

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DEFECTOS FUNCIONALES INTRÍNSECOS VÍA CD3
EN LINFOCITOS T TRANSFORMADOS CON
“herpesvirus saimiri” DE UN SUBGRUPO DE
PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN
VARIABLE (CVID)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Antonio García Cabanillas

Bajo la dirección del doctor

José R. Reguero González-Barros

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1691-1

Agradecimientos

Agradecimientos

MUCHAS GRACIAS

Resumen

DEFECTOS FUNCIONALES INTRINSICOS VIA CD3 EN LINFOCITOS T TRANSFORMADOS CON *HERPESVIRUS SAIMIRI* DE UN SUBGRUPO DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (CVID)

AUTOR: JUAN ANTONIO GARCIA CABANILLAS

DIRECTOR: JOSE R. REGUEIRO GONZALEZ-BARROS

La Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) es un síndrome muy heterogéneo caracterizado por una hipogammaglobulinemia de etiología desconocida. Aunque el defecto primario permanece desconocido, varios trabajos previos describen disfunciones en los linfocitos T de sangre periférica en una importante proporción de pacientes con CVID, que pueden afectar a la colaboración entre células T y B. Con la intención de investigar si tales defectos putativos son intrínsecos a las células T o por el contrario, secundarios a diferencias cuantitativas en la distribución de subpoblaciones T o a otros desórdenes descritos, hemos utilizado el *Herpesvirus saimiri* (HVS) para la transformación de linfocitos T CVID CD4⁺ y CD8⁺ T y para la posterior evaluación funcional, mediante citometría de flujo, de su capacidad para inducir moléculas de superficie (CD154, CD69) o factores solubles (IL-2, TNF- α , IFN- γ) implicados en la colaboración con las células B. Inesperadamente, los resultados mostraron que la exposición de 40 diferentes muestras de sangre de pacientes con CVID al HVS dio lugar a la obtención de líneas transformadas de linfocitos T CD4⁺ con una frecuencia significativamente mayor que la obtenida con la exposición de 40 muestras de sangre de donantes sanos, pareados en sexo y edad (27% vs. 3%, $p = 0.00002$). Esto sugiere la existencia de una señal específica en los CVID que afecta a la eficacia de transformación de la subpoblación CD4⁺. El análisis funcional de 10 líneas CD4⁺ y 15 líneas CD8⁺ transformadas puras de linfocitos T de pacientes CVID no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa comparado con sus controles. Sin embargo, la mitad de las líneas de células CD4⁺ transformadas mostró una inducción de la molécula de superficie CD154 (pero no de CD69) (valor medio de 46.8%) por debajo de la inducción más baja conseguida en los controles tras estimulación con anti-CD3 (valor medio de 73.6%, $p = 0.004$). Exactamente las mismas 5 líneas mostraron, además, una significativa reducción en la inducción del factor soluble IL-2 ($p = 0.008$), pero no de otras citocinas como TNF- α o IFN- γ . Ninguna de estas diferencias fue observada en el resto de líneas CD4⁺ ni en ninguna de las líneas CD8⁺ transformadas analizadas.

Por lo tanto, un subgrupo de pacientes CVID muestran una incapacidad selectiva e intrínseca de las células T CD4⁺ para la inducción tanto de moléculas de superficie (CD154) como factores solubles (IL-2) directamente implicados en la cooperación con los linfocitos B, lo que puede estar directamente afectando a la capacidad de producción de inmunoglobulinas por parte de estas últimas. Los linfocitos T transformados pueden ayudar para establecer los mecanismos bioquímicos responsables de los defectos descritos.

