacientes del grupo BM1 con enfermedad autoinmune podrían ser los candidatos para estudio de la función de un conjunto de moléculas, descritas recientemente, implicadas en el mecanismo del cambio de isotipo de los linfocitos B<sup>51</sup>. Nos referimos a las moléculas TACI, BAFFR y sus respectivos ligandos (BAFF y APRIL)<sup>49,50</sup>. En los trabajos que describieron los primeros pacientes con IDVC con mutación en el gen de alguna de estas moléculas, éstos presentaron disminución de los LB de memoria con cambio de isotipo (el fenotipo de LB compatible con el grupo BM1) y el fenotipo clínico de estos pacientes incluía manifestaciones autoinmunes<sup>49-52</sup>.

En los pacientes del grupo BM0 se ha hallado una diferencia importante, que es la presencia de otros familiares afectados de IDVC y/o DlgA. La herencia familiar entre pacientes con IDVC y/o DlgA es conocida, y varía entre 20%<sup>17</sup> y 25%<sup>20</sup>, pero según nuestro conocimiento, la asociación entre herencia familiar y cierto fenotipo inmunológico no ha sido observada.

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

Podemos concluir que al fenotipo inmunológico más deficiente (ausencia de LB de memoria) en nuestro estudio, le correspondió la clínica más grave. Nuestros resultados invitan a realizar estudios confirmatorios multicéntricos. Una vez confirmados los resultados, creemos que el tratamiento inmunosupresor/antiinflamatorio podría ser considerado en los pacientes del grupo BM0.

Además, dichos estudios darían paso a la investigación de las posibles causas de los defectos presentes en cada grupo de enfermos, dividiendo el síndrome de IDVC en entidades diferentes<sup>17,49,52,53,54,56</sup>, con todas las consecuencias que ello conllevaría (cambios en la estrategia terapéutica, pronóstico, diagnóstico prenatal, etc.).

## **5.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MBL**

Los resultados de los estudios<sup>68,78,79</sup> que asocian el genotipo con los niveles plasmáticos de MBL muestran un solapamiento de concentraciones entre los diferentes genotipos. La MBL se considera una proteína de fase aguda<sup>62</sup> y dicho solapamiento de las concentraciones entre los diferentes genotipos<sup>68,78,79</sup> podría deberse a que la población seleccionada para el estudio fuera heterogénea en cuanto a la historia de estado de infección/inflamación.

Los trabajos sobre la cinética de la MBL en respuesta a la inflamación son escasos<sup>114-116</sup>. Dean *et al*<sup>114</sup> describieron que la concentración plasmática de MBL durante una respuesta inflamatoria, varía individualmente y en función del genotipo. Observaron que a los 5-7 días del diagnóstico de la infección (en este caso septicemia), en los individuos con el genotipo A/A, la concentración de MBL aumentaba en el 33,3%, disminuía en el 34,6%, y se mantenía en los niveles iniciales en el 32,1% de los pacientes. En los individuos con el genotipo A/O y O/O la concentración de MBL aumentaba en el 28% de individuos, disminuía en el 8% y se mantenía en el 56% de los individuos. La concentración de MBL no cambió en los individuos MBL deficientes, definidos en este trabajo como individuos con los niveles de MBL funcional inferiores a 500ng/ml (determinado mediante ensayo que mide la MBL unida a manosa).

Otros datos sobre la cinética de MBL provienen de un estudio de Terai *et al*<sup>115</sup>. Éstos midieron la concentración de MBL en la sangre de recién nacidos, a término en los días 1, 3 y 5 de vida. Encontraron un pico máximo de concentración de MBL al día 5 y lo atribuyeron al estrés del parto, ya que éste activa mecanismos similares a los implicados en la inflamación. Podríamos pensar que la concentración plasmática de

la MBL alcanza su máximo alrededor del día 5 de la inflamación. Lo que no sabemos es cuanto tiempo tarda en volver a sus niveles basales. Los autores Neth et al<sup>116</sup> estudiaron las concentraciones plasmáticas de MBL en niños sometidos a quimioterapia. Encontraron que los individuos A/A casi duplicaron las concentraciones de MBL al séptimo día del episodio febril neutropénico y volvieron a los niveles iniciales al día 14.

Para conocer los valores basales de las concentraciones plasmáticas de MBL correspondientes a cada genotipo de la MBL, estudiamos esta relación (genotipo-fenotipo) en una población, donde la influencia de una posible situación de infección/inflamación hubiera sido minimizada, mediante la selección de los individuos. En este estudio se incluyeron recién nacidos cuyas madres no hubieran pasado una infección grave o moderada (según criterios definidos por Infectious Diseases Society of America<sup>90</sup>) en el último trimestre del embarazo. Además se incluyeron sólo los niños nacidos posteriormente a la semana 36 de gestación y con un peso superior a 2000g, para evitar la influencia de estos factores en la concentración de MBL<sup>62,117</sup>.

Postulamos que la determinación de las concentraciones de MBL en estas condiciones, permitiría clasificar los diferentes genotipos de MBL en grupos bien diferenciados, con un mínimo solapamiento de concentraciones entre sí. Los resultados del presente trabajo apoyan esta posibilidad y permiten establecer el modelo según el cual los genotipos O/O y LXA/O identifican a los productores de MBL con valores plasmáticos bajos, los genotipos LYA/O, HYA/O y LXA/D a los intermedios y el resto de los genotipos estudiados, a los valores intermedios –altos.

Se analizó la relación de la concentración plasmática de MBL con ciertas circunstancias individuales (tabaquismo, peso al nacer, semanas de gestación) y clínicas (estado postinfeccioso/postinflamatorio) de los RN incluidos en el estudio, no encontrando ningún tipo de correlación. Se podría decir que según el diseño experimental del presente estudio, los RN presentan niveles basales de la MBL correspondiente a cada genotipo.

Por otro lado, debido a esta selección de los RN, el presente estudio no se pudo utilizar para concluir sobre la prevalencia de los genotipos o déficit de MBL en la población general española.

Se ha descrito que en los individuos A/A, los haplotipos del promotor HY, LY y LX condicionan niveles plasmáticos de MBL altos, intermedios y bajos, respectivamente<sup>68,78</sup>. En nuestro trabajo hemos demostrado que LY en combinación con LY (individuos LYA/LYA) condiciona niveles plasmáticos de MBL comparables con el haplotipo HY. El haplotipo LY condiciona niveles de MBL proteica más bajos sólo en combinación con LX. Sin embargo, los niveles de MBL funcionales en LY/LX son todavía comparables con LY/LY y sólo los LX/LX dan niveles estadísticamente más bajos que todos los demás haplotipos en los individuos A/A.

Minchington *et al.*<sup>79</sup> midieron la MBL proteica y funcional en el plasma de 236 controles adultos, donantes de sangre. Analizando la población A/A encontraron los mismos resultados que nosotros, que sólo los LX/LX dan niveles estadísticamente más bajos que todos los demás haplotipos en los individuos A/A. También encontraron un gran solapamiento entre rangos de concentración, entre los individuos A/A y los A/O, donde la „O“ representa cualquier alelo estructural mutado B, C o D. Encontraron que algunos individuos con el genotipo A/D tienen valores comparables a los del genotipo A/A, tanto en el ensayo que mide la MBL proteica como en los dos ensayos funcionales (ensayo que mide la MBL unida a la manosa y también el ensayo que mide la C4b depositada).

Nosotros encontramos que los individuos A/D que tenían concentraciones comparables con los individuos A/A, tenían el haplotipo HYA (individuos HYA/D). Ha sido descrito que mientras que los alelos mutados B y C impiden la formación de los grandes oligómeros, el alelo mutado D afecta la estabilidad de los mismos<sup>118</sup>. Este hecho podría explicar las diferencias en concentraciones de la MBL encontradas entre los individuos A/D y el resto de los A/O.

En cuanto a los individuos A/O (donde la O es B o C) en nuestro trabajo, aquellos con el haplotipo HYA tenían niveles de MBL proteica y funcional significativamente más altos que los individuos con el haplotipo LYA ( $p < 0,00001$ ) y éstos a su vez, niveles significativamente más altos que los LXA, ( $p < 0,00001$ ). Estos resultados son similares a los encontrados por Madsen *et al.*<sup>78</sup> y difieren de los descritos por Minchinton *et al.*<sup>79</sup>, los que encontraron que sólo los individuos LXA/O (donde la O es B, C o D) tienen valores inferiores a los individuos LYA/O y HAY/O. Los tres trabajos (los dos descritos<sup>78, 79</sup> y el nuestro) concuerdan en que los valores más bajos están en los individuos LXA/O.

Nuestros resultados subrayan la importancia del análisis de los individuos A/D por separado así como de la detección de los polimorfismos del promotor en éstos, para poder distinguir a los individuos con capacidad de síntesis de MBL baja (individuos LXA/O) e intermedia (individuos LYA/O, HYA/O LXA/D), de los demás (individuos LYA/D y HYA/D), con producción de MBL en cantidades similares a los individuos A/A.

Los individuos HYA/HYA, HYA/LYA, HYA/LXA, LYA/LYA podrían formar un grupo de productores altos, pero analizando los niveles de MBL en conjunto y buscando el valor límite entre estos genotipos y los LXA/LXA, LXA/LYA; HYA/D, LYA/D encontramos un solapamiento de más del 25% y por eso decidimos fusionar ambos grupos en productores de MBL con valores intermedios-altos.

En el presente trabajo encontramos una buena correlación entre la MBL proteica y la MBL funcional, determinadas mediante los métodos descritos. Ambos métodos utilizan los AcMo anti-MBL humana (HYB 131-01) biotinilados de Staten Serum Institute de Copenhagen, Dinamarca, como anticuerpos de detección. Estos AcMo se unen a las moléculas de MBL vía el dominio de unión a carbohidrato que no está ocupado 1) por la unión a los AcMo inmovilizados en el pocillo de la placa de microtitulación en el caso del método para la MBL proteica o 2) por la unión a manosa en los pocillos de la placa de microtitulación en el caso del método para la MBL funcional. Sólo la MBL altamente oligomerizada tiene suficientes dominios de unión a los carbohidratos para poder unir a la vez estos dos reactivos. Ambos métodos, por lo tanto, detectan la MBL en forma de oligómeros grandes, dejando aparte la MBL con menos unidades de monómeros. Son los oligómeros grandes los que han demostrado ser capaces de activar el complemento<sup>119,120</sup>. Los autores que utilizaron estos dos ensayos junto con el ensayo que mide la C4b depositada, encontraron una buena correlación entre los tres métodos<sup>79,114</sup>.

Varios autores coinciden en que para determinar la capacidad del individuo de producir MBL, es necesario el estudio genotípico<sup>76,81,85</sup>. Dado que éste es un estudio costoso/laborioso, proponemos seguir nuestro modelo de selección de los individuos, para el estudio genotípico. Este modelo excluye de dicho estudio a los pacientes con niveles plasmáticos de MBL indetectables y aquellos con niveles altos. En el caso de los primeros, numerosos estudios y nuestros resultados demostraron que todos tienen el genotipo O/O y los segundos el genotipo MBL "suficiente" (genotipos A/A, HYA/D, LYA/D)<sup>68,78,79</sup>.

Nuestros resultados indican que los valores plasmáticos más bajos están condicionados por los genotipos O/O, LXA/B y LXA/C. Creemos que los valores correspondientes a los individuos con estos genotipos podrían ser utilizados como valor de corte para diferenciar los individuos MBL deficientes de los demás individuos.

### **5.3. ESTUDIO DE MBL EN PACIENTES CON IDVC Y DIgA**

La MBL actúa como un factor modulador del fenotipo clínico de diversas patologías, y su déficit puede dar lugar al desarrollo de complicaciones infecciosas<sup>81-85</sup> o autoinmunes<sup>73-75</sup>. El déficit de MBL favorece la aparición de complicaciones infecciosas, sobre todo en situaciones en las que el sistema inmunitario es inmaduro<sup>82</sup> o está afectado por causas primarias o secundarias (pacientes con IDP<sup>61,63</sup>, pacientes VIH positivos<sup>86</sup>, pacientes en tratamiento con quimioterapia<sup>121</sup>, pacientes transplantados<sup>122</sup>). Basándonos en estos hechos, postulamos que el déficit de MBL podría explicar la mayor gravedad de las infecciones o aparición de enfermedades autoinmunes en los pacientes con IDVC y DIgA.

Los estudios clínicos que demuestran la asociación del déficit de MBL con determinada patología, comparan la incidencia del déficit entre los afectados y los no afectados de dicha patología y con la población de control. Sin embargo, no existe consenso sobre los criterios diagnósticos del déficit de MBL<sup>67</sup>. Los valores que se utilizan para definir el déficit de MBL, de forma arbitraria, varían entre: indetectables, inferiores a 100, 160, 500 o incluso 1000ng/ml. Otros definen el déficit según la presencia de las variantes genóticas de la MBL<sup>67</sup>.