Este trabajo ha sido realizado con financiación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 96/0860), utilizando instalaciones del Centro de Técnicas Inmunológicas y del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Abreviatur
as

ABREVIATURAS MAS COMUNES USADAS EN EL TEXTO

Ab	Antibiótico
ALX	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X
AT	Ataxia-telangiectasia
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
BCR	Receptor para antígeno de la célula B
Ca²⁺	Calcio
CD	Grupo de diferenciación
cDNA	ADN complementario
ConA	Concanavalina A
CVID	Inmunodeficiencia Común Variable
DAG	Diacilglicerol
DNA-PK	Proteína quinasa dependiente de ADN
DP	Doble positivo
EBV	Virus de Epstein-Barr
EDTA	Acido etilén-diamino-tetraacético
FCS	Suero de ternera fetal
FITC	Fluoreceín-isotiocianato
Glu	Glutamina
HIGM	Hiper IgM ligada al cromosoma X
HLA	Antígenos humanos de histocompatibilidad
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
IFN_γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL2R	Receptor de IL2
Ion	Ionomicina
IP3	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IRR	Indice de respuesta relativa
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
MAP(K)	Proteínquinasa activada por mitógenos
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
OMK	Células de riñón de mono aullador
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Fosfatidilinositol
PIP₂	Fosfatidil 4,5 bisfosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLC_{γ1}	Fosfolipasa C _{γ1}
PMA	Acetato de forbol mirístico
PWM	Mitógeno Pokeweed
rIL2	Interleucina 2 recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
TCR (CD3)	Receptor para antígeno de la célula T
TNF_α	Factor α de necrosis tumoral

Indice completo

Índice completo

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
ABREVIATURAS	III
INDICE COMPLETO	IV
INTRODUCCIÓN	1
1. LA SÍNTESIS DE INMUNOGLOBULINAS	2
1.1 FISIOLÓGIA	2
1.1.1 Activación de células B.....	2
1.1.2 Activación de células T.....	7
1.2. PATOLOGÍA	8
1.2.1 Inmunodeficiencias primarias: conocidas y desconocidas.....	8
1.2.2 Inmunodeficiencias secundarias	16
2 LA INMUNODEFICIENCIA COMUN VARIABLE	17
2.1 CARACTERÍSTICAS	17
2.2 ETIOPATOGENIA	18
2.2.1 Factores genéticos	19
2.2.2 Factores exógenos o adquiridos	24
2.3 CLÍNICA	24
2.3.1 Diagnóstico y diagnóstico diferencial	25
2.3.2 Tratamiento	26
2.4 LABORATORIO	26
2.4.1 Linfocitos B.....	26
2.4.2 Linfocitos T	28

3 HERPESVIRUS SAIMIRI (HVS)	30
3.1 HVS como modelo de estudio de inmunodeficiencias del linaje T	30
3.2 Activación del linfocito T "in vitro".....	32
3.3 Preguntas funcionales que se pueden hacer.....	33
OBJETIVOS	34-35
MATERIALES Y METODOS	36
1 Enfermos y controles	37
1.1 Clínica.....	38
1.2 Inmunología.....	38
2 Transformación de linfocitos T con HVS	41
2.1 Obtención de sobrenadante infeccioso de HVS	41
2.2 Infección de linfocitos aislados de sangre periférica (PBL) con sobrenadante HVS	41
3 Caracterización fenotípica	42
3.1 Fenotipo básico: Citometría	42
3.2 Tinciones extracelulares.....	43
3.3 Tinciones intracelulares.....	43
4 Análisis funcionales	44
4.1 Inducción de proteínas de activación.....	44
4.2 Inducción de citocinas	44
RESULTADOS	46
Obtención y caracterización fenotípica de células T..... de pacientes con CVID transformadas con HVS	47
Inducción de moléculas de superficie en líneas HVS CD4 ⁺	49
Inducción de moléculas de superficie en líneas HVS CD8 ⁺	54
Inducción de citocinas intracelulares en líneas HVS CD4 ⁺	58
Inducción de citocinas intracelulares en líneas HVS CD8 ⁺	65

DISCUSIÓN	69
¿Por qué transformar células T de pacientes con CVID?.....	70
Inmortalización de linfocitos T de CVID con HVS: el modelo vale.....	71
¿Ventaja selectiva de la subpoblación CD4 ⁺ ?	73
Un subgrupo de pacientes presentan defectos de inducción en CD154.....	75
No existen defectos intrínsecos en las células HVS CD8 ⁺	77
CONCLUSIONES	78-79
PERSPECTIVAS	80-82
BIBLIOGRAFÍA	83-98
ANEXOS	99

Publicaciones

García Cabanillas JA, y colaboradores. Inmortalización con *Herpesvirus saimiri* de linfocitos T de pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable. *Inmunología* 1998; 17: 93-100.