Comparamos los valores de la concentración de MBL entre los pacientes, agrupados según las diferentes manifestaciones clínicas (ver tablas 4.13.-4.15.) Ningún grupo de pacientes mostró valores de MBL estadísticamente diferentes de otro o del grupo control (datos no mostrados). Es decir, no encontramos ninguna patología cuya aparición fuera favorecida por la disminución de la MBL. Al contrario, se observó una tendencia a presentar valores más altos en los pacientes con patología más severa (en dichas tablas se puede observar que los pacientes con cierto tipo de patología presentan una mediana más alta que los demás grupos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas). La inflamación

crónica en estos pacientes, podría explicar dicho aumento<sup>76</sup>. Pero también, los valores altos de MBL podrían ser responsables de la perpetuación de la inflamación crónica en estos pacientes, por el efecto modulador de la inflamación que pueda tener la MBL, al intervenir en la liberación de citocinas proinflamatorias<sup>123</sup>.

Los pacientes con IDVC y DIgA se clasificaron, según el modelo establecido en el grupo de recién nacidos, en productores de MBL con niveles bajos, intermedios e intermedios-altos. Se comparó la frecuencia de las manifestaciones clínicas más relevantes (respiratorias, digestivas, autoinmunes, linfoproliferativas y alérgicas) entre los pacientes con IDVC y DIgA, agrupados según la producción de MBL. No se observó ninguna diferencia significativa en la frecuencia de las manifestaciones clínicas estudiadas, entre los diferentes grupos de pacientes con IDVC así agrupados.

Igual que en nuestro grupo de pacientes, Kakkanaiah *et al*<sup>71</sup>, encontraron que los pacientes adultos con infecciones de repetición no presentaron valores medios de la concentración de MBL superiores a los hallados en el grupo control. A diferencia de nosotros, ellos encontraron una mayor prevalencia de valores bajos-indetectables entre los pacientes comparada con los controles.

En la población caucasiana, la prevalencia del déficit de MBL, definido sobre la base de los valores indetectables de MBL o el genotipo de la MBL O/O, está estimada entre el 5 y 10%<sup>62,70,78</sup>. La prevalencia de valores indetectables-bajos de MBL entre los pacientes incluidos en nuestro estudio es comparable con estos valores, publicados para la población general. Así, entre los pacientes con IDVC fue del 9,7% (4/41) y entre los DIgA del 8,7% (4/46). Los 8 pacientes presentaron clínica muy variada: Tres de los 4 pacientes con IDVC con valores de MBL bajos (pacientes 4, 10, y 11 en la tabla 4.3) tenían EPC o síndrome de malabsorción y uno de los 4 pacientes con DIgA presentó también patología grave; Un de los 4 paciente con IDVC (nº32 en la tabla 4.3) y tres de los 4 pacientes con DIgA, con déficit de MBL concomitante, estaban prácticamente asintomáticos.

Según los resultados de nuestro estudio, la MBL no influyó en el fenotipo clínico de los pacientes. Dado el bajo número de déficits de MBL hallado entre ellos, no se puede concluir sobre la influencia, en general, del déficit de MBL en la variabilidad clínica de la IDVC y DIgA. Dadas las posibles aplicaciones terapéuticas de la MBL recombinante<sup>67,89</sup>, es muy importante llegar a definir el déficit de MBL, en cuanto a la

concentración plasmática y/o las variantes genóticas correspondiente. Dicha definición facilitaría la comparación entre los diferentes estudios poblacionales. Nuestra clasificación en productores bajos, intermedios e intermedios-altos podría ser una herramienta a considerar en dichos estudios clínicos.

Además, el estudio del déficit de MBL debería incluir la valoración de la función de la serín proteasa MASP-2, responsable de la formación de C3 convertasa durante la activación del complemento por la vía de las lectinas. Es posible, por tanto, que a pesar de los niveles de MBL normales, la vía de las lectinas esté perturbada por la función anómala de esta serín proteasa<sup>124,125</sup>.

La reciente publicación<sup>126</sup> de un estudio prospectivo de más de 9 mil individuos de la población general danesa señaló que el déficit de MBL aislado no confiere al individuo un mayor riesgo de padecer infecciones u otras enfermedades comunes. En este estudio confirman la relativamente alta prevalencia de los homocigotos O/O (5%) y heterocigotos A/O (37%) en la población general y concluyen que probablemente existen otros factores de la inmunidad innata que puedan sustituir la función de la MBL, p.ej. las ficolinas, que hacen que el déficit de MBL no cause las infecciones en estos individuos.

Las ficolinas<sup>127</sup> son otras proteínas plasmáticas capaces de reconocer a los carbohidratos en la superficie de múltiples patógenos. Activan el complemento por vía de las lectinas utilizando las mismas serín-proteasas descritas para la MBL (MASPs). En niños con infecciones respiratorias recurrente, se encontraron niveles disminuidos de L-ficolinas, comparados con el grupo control<sup>128</sup>.

Probablemente no es la MBL sola, la que determina la susceptibilidad del individuo a infecciones, sino el conjunto de varias moléculas, cuyas pequeñas variaciones genéticas forman la “huella inmunológica” de cada individuo. Lo identifican como único y determinan su capacidad de desarrollar una respuesta inmune efectiva, le predisponen a sufrir determinadas complicaciones de la enfermedad de base y su conocimiento permite desarrollar tratamientos a medida<sup>59</sup>.

## **6. CONCLUSIONES**

1. *La cuantificación de las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria podría ser un método útil para distinguir entre los diferentes fenotipos clínicos de los pacientes con IDVC.*
2. *Se encontró una asociación entre la alteración inmunofenotípica B (BM0, BM1, BM2) y la gravedad fenotípica clínica. Al fenotipo inmunológico más deficiente (ausencia de LB de memoria) le correspondió la presentación clínica más grave, observando un mayor número de casos con enfermedad pulmonar crónica, bronquiectasias con expectoración, síndrome de malabsorción y manifestaciones linfoproliferativas.*
3. *Se observó una mayor incidencia de casos familiares entre los pacientes del grupo BM0 y por tanto creemos conveniente establecer un protocolo de seguimiento para los familiares de los pacientes de dicho grupo.*
4. *Creemos que las diferencias en la presentación clínica de los pacientes estudiados son indicativas de distintos defectos moleculares, diferentes en cada uno de los grupos.*
5. *Creemos que nuestros resultados justifican la inclusión de la determinación de los LB de memoria en el estudio inmunológico rutinario de los pacientes con IDVC.*
6. *Mediante el estudio de las concentraciones plasmáticas y genotipo de la MBL, los individuos se pudieron clasificar en tres grupos, bien diferenciados, de productores de MBL: 1.- con niveles bajos (individuos O/O, LXA/B y LXA/C), 2.- con niveles intermedios (LYA/O, HYA/O y LXA/D) y 3.- con niveles intermedios-altos (el resto de los genotipos estudiados).*
7. *Los valores plasmáticos de MBL más bajos están condicionados por los genotipos O/O, LXA/B y LXA/C.*
8. *Creemos que los valores correspondientes a los individuos con estos genotipos (O/O, LXA/B y LXA/C) podrían ser utilizados como valor de corte para diferenciar a los individuos MBL deficientes de los demás individuos.*

9. *La prevalencia de valores bajos de MBL (déficit de MBL) entre los pacientes incluidos en nuestro estudio no es superior a la descrita para la población general caucasiana.*
10. *No se ha observado relación entre el fenotipo clínico y la concentración plasmática de MBL o su genotipo, en los pacientes con IDVC y DIgA estudiados.*
11. *El bajo número de pacientes con déficit de MBL impide valorar la influencia del mismo en la variabilidad clínica de los pacientes.*
12. *Nuestra clasificación de los individuos en productores bajos, intermedios e intermedios-altos podría ser una herramienta a considerar en estudios clínicos poblacionales.*

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Primary Immunodeficiency Diseases. Report of an IUIS Scientific Group. *Clin Exp Immunol* 1999; 118 (Suppl 1): 1-34.
2. Chapel H., Geha R., Rosen F. Primary immunodeficiency diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 9-15.
3. Bonilla F. A., Geha R. S. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2 Suppl): S 571- 81.
4. Lovering R. C., Sweatman A, Genet S. A., Middleton-Price H. R., Vetrie D., Vorechovsky I., Bentley D., Fontan G., Espanol T., Morgan G. Identification of deletions in the *btk* gene allows unambiguous assessment of carrier status in families with X-linked agammaglobulinaemia. *Hum Genet.* 1994;94(1):77-9.
5. Gaspar H., Ferrando M., Caragol I., Hernandez M., Bertran J. M., De Gracia J. Kinase mutant *Btk* results in atypical X-linked agammaglobulinaemia phenotype. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:346-350.
6. Lopez-Granados E., Cambronero R., Ferreira A., Fontan G., Garcia-Rodriguez M. C. Three novel mutations reflect the variety of defects causing phenotypically diverse X-linked hyper-IgM syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(1):123-31.
7. Haeney M., Intravenous immune globulin in primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994; 97 Suppl 1: 11- 5.
8. Friedrich W. Bone marrow transplantation in immunodeficiency diseases. *Ann Med* 1996; 28(2): 115- 9.
9. Matamoros N., Milá J., Pons J. Inmunodeficiencias primarias en España. Datos del registro español de inmunodeficiencias primarias. REDIP 1980-1999. *Med Clin (Barc)* 2000;114:96-100.
10. Hammarström L., Vorechovsky I., Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 225- 231.
11. Vorechovsky I., Cullen M., Carrington M., et al. Fine mapping of *IGAD1* in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *J Immunol* 2000; 164: 4408- 16.
12. Español T., Catala M., Hernandez M., Caragol I., Bertran J. M. Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 333-335.
13. Gual L., Martinez A., Fernandez-Arquero M., Garcia-Rodriguez M. C, Ferreira A., Fontan G., de la Concha E. G., Urcelay E. Major histocompatibility complex haplotypes in Spanish immunoglobulin A deficiency patients: a comparative fine mapping microsatellite study. *Tissue Antigens.* 2004; 64(6): 671-7.

14. Kralovicova J., Hammarström L., Plebani A., Webster A. D. B., Vořechovsky I., Fine-scale mapping at IGAD1 and genome- Wide genetic lincage analysis implicate HLA-DQ-DR as a major susceptibility locus in selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency, *J Immunol* 2003; 170: 2765-2775.
15. De La Concha E\_G, Fernandez-Arquero M., Martinez A., Vidal F., Vigil P., Conejero L., Garcia-Rodriguez M\_C., Fontan G. HLA class II homozygosity confers susceptibility to common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):516-20.
16. Schroeder H. W. Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency, *Clin Rew Allergy Immonol*, 2000; 19: 127-140.
17. Spickett G. P. Current perspectives on common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and Experimental Allergy* 2001; 31: 536-542.
18. Cunningham-Rundles C., Bodian C. Common variable immunodeficiency: Clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999; 92: 34-48.
19. De Gracia J., Morell F., Español T., Orriols R., Riba A., Guarner M. L., Rodrigo M. J. Inmunodeficiencia común variable: Estudio clínico de 16 casos. *Med Clín (Barc)* 1988; 91: 332-337.
20. Kainulainen L., Nikoskelainen J., Ruuskanen O. Diagnostic findings in 95 Finish patients with common variable immunodeficiency, *Clin Immunol* 2001; 21: 145-149.
21. Spicker G. P., Webster A. D. B., Farrant J. Cellular abnormalities in common variable immunodeficiency. En *Immunodeficiencies*. Ed. Rosen F. S, Seligmann M, Harwood Academic Publishers, Chur 1993; 111-126.
22. Hernández M., Defectos celulares en la inmunodeficiencia variable común". Tesis. Universidad de las Islas Baleares (1996).
23. De Gracia J., Vendrell M., Álvarez A., Pallisa E., Rodrigo M. J., De la Rosa D., Mata F., Andreu J., Morell F. Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency. *Int Immunoph* 2004 ; 6 :745-753.
24. Zullo A., Romiti A., Rinaldi V. et al., Gastric pathology in patients with common variable immunodeficiency. *Gut* 1999; 45: 77- 81.
25. Filipovich A. H., Mathur A., Kamat D., Kersey J. H., Shapiro R. S., Lymphoproliferative disorders and other tumours complicating immunodeficiencies. *Immunodeficiency* 1994; 5: 91- 112.