García Cabanillas JA, Pacheco A y Regueiro JR. Fisiopatogenia y bases moleculares de las Inmunodeficiencias Primarias. *Sangre* 1999; 44: 107-122

Cabanillas JA, y colaboradores. Intrinsic quantitative CD3 mediated functional defects in *Herpesvirus saimiri* transformed T lymphocytes from a subset of CVID patients. Enviado

Curriculum Vitae

Introducci ón

1

La síntesis de inmunoglobulinas

1.1 Fisiología

1.1.1 Activación del linfocito B

La respuesta inmune humoral, mediada por células B y sus productos (los anticuerpos), tiene como principales misiones la eliminación de parásitos extracelulares y la prevención de la expansión sistémica de las infecciones intracelulares. Estos trabajos son llevados a cabo de varias maneras diferentes (*Figura. 1*). Una de ellas implica la **neutralización** del patógeno –inhibición de sus efectos tóxicos o capacidad infectiva– por unión directa del anticuerpo a su superficie. Este mecanismo es eficaz frente a virus o bacterias intracelulares que necesitan interacciones con moléculas receptoras de la superficie de la célula blanco para internalizarse y poder expandirse. En otras, los patógenos extracelulares, o los intracelulares que no se ocultan bien, son combatidos por las moléculas de anticuerpo favoreciendo su detección por células especializadas en su destrucción (fagocitos, células citolíticas). Estas células emplean bien los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, o bien los receptores para las proteínas del complemento que las Igs activan por la vía clásica. El proceso de «preparación para la fagocitosis» se conoce como **opsonización**. Pero para poder desarrollar estas funciones es necesario que los linfocitos B vírgenes o de memoria que se encuentran en reposo sean activados por el antígeno. A estos linfocitos B recientemente activados se les denomina **linfocitos B efectores**, y son los responsables directos de la inmunidad humoral.

La producción de anticuerpos frente a un antígeno requiere la cooperación de linfocitos Th2 específicos del mismo antígeno

Los linfocitos T cooperadores (CD4 positivos) están especializados en la activación de otros tipos celulares, y entre ellos pueden distinguirse los linfocitos Th1 (inflamatorios), implicados en la activación de macrófagos, y los linfocitos Th2, que son los responsables de

la activación de las células B. **Las respuestas mediadas por anticuerpos frente a antígenos de tipo protéico requieren la cooperación de células Th2.** Los linfocitos T y B implicados en este tipo de respuestas han de ser específicos para el mismo antígeno (aunque no reconocen necesariamente los mismos epítomos).

Tras la interacción del linfocito B con el antígeno para el que es específico éste se activa parcialmente y expresa, por ejemplo, receptores para citocinas. Además, el complejo inmunoglobulina/antígeno es internalizado, el antígeno procesado y finalmente presentado asociado a MHC-II. Las células Th2 que reconocen el péptido presentado por el MHC del linfocito B se activan y envían señales –vía contacto directo (**CD40L, ahora CD154**), vía factores solubles (**IL-4, IL-10, IL-13**) –que activan y expanden el clon de linfocitos B. Estas células Th2 efectoras podrán haber sido previamente activadas por otros linfocitos B o, más a menudo, por macrófagos o células dendríticas. **Si esta interacción T/B antígeno-específica no se produce, el linfocito B no logra diferenciarse a célula plasmática para producir anticuerpos.** La célula B que no reciba las señales accesorias, además, queda incapacitada para respuestas posteriores (*Figura 2*) y se le denomina anérgica.