26. Weston J., Balfour B., Tsohas W., English N., Farrant J., Webster A. D. B., Splenic lesions in hypogammaglobulinemia. *Adv Exp Biol Med* 1993; 329: 437-41.
27. Cunningham-Rundles C., Lieberman P., Hellman G., Chaganti R. S. K. Non-Hodgkin lymphoma in common variable immunodeficiency. *Am J Hematol* 1991; 37: 69-74.
28. Español T., De Gracia J., Caragol I., Sauleda S., Garcia X., Bertran J. M. Malignancies in primary immunodeficient patients. *Immunodeficiency* 1993; 4: 197-99.
29. Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2001; 21: 303-309.
30. Español T., Hernández M., Caragol I., Ferrando M., Bertrán J. M. Diagnóstico de la inmunodeficiencia común variable en niños. *Inmunología* 1998; 17: 79- 83.
31. Chapel H. Consensus on diagnosis and management of primary antibody deficiencies. *BMJ* 1994; 308: 581- 585.
32. Rodrigo M. J, Miravittles M., Cruz M. J, De Gracia J, Vendrell M., Pascual C., Morell F., Characterization of specific immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population: proposal for response criteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4(2): 168-172.
33. Rodrigo M. J, Vendrell M., Cruz M. J, Miravittles M., Morell F., De Gracia J. Utility of the antibody response to a conjugated haemophilus influenzae type B vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. *AJRCCM* 2000; 162: 1462-1465.
34. Spickett G. P., Farrant J., North M. E., Zhang J., Morgan L., Webster A. D. B. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol Today* 1998; 18: 315-328.
35. Wesley S. A., Prasad M. L., Mullighan C. D., Chapel A. S., Benson E. M. Assessment of male CVID patients for mutations in the Btk gene: how many have been misdiagnosed?. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 465-469.
36. Nelson D.L., Terhorst C. X-linked lymphoproliferative syndrome. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 291- 295.
37. Jimenez A., Alvarez-Doorno R., Garcia Rodriguez M. C, Ferreira A, Lopez-Trascasa M., Fontan G. Autoantibodies in patients with IgA and IgG2 deficiencies. *APMIS* 1991; 99(4): 327-332.

38. De Gracia J., Miravittles M., Rodrigo M. J., Vendrell M., Codina R., Morell F. Estudio de las subclases de la IgG en pacientes con déficit de IgA sintomáticos. *Med Clin (Barc)* 1995; 104:728-731.
39. French, M. A. H., Denis, K. A., Dawkins, R., Peter J. B., Severity of infections in IgA deficiency: correlation with decreased serum antibodies to pneumococcal polysaccharides and decreased serum IgG2 and/or IgG4, *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 47-53.
40. De Gracia J., Vendrell M., Guarnier M. L, Vidal R., Miravittles M., Mayordomo C., Morell F. Utilización de gammaglobulina humana en el tratamiento de la inmunodeficiencia común variable. *Med Clin (Barc)*; 1995: 104:201-206.
41. Farrant J., Spickett G., Matamoros N., Copas D., Hernandez M., North M., Chapel H., Webster A. D. Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency* 1994; 5(2): 159-169.
42. Ferrer J. M., Iglesias J., Hernandez M., Matamoros N. Alterations in interleukin secretion (IL-2 and IL-4) by CD4 and CD4 CD45RO cells from common variable immunodeficiency (CVI) patients. *Clin Exp Immunol* 1995; 102(2): 286-289.
43. Bryant A., Calver N. C., Toubi E., Webster A. D. B., Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell section of IgM and IgG in response to anti-IgM and Interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56: 239- 248.
44. Nonoyama, S., Farrington, M., Ishida, H., Howard, M., Ochs, H.D., Activated B cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin, *J Clin Invest* 1993; 92: 1282-1287.
45. Briere F., Bridon J. M., Chevet D., Souillet G., Bienvenu F., Guret C., Martinez-Valdez H., Banchereau J. Interleukin 10 Induces B Lymphocytes from IgA-deficient Patients to Secrete IgA. *J Clin Invest* 1994: 94:97-104.
46. Grimbacher B., Hutloff A., Schlesier M., et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency, *Nature Immunology* 2003; 4: 261-268.
47. Salzer U., Maul-Pavicic A., Cunningham-Rundles C., Urschel S., Belohradsky B. H., Litzman J., Holm A., Franco J. L., Plebani A., Hammarstrom L., Skrabl A., Schwinger W., Grimbacher B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2004; 113(3): 234-240.
48. Hutloff, A., Dittrich, A., Beier, K., et al., ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28, *Nature* 1999; 397:263-266.

49. Salzer U., Chapel H. M., Webster A. D., Pan-Hammarstrom Q., Schmitt-Graeff A., Schlesier M., Peter H. H., Rockstroh J. K., Schneider P., Schaffer A. A., Hammarstrom L., Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005; 37(8): 820-828.
50. Salzer U., Gutenberger S., Bossaller L., Schlesier M., Grimbacher B., Eibel H., Peter H. H. Finally found: Human BAFF-R deficiency caused CVID. Poster communication number B.72 at XIth Meeting for the European Society for Immunodeficiencies, Versailles, France, 2004.
51. Castigli E., Wilson S. A., Scott S., Dedeoglu F., Xu S., Lam K. P., Bram R. J., Jabara H., Geha R. S. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 2005; 201(1): 35-39.
52. Castigli E., Wilson S. A., Garibyan L., Rachid R., Bonilla F., Schneider L., Geha R. S. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 2005; 37(8): 829-834.
53. Warnatz K., Denz A., Dräger R. et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify heterogeneous disease. *Blood* 2002; 99:1544-1551.
54. 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(5): 385- 400.
55. Tangye S. G., Liu Y. J., Aversa G., Phillips J. H., de Vries J. E. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998; 188(9): 1691-1703.
56. Groth C., Dräger R., Warnatz K. *et al.* Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 133-139.
57. Brouet J. C., Chedeville A., Ferman J. P., Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 2000; 30(9): 2516- 2520.
58. Agematsu K., Futatani T., Hokibara S., Kobayashi N., Takamoto M., Tsukada S., Suzuki H., Koyasu S., Miyawaki T., Sugane K., Komiyama A., Ochs H. D. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2002; 103(1): 34-42.

59. Winkelstein J. A, Childs B., Why do some individuals have more infections than others?, JAMA 2001; 285: 1348-1349.
60. Uthaisangsook S., Day N. K., Bahna S. L., *et al.* Innate immunity and its role against infections. Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 88: 253-265.
61. Foster C. B., Lehrnbecher T., Mol F., Steinberg S. M., Venzon D. J., *et al.* Host defence molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. J Clin Invest 1998; 102(12): 2146-2155.
62. Turner M. W., The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. Mol Immunol 2001; 38: 133-148.
63. Mullighan C. G., Marshall S. E., Welsh K. I. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. Scand J Immunol 2000; 51(2): 111-122.
64. Maurer D., Holter W., Majdic O., Fischer G.F., Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. Eur J Immunol 1990; 20(12): 2679- 2684.
65. Agematsu K., Nagumo H., Yang F. C., Nakazawa T., Fukushima K., Ito S., Sugita K., Mori T., Kobata T., Morimoto C., Komiyama A. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+B cells and helper T cells in immunoglobulin production. Eur J Immunol 1997; 27(8): 2073- 2079.
66. Klein U., Rajewsky K., Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med 1998; 188(9): 1679-1689.
67. Gadjeva M., Takahashi K., Thiel S. Mannan-binding lectin - a soluble pattern recognition molecule. Mol Immunol 2004; 41(2-3): 113-121.
68. Steffensen R., Thiel S., Varming K., Jersild C., Jensenius J. C., Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. J Immunol Methods 2000; 241: 33-42.
69. Crosdale D. J., Ollier W. E. R., Thomson W., Dyer P. A., Jensenius J. *et al.*, Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. Europ J Immunogen 2000; 27: 111-117.
70. Garcia-Laorden M.I., Manzanedo A., Figuerola A., Sanchez-Garcia F., Rodriguez-Gallego C. Mannose-binding lectin polymorphisms in a Canary Islands (Spain) population. Genes Immun 2001; 2(5): 292-294.

71. Kakkanaiah V. N., Shen G. Q., Ojo-Amaize E. A., Peter J. B. Association of low concentrations of serum mannose-binding protein with recurrent infections in adults. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5(3): 319-321.
72. Turner M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* 1996; 17: 532-540.
73. Boniotto M., Braida L., Spanò A., Pirulli D., Baldas V. et al. Variant mannose-binding lectin alleles are associated with celiac disease. *Immunogenetics* 2002; 54: 596-598.
74. Villareal J., Crosdale D., Ollier W., Hajeer A., Thomson W., Ordi J., Balada E., Villardell M., Thel L.S., Poulton K. Mannose binding lectin and FcγRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology* 2001; 40: 1009-1012.
75. Megia A., Gallart L., Fernandez-Real J. M., Vendrell J., Simon I., Gutierrez C., Richart C. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10): 5081-5087.
76. Aittoniemi J., Rintala E., Miettinen A., Soppi E. Serum mannan-binding lectin (MBL) in patients with infection: clinical and laboratory correlates. *APMIS* 1997;105(8): 617-622.
77. Aittoniemi J., Miettinen A., Laippala P., Isolauri E., Viikari J., Ruuska T., Soppi E. Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr* 1996; 85(8): 906-909.
78. Madsen H. O., Garred P., Thiel S., Kurtzhals J. A., Lamm L.U., Ryder L.P., Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995;155(6): 3013-3020.
79. Minchinton R. M., Dean M. M., Clark T. R., Heatley S., Mullighan C. G. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002; 56: 630-641.
80. Dumestre-Perard C., Ponard D., Arlaud G. J., Monnier N., Sim R. B., Colomb M. G. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. *Mol Immunol.* 2002; 39(7-8): 465-473.
81. Summerfield J. A., Sumiya M., Levin M., Turner M. W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997; 314: 1229-1231.
82. Koch A., Melbye M., Sorensen P., Homoe P. et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285: 1316-1321.

83. Summerfield J. A., Ryder S., Sumiya M., Thursz M., Gorchein A. et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345: 886—889.
84. Garred P., Pressler T., Madsen H. O., Frederiksen B., Svejgaard A. et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104(4): 431-437.
85. Gabolde M., Hubert D., Guilloud-Bataille M., Lenaerts C., Feingold J. et al. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Genet* 2001; 38(5): 310-311.
86. Garred P., Madsen H. O., Balslev U., Hoffman B. O., Pedersen C. et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997; 349: 236-240.
87. Wang Z. Y., Morinobu A., Kanagawa S., Kumagai S. Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(5): 483-486.
88. Jacobsen S., Madsen H. O., Klarlund M., Jensen T., Skjodt H. et al. The influence of mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. TIRA Group. *J Rheumatol* 2001; 28(5): 935-942.
89. Summerfield J. A. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 770-773.
90. Beam T. R. jr, Gilbert D. N., Kunin C. M. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. *Clin Infect Dis* 1992; 15(Suppl1): S5-32.
91. Roca J., Burgos F. Sunyer J., Saez M., Chinn S., Anto J.M., Quanjer P.H., Nowak D., Burney P. Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J.* 1998;11(6): 1354-1362.
92. Mardiney M. 3rd, Brown M.R., Fleisher T.A. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry* 1996; 15; 26(4): 305-310. Cox R.A. *Methods in enzymology.* (Grossmann, L. And Moldave, E., Eds ) 1968; Vol 12, Part B: 120 - 129, Academic Press, Orlando, FL.
93. Rodrigo M.J., Codina R., de Gracia J., Morell F., Pascual C. Normal values of the immunoglobulin G subclasses in an adult population. Importance in a study of their deficiency. *Med Clin (Barc)* 1992; 98(5): 166-17.
94. Cox R.A. *Methods in enzymology.* (Grossmann, L. And Moldave, E., Eds ) 1968; Vol 12, Part B: 120 - 129, Academic Press, Orlando, FL.

95. Sullivan K.E., Wooten C., Goldman D., Petri M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996; 39(12): 2046-2051.
96. Taubenheim N., von Hornung M., Durandy A., Warnatz K., Corcoran L., Peter H.H., Eibel H. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol.* 2005; 175(8): 5498-5503.
97. Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., Komiyama A. CD27: A amemory B-cell marker. *Immunol Today* 2000; 21: 204- 206.
98. Agematsu K., Nagumo H., Oguchi Y., Nakazawa T., Fukushima K. et al. Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood* 1998; 91(1): 173- 180.
99. Jacquot S., Kobata T., Iwata S., Morimoto C., Schlossman S.F. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol* 1997; 159(6): 2652-2657.
100. Eisenstein E.M, Chua K., Strober W. B Cell differentiation defects in common variable immunodeficiency are ameliorated after stimulation with anti-CD40 antibody and IL-10. *J Immunol* 1994; 152: 5957- 5968.
101. Farrington M., Grosmaire L.S., Nonoyama S., Hollenbaugh S.H., Ledbetter J.A., et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of pacientes with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1099-1103.
102. Rojo J.M., Portolés P., Yagi J., Dianzani U. H4/ICOS: a costimulatory protein in the right place at the right time? *Inmunología* 2001, 20: 196-206.
103. Korthauer U., Graf D., Mages H.W., Briere F., Padayachee M. et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412) :539- 541.
104. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L. et al. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(17): 9302- 9307.
105. Han S., Hathcock K., Zheng B., Kepler T.B., Hodes R., Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol.* 1995 Jul 15;155(2):556-67.
106. Ansel K.M., Ngo V.N., Hyman P.L., Luther S.A., Forster R. et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000; 406(6793): 309- 314.