El cambio de isotipo por los linfocitos B requiere la cooperación de los linfocitos Th1 o Th2

La porción variable de la estructura de las moléculas de anticuerpo es la responsable de la interacción con el antígeno, mientras que la región constante (isotipo) controla su función efectora concreta. Anticuerpos con la misma especificidad por antígeno pero de distinto isotipo pueden mediar respuestas diferentes (lisis, fagocitosis, inflamación) y es posible que, con objeto de generar una respuesta inmune más eficaz, cierta región variable se combine con una concreta región constante en determinado momento y, posteriormente, con otra, en un proceso conocido como **cambio o *switch* de isotipo**. En un principio las células B producen cadenas μ y por tanto anticuerpos del tipo IgM. Sin embargo, **tras la estimulación por antígeno los linfocitos B proliferan y se diferencian, pudiendo producir anticuerpos de otros isotipos** –aunque no de otra especificidad (salvo mediante hipermutación somática), ya que los genes que codifican las regiones variables han sufrido una recombinación somática irreversible previa a la síntesis de inmunoglobulinas–. De este modo una determinada región variable reordenada puede ser utilizada en anticuerpos de diferente isotipo en el transcurso de una respuesta inmune, cambiándose su función efectora. Este cambio de isotipo sólo ocurre en el caso de las cadenas pesadas e implica la existencia de **sitios específicos de recombinación** en los genes constantes. Durante el cambio de isotipo se produce la

recombinación entre dos de estos sitios, con la consiguiente pérdida del DNA contenido entre ellos, y la transcripción puede tener lugar ahora desde la región V_H hasta la nueva región constante. Estos sitios de recombinación se denominan de *switch* (S) y se localizan en posición 5' de todos los genes C excepto del δ , que siempre es coexpresado con μ por transcripción diferencial y posterior escisión intrónica o ajuste (*Figura 3*).

El cambio de isotipo tiene lugar en células B activadas por antígeno y está regulado por células T cooperadoras (Th1 y Th2). La ayuda prestada por la célula Th al linfocito B se lleva a cabo a dos niveles: uno que implica **contactos directos** a través, nuevamente, de CD40/CD40L y otro controlado por **factores solubles** (citocinas). Algunas de estas citocinas son las mismas que se encontraban implicadas en la inducción de proliferación de los linfocitos B (**IL-4**). Mientras que la necesidad de contactos directos parece universal para todos los isotipos, ciertas citocinas inducen cambios de isotipo selectivos (*Figura 4*). Todas las citocinas actúan del mismo modo: haciendo accesibles a las recombinasas correspondientes las regiones S situadas antes de los genes constantes. Por tanto, las células T cooperadoras regulan tanto la producción de anticuerpos por las células B (Th2) como su isotipo (Th1 y Th2), que determina, en última instancia, la función efectora de dicho anticuerpo.

La vía de activación por contacto más importante es la mediada por el par CD40L/CD40 –sobre las células T y B respectivamente–. CD40L es esencial para el cambio de isotipo de los linfocitos B: individuos deficientes en dicha molécula sólo sintetizan IgM.

Las células T también reciben señales de las B para el cambio de isotipo (*Figura 4*). La interacción CD28/CD80, por ejemplo, está implicada en la intensificación de la síntesis de citocinas por los linfocitos.

Los linfocitos B efectoras sufren mutaciones somáticas y son seleccionados positivamente por el antígeno en los centros germinales de los tejidos linfoides

Las respuestas del organismo mediadas por anticuerpos mejoran con el tiempo, respecto al primer contacto con antígeno. Este perfeccionamiento de la respuesta inmune humoral se conoce como **maduración de la afinidad**, y es la consecuencia de los procesos de **hipermutación somática** en los genes de las inmunoglobulinas y posterior **selección** de los clones B de mayor afinidad. Tiene lugar en los centros germinales del bazo y de los ganglios. Algunas de las células B que han sido activadas por los linfocitos Th en las zonas T de los

órganos linfoides secundarios se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos y emigran a la médula ósea. Otras migran hacia los folículos primarios del órgano linfoide correspondiente y comienzan a proliferar muy rápidamente, llamándose entonces centroblastos. De este modo se produce en muy poco tiempo un gran aumento en el número de células B específicas para el antígeno que había iniciado la respuesta. Finalmente estas células maduran y dejan de dividirse, llamándose entonces centrocitos y constituyendo el centro germinal. Cada uno de estos centros se origina a partir de una o muy pocas de las células B que colonizó el folículo. Es fundamental en su formación la participación de las llamadas células dendríticas foliculares –de origen incierto–, que actúan como eficaces presentadoras de antígeno nativo e inducen proliferación/selección de las células B ya activadas: el resultado final es la maduración de la afinidad de la respuesta humoral.

Los procesos de hipermutación somática y posterior selección por antígeno que subyacen a la maduración de la afinidad de la respuesta inmune humoral tienen lugar durante el contacto con la célula dendrítica folicular. La hipermutación somática afecta a los genes variables de las inmunoglobulinas ya reordenados y también al DNA próximo –la mayoría de las mutaciones se concentra a nivel de las regiones hipervariables–, pero no a los genes que codifican las regiones constantes. Los nuevos receptores formados se expresan en la progenie de las células que se estaban dividiendo activamente en el centro germinal. alguna de estas células derivadas de los linfocitos B formadores del centro germinal pueden dar lugar a células plasmáticas. En cualquier caso, lo más frecuente es que mueran –por apoptosis–, a no ser que sean rescatadas de este fin por contacto directo con antígeno, que es presentado por las células dendríticas foliculares (**selección positiva por antígeno**). Por tanto, todos aquellos linfocitos B cuyos nuevos BCR tengan menor afinidad que el de la célula de la que proceden son eliminados. Este proceso de selección positiva de los linfocitos B a nivel de los centros germinales es análogo a la selección positiva de los timocitos, pero a diferencia de ésta se produce durante la respuesta misma, y no durante la ontogenia, como en el caso de los linfocitos T.

Los linfocitos B seleccionados se diferencian a células plasmáticas o a células de memoria

Los linfocitos B seleccionados positivamente en el centro germinal pueden diferenciarse bien a células plasmáticas productoras de anticuerpos, bien a células B de memoria. El que se conviertan en uno u otro tipo celular depende probablemente de las señales recibidas en el momento de abandonar el centro germinal. Se cree que la

diferenciación hacia **célula plasmática** es debida a las señales recibidas por el linfocito B a través del correceptor CD19/CD21/CD81 desde la molécula CD23 expresada en la membrana de las células dendríticas foliculares o liberada de forma soluble al medio por estas mismas células. Va acompañada de importantes cambios en la morfología, fenotipo y función de la célula que se diferencia. Las células plasmáticas no se dividen, no cambian de isotipo y no sufren mutación somática. Además, no expresan en su membrana ni inmunoglobulinas ni MHC de clase II, y no pueden, por tanto, interactuar ni con antígenos ni con linfocitos Th, de modo que la producción de anticuerpos por dichas células es independiente de ambos.

La diferenciación hacia **células de memoria** dependería de las señales recibidas por el linfocito B a través de CD40 desde su ligando en los linfocitos T, requiriendo, por tanto, nuevos contactos con linfocitos Th.

RESUMEN. Los linfocitos B mediante sus productos (las Igs) son las células efectoras de la respuesta inmune humoral, y tienen como principales tareas la eliminación de patógenos extracelulares y el control de la posible extensión de infecciones intracelulares. Para que los linfocitos B, puedan poner en marcha estas funciones y diferenciarse hacia linfocitos B efectoras y finalmente a células plasmáticas, es necesaria su activación por antígeno. La producción de anticuerpos (IgM) frente a un antígeno requiere la cooperación de linfocitos Th2 específicos del mismo antígeno, que emiten señales accesorias en forma de contactos y citocinas. Además, y con objeto de generar una respuesta inmune más eficaz en sucesivos contactos con un mismo antígeno (respuesta secundaria), los linfocitos B efectoras pueden modificar el isotipo de la inmunoglobulina que producen y con ello las funciones efectoras que dependen de él. El proceso de cambio de isotipo está controlado también por células T cooperadoras (Th1 y Th2 esta vez) y nuevamente son contactos B/T – especialmente CD40/CD40L– y distintas citocinas los modos de ejercer ese control. La afinidad de la respuesta humoral mejora con el tiempo respecto a la existente en el primer contacto con el antígeno. Esta maduración de afinidad de la respuesta humoral es la consecuencia directa de los procesos de hipermutación somática –que afecta a los segmentos V de los genes de las inmunoglobulinas pero no a los C– y posterior selección de los clones B de mayor afinidad. Tiene lugar en los centros germinales del bazo y ganglios y es fundamental para su consecución la participación de las denominadas células dendríticas foliculares. Sólo los linfocitos B cuyos nuevos receptores poseen una mayor afinidad que los de las células de las que procedían abandonan el centro germinal y pueden dar lugar a células plasmáticas o a células de memoria. El resto muere por apoptosis. La diferenciación a célula plasmática

requiere contactos de las células dendríticas foliculares, mientras que la diferenciación hacia células de memoria implica contactos de los linfocitos Th.

1.1.2 Activación del linfocito T

Las células T, producidas en el timo, son, quizá, las células más importantes de la respuesta inmune adaptativa. La mayoría de ellos (linfocitos $T\alpha\beta$, ver un poco más adelante) comparten una curiosa manera de reconocer antígeno -en el seno de las moléculas de MHC propias- y la estructura receptora necesaria para este reconocimiento (Fremont y cols 1996).

Existen dos subpoblaciones principales de linfocitos T, la $T\alpha\beta$ (mayoritaria en humanos, Brenner y cols 1986) y la $T\gamma\delta$ (minoritaria y poco conocida, Li y cols 1998). Entre los primeros se distinguen, a su vez, las células pertenecientes al linaje CD4 (Th, cooperadoras) y las pertenecientes al linaje CD8 (Tc, citotóxicas). Los linfocitos Th actúan como coordinadores de la respuesta inmune -controlan la acción de otros linfocitos y de macrófagos- y los Tc son responsables de la destrucción de células infectadas.

Los linfocitos Th reconocen, además, el antígeno cuando éste les es presentado por moléculas MHC de clase II, y los linfocitos Tc ven antígeno en el contexto de las moléculas MHC de clase I (von Boehmer y cols 1989).

Por otra parte, las células T de un individuo -repertorio útil- no son más que el resultado de un proceso indiscriminado de generación -repertorio posible- seguido de un posterior proceso de selección en el que se eliminan la mayoría de las células producidas. Este mecanismo global de selección (suma de los procesos de selección positiva y negativa) garantiza la eficacia (afinidad /especificidad adecuadas) de los linfocitos que finalmente constituirán nuestra principal barrera de células de defensa adaptativa (Moller 1993, Nossal y cols 1994). Este proceso de selección no es más que una comprobación de cómo es y cómo funciona el receptor para antígeno (complejo TCR/CD3) expuesto en la membrana de las células que pretenden convertirse en linfocitos T. Por ello el conocimiento de la composición y organización de esta macroestructura es determinante para el buen entendimiento de la fisiología de la respuesta inmune adaptativa.

El receptor para antígeno del linfocito T: Complejo TCR/CD3: Generalidades

A diferencia de los linfocitos B, que prefieren reconocer antígenos libres, los linfocitos T $\alpha\beta$ se han especializado en el reconocimiento de fragmentos de antígenos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) o de las células diana (Fremont y cols 1996). Para este fin, los linfocitos T disponen de un conjunto de proteínas de membrana denominado receptor para antígeno de la célula T o complejo TCR/CD3 (*T-cell receptor*). Este complejo está compuesto por dos cadenas variables, glicosiladas, que forman un heterodímero estabilizado por puentes disulfuro, TCR, y un conjunto de proteínas invariantes denominadas colectivamente complejo CD3 (Reinherz y cols 1982, Clevers y cols 1988) (Figura 1). Ambos grupos se asocian entre sí, formando el complejo receptor TCR/CD3 completo (Wegener y cols 1992).

El heterodímero TCR es el encargado del reconocimiento antigénico. La mayor parte de los linfocitos T (entre el 90-95% de las células T periféricas) utiliza como unidades variables a las cadenas TCR α y TCR β . Una pequeña subpoblación (5-10%) de linfocitos T utiliza, sin embargo, otras cadenas variables diferentes denominadas TCR γ y TCR δ . Aunque la secuencia de las cadenas variables es completamente distinta entre los TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, su organización génica general -y por tanto su estructura proteica global- es muy parecida y recuerda a la de las inmunoglobulinas al tener regiones constantes (C), variables (V), de unión (J) y, en algunos casos, de diversidad (D) (Borst y cols 1993, Rowen y cols 1996).

Las regiones V, J y (en su caso) D son las encargadas de llevar a cabo el reconocimiento del fragmento de antígeno presentado por la molécula de histocompatibilidad. Pero en este reconocimiento no hay división de funciones: ambas cadenas α y β (¿o γ y δ ?) participan simultáneamente en los contactos con el antígeno y con la molécula de histocompatibilidad, sin que ninguna de ellas se especialice en reconocer una u otra estructura. La posibilidad de reconocer una casi infinita variedad de antígenos es debida a los reordenamientos clonales que sufren los genes V, D y J durante la ontogenia (Davis, 1990), que permite la generación de 10^{17} - 10^{20} tipos de receptores distintos en un individuo concreto (Weiss, 1990). La región C contiene los dominios de anclaje a la membrana (ricos en residuos hidrofóbicos) y los dominios intracelulares (compuestos por tan solo 5 a 12 aminoácidos) e

incapaces, por sí mismos, de acoplar la señal generada por la unión del antígeno con la maquinaria intracelular encargada de la transducción de señales.

Las cadenas del TCR se encuentran asociadas de forma no covalente a un conjunto de proteínas invariables llamadas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y ζ (Clevers y cols 1988) que cumplen dos funciones fundamentales. Por un lado son necesarias para el ensamblaje y expresión en membrana del receptor de la célula T, y por otro son las encargadas de transmitir las señales de reconocimiento del antígeno al interior celular (Ashwell y Klausner, 1990). Las cadenas CD3 γ , CD3 δ (ambas glicosiladas y de gran similitud, Krissansen y cols 1986) y CD3 ϵ (no glicosilada) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se encuentran codificadas por genes próximos entre sí y localizados en el cromosoma 11 (Tunnacliffe y cols 1987). La cuarta cadena CD3 es CD3 ζ , y se asocia al complejo TCR, bien en forma de homodímeros $\zeta\zeta$ (en el 90% de los complejos TCR/CD3), o bien formando heterodímeros con otras cadenas de su misma familia [cadena η -derivada de un procesamiento alternativo en el ARNm de la cadena ζ , Clayton y cols 1991- o la cadena γ del receptor para Fc ϵ , Baniyash y cols 1988; Orloff y cols 1990]. La cadena ζ , codificada en el cromosoma 1 (Baniyash y cols 1989), es completamente distinta en su secuencia de las cadenas CD3 y es, en cambio, parecida a una cadena que forma parte del receptor para el fragmento Fc de la IgE (Fc ϵ RI) y que transmite señales para él. Otra diferencia entre las cadenas tipo ζ y las de la familia CD3 es que aquellas, pero no estas últimas, se asocian a otras proteínas además de al TCR, y forman parte, por ejemplo, del receptor para el fragmento Fc de la IgG en células NK (Fc γ RIII), para el que también transmiten señales.

Activación fisiológica de la célula T

Como se acaba de exponer el receptor para antígeno de la célula T es un gran complejo multiproteico, construido mediante la asociación de dos cadenas variables -TCR α y β o TCR γ y δ , responsables del reconocimiento antigénico- con varias cadenas accesorias invariantes -cadenas CD3-. Estas últimas son fundamentales para anclar el receptor a la membrana (también para su transporte) y determinantes para la puesta en marcha de los mecanismos de señalización celular. La interacción con antígeno supone, en última instancia, la activación del linfocito T e implica la transcripción de determinados genes y el bloqueo de otros, típicos de células en reposo. Cómo se llega del receptor al núcleo y con ello a la

apertura /cierre de distintos genes es lo que se trata de resumir en este apartado (B Malissen y cols 1993).

Las cadenas CD3 son proteínas transmembrana y poseen, además de la lógica región transmembranal, un dominio extracelular (tipo inmunoglobulina) y una larga cola citoplasmática en la que se han detectado unas secuencias altamente conservadas denominadas ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) fundamentales en las etapas iniciales del proceso de señalización. Las secuencias ITAM son esencialmente dos residuos de tirosina (Y), separados entre si por aproximadamente 13 aminoácidos, blanco de fosforilaciones mediadas por las quinasas asociadas al receptor (Klausner y cols 1991). La secuencia canónica de los ITAM viene a ser la siguiente:...Yxxx[L/V]_{x7-11}Yxx[L/V]... (Weiss y Littman 1994). Todas las cadenas CD3 contienen un motivo ITAM, excepto CD3 ζ que contiene tres, de modo que en un complejo TCR/CD3 completo (TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta_2$) existen 10 secuencias de este tipo. Cuando un linfocito T se aproxima a una célula para inspeccionar el contenido de sus moléculas de histocompatibilidad por medio de su TCR tienen lugar, al mismo tiempo, otras interacciones moleculares de suma importancia (Matsui y cols 1991). En los momentos iniciales de la interacción celular es muy importante un conjunto de moléculas (ej. CD11a/CD18, CD43, CD45) globalmente designadas como moléculas accesorias e implicadas en el "amarre" de las dos células que interaccionan. En esta situación puede tener ahora lugar la inspección antigénica propiamente dicha. Si no se produce el reconocimiento, el linfocito T se separa sin cambios para proceder a nuevos anclajes e inspecciones, pero si por el contrario sí se produce reconocimiento específico, entonces la adhesión inicial se intensifica, se produce una agregación local de proteínas accesorias en la zona de reconocimiento y el complejo TCR/CD3 comienza a distribuir señales de activación (o inhibición) al interior celular.

Entre las moléculas más importantes para la activación de la célula T se encuentran las proteínas CD2 y CD28 (De Franco, 1991; Van Lier y cols 1991, Yang y cols 1996), CD43 (¿inhibidora? Rosentein y cols 1993), CD45 (Trowbridge y cols 1994), LFA-1 (Desroches y cols 1991) y especialmente los correceptores CD4 y CD8 (Hara y cols 1991), que interaccionan también con la molécula de histocompatibilidad presentadora (aunque a través de regiones conservadas). Muchas de estas moléculas accesorias se encuentran asociadas directa o indirectamente a proteínas con actividad tirosina quinasa o fosfatasa y, aunque no se conozcan con precisión todas las señales de activación/inhibición por ellas emitidas, es

posible que el linfocito T utilice estas moléculas para identificar o seleccionar a su interlocutor celular mientras inspecciona sus moléculas de histocompatibilidad y decide cual será su respuesta.

En cualquier caso, la señal de activación de la célula T pasa por el "uso" de las mencionadas secuencias ITAM del complejo CD3. El comienzo del proceso señalizador supone el concurso de dos proteínas con actividad Tyr-quinasa de la familia *src*, denominadas p56^{lck} (lck, asociada de forma constitutiva a los correceptores CD4 y CD8, Shaw y cols 1990, Turner y cols 1990, Chow y cols 1995) y p59^{fyn} (fyn, que interacciona con las colas citosólicas de las cadenas CD3 ζ y CD3 ϵ , Samelson y cols 1990, Sarosi y cols 1992). Ambas quinasas están implicadas en la fosforilación de las secuencias ITAM de las cadenas CD3 (Iwashima y cols 1994, van Oers y cols 1996). Estas proteínas lck y fyn se encuentran normalmente inactivas, y su activación supone la eliminación de un grupo fosfato de un resto de Tyr de su dominio catalítico. Este proceso está mediado por la fosfatasa CD45 (Trowbridge y cols 1994).

Las quinasas asociadas al correceptor son cruciales en la activación de la célula T, y