107. Kainulainen L., Varpula M., Liippo K., Svedstrom E., Nikoskelainen J., Ruuskanen O. Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(5): 1031-1036.
108. Buckley R.H. Pulmonary complications of primary immunodeficiencies. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5 Suppl A: S225- 33.
109. Barnes P.J. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med* 1995; 332(13): 868- 875.
110. Llewellyn-Jones C.G., Johnson M.M., Mitchell J.L., Pye A., Okafor V.C., Hill S.L., Stockley R.A. In vivo study of indomethacin in bronchiectasis: effect on neutrophil function and lung secretion. *Eur Respir J* 1995; 8(9): 1479- 1487.
111. Emmi L., Chiarini F. The role of intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune and inflammatory disorders. *Neurol Sci* 2002; 23 (Suppl 1): S 1- 8.
112. Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. *Blood* 2002; 15; 99(8): 2694- 702.
113. Schroeder H.W. Jr. Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Rev Allergy Immunol* 2000; 19(2): 127-140.
114. Dean M. M., Minchinton R. M., Heatley S., Eisen D.\_P. Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. *J Clin Immunol.* 2005; 25(4): 346-352.
115. Terai I , Kobayashi K. Perinatal changes in serum mannose-binding protein (MBP) levels. *Immunol Lett.* 1993; 38(3):185-187.
116. Neth O., Hann I., Turner M. W., Klein N. J. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet.* 2001 Aug 25;358(9282):614-618.
117. Lau YL, Chan S\_Y., Turner M\_W., Fong J., Karlberg J. Mannose-binding protein in preterm infants: developmental profile and clinical significance. *Clin Exp Immunol.* 1995;102(3): 649-654.
118. Madsen H. O., Garred P., Kurtzhals J. A., Lamm L. U., Ryder L. P., Thiel S., Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics.* 1994; 40(1):.37-44.
119. Lipscombe R. J., Sumiya M., Summerfield J. A., Turner M. W. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology.* 1995; 85(4): 660-667.
120. Wallis R., Drickamer K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274(6): 3580-3589.

121. Peterslund N. A , Koch C , Jensenius J. C., Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet*. 2001; 358(9282): 637-638.
122. Neth O. W., Bajaj-Elliott M., Turner M. W., Klein N. J. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. *Br J Haematol*. 2005; 129(6): 713-722.
123. Turner M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*. 2003; 40(7): 423-429.
124. Sorensen R., Thiel S., Jensenius J.C. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol*. 2005 Sep 28;:1-21.
125. Cedzynski M., Szemraj J., Swierzko A.S., Bak-Romaniszyn L., Banasik M., Zeman K., Kilpatrick D.C. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin Exp Immunol*. 2004; 136(2): 304-311.
126. Dahl M., Tybjaerg-Hansen A., Schnohr P., Nordestgaard B.G. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. *J Exp Med*. 2004; 199(10): 1391-1399.
127. Holmskov U., Thiel S., Jensenius J.C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 547-578.
128. Atkinson A.P., Cedzynski M., Szemraj J., St Swierzko A., Bak-Romaniszyn L., Banasik M., Zeman K., Matsushita M., Turner M.L., Kilpatrick D.C. L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol*. 2004; 138(3): 517-520.

**ANEXOS**

Anexo nº 1



Number and percentage of PID registered in Spain (January 1980- August 2002)

	Patients	Percentage
Antibody deficiency	1626	69
Tcell and combined deficiencies	292	12.4
Phagocyte disorders	107	4.5
Complement deficiencies	279	11.8
Other primary deficiencies	53	2.2
<b>Total</b>	<b>2357</b>	

Total number and percentage of PIDs registered in Spain (January 1980 – August 2002)

PID	n
1. Agammaglobulinemia	93
2. Common variable immunodeficiency	449
3. Hiper IgM syndrome	36
4. IgA deficiency	868
5. IgG subclass deficiency	95
6. IgA deficiency associated with IgG subclass deficiency	37
7. Antibody deficiency with normal Igs	14
8. Transient hypogammaglobulinemia of infancy	16
9. DiGeorge anomaly	61
10. Severe combined immunodeficiency	89
11. ADA deficiency	7
12. PNP deficiency	1
13. X - linked lymphoproliferative syndrome	8
14. HLA deficiency	9
15. Reticular dysgenesis	5
16. Primary CD4 deficiency	8
17. Chronic granulomatous disease	66
18. Wiskott Aldrich syndrome	31
19. Ataxia telangiectasia	52
20. Short limbed dwarfism	1
21. Congenital asplenia	4
22. Primary neutropenia	24
23. Chediak - Higashi syndrome	4
24. Leukocyte adhesion defect (LAD I)	5
25. Chronic mucocutaneous candidiasis	27
26. Neutrophil G6PD deficiency<	1
27. Hyper IgE syndrome	30
28. Intestinal lymphangiectasia	2
29. Omenn syndrome	9
30. Anhidrotic ectodermic dysplasia	1
31. Complement deficiencies	279
32. Unclassified	12

## Anexo nº 2



European Society for Immunodeficiencies

› Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies

[www.esid.org](http://www.esid.org)

### Common Variable Immunodeficiency (CVI)

#### Probable

Male or female patient who has a marked decrease (at least 2 SD below the mean for age) in two out of three of the major isotypes (IgM, IgG and IgA) and fulfills all of the following criteria:

- 1) Onset of immunodeficiency at greater than 2 years of age
- 2) Absent isohemagglutinins and/or poor response to vaccines
- 3) Defined causes of hypogammaglobulinemia have been excluded ([see Table](#))

#### Possible

Male or female patient who has a marked decrease (at least 2 SD below the mean for age) in one of the major isotypes (IgM, IgG and IgA) and fulfills all of the following criteria:

- 1) Onset of immunodeficiency at greater than 2 years of age
- 2) Absent isohemagglutinins and/or poor response to vaccines
- 3) Defined causes of hypogammaglobulinemia have been excluded ([see Table](#))

## Anexo nº 3



European Society for Immunodeficiencies

› Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies

[www.esid.org](http://www.esid.org)

### **Table. Differential Diagnosis of Hypogammaglobulinemia**

#### **Drug Induced**

Antimalarial agents  
Captopril  
Carbamazepine  
Glucocorticoids  
Fenclofenac  
Gold salts  
Penicillamine  
Phenytoin  
Sulfasalazine

#### **Genetic Disorders**

Ataxia Telangiectasia  
Autosomal forms of SCID  
Hyper IgM Immunodeficiency  
Transcobalamin II deficiency and hypogammaglobulinemia  
X-linked agammaglobulinemia  
X-linked lymphoproliferative disorder (EBV associated)  
X-linked SCID  
Some metabolic disorders  
Chromosomal Anomalies  
Chromosome 18q- Syndrome  
Monosomy 22  
Trisomy 8  
Trisomy 21

#### **Infectious Diseases**

HIV  
Congenital Rubella  
Congenital infection with CMV  
Congenital infection with Toxoplasma gondii  
Epstein-Barr Virus

#### **Malignancy**

Chronic Lymphocytic Leukemia  
Immunodeficiency with Thymoma  
Non Hodgkin's lymphoma  
B cell malignancy

#### **Systemic Disorders**

Immunodeficiency caused by hypercatabolism of immunoglobulin  
Immunodeficiency caused by excessive loss of immunoglobulins (nephrosis, severe burns, lymphangiectasia, severe diarrhea)

## Anexo nº 4



European Society for Immunodeficiencies

› Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies

[www.esid.org](http://www.esid.org)

### **IgA Deficiency**

#### **Definitive**

Male or female patient greater than 4 years of age who has a serum IgA of less than 7 mg/dl (0.07 g/L) but normal serum IgG and IgM, in whom other causes of hypogammaglobulinemia have been excluded ([see Table](#)). These patients have a normal IgG antibody response to vaccination.

#### **Probable**

Male or female patient greater than 4 years of age who has a serum IgA at least 2 SD below normal for age but normal serum IgG and IgM, in whom other causes of hypogammaglobulinemia have been excluded ([see Table](#)). These patients have a normal IgG antibody response to vaccination.

## Imágenes de las poblaciones linfocitarias identificadas mediante citometría de flujo.

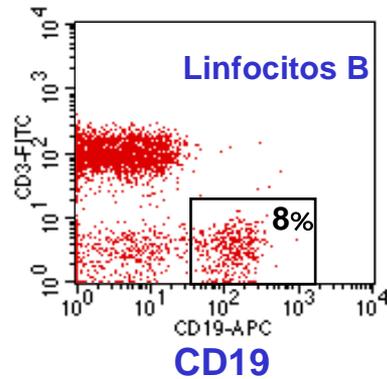
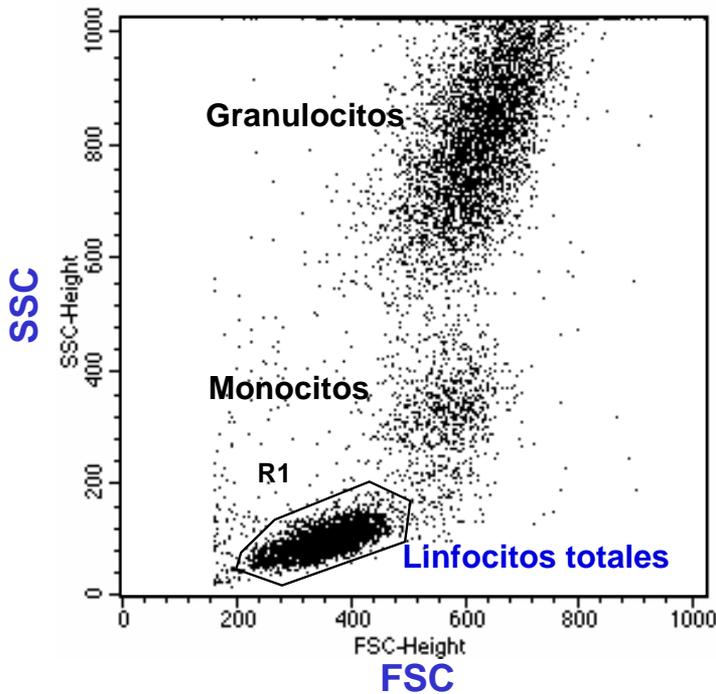
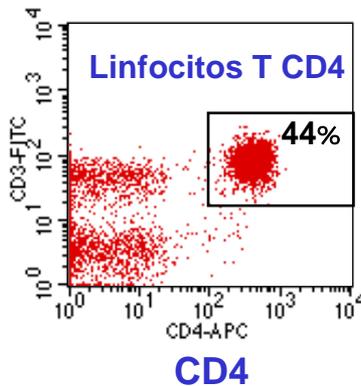


Imagen de la distribución de leucocitos de sangre periférica según tamaño (FSC) y granularidad (SSC) creada en el citómetro de flujo. Está seleccionada la región R1 con los linfocitos totales para posteriores análisis de las subpoblaciones.

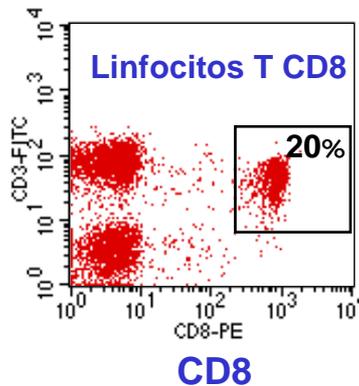
**Linfocitos B:** células CD19+ CD3-.

El número indica el porcentaje de los LB del total de los linfocitos seleccionados en la región R1.



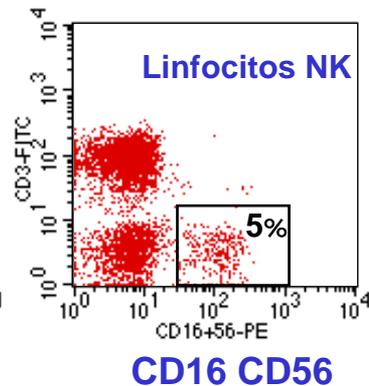
**Linfocitos T CD4:** células CD3+ CD4+.

El número indica el porcentaje de los Linfocitos T CD4 del total de los linfocitos seleccionados en la región R1.



**Linfocitos T CD8:** células CD3+ CD8+.

El número indica el porcentaje de los Linfocitos T CD8 del total de los linfocitos seleccionados en la región R1.



**Linfocitos NK:** células CD3- CD16+CD56+.

El número indica el porcentaje de los Linfocitos NK del total de los linfocitos seleccionados en la región R1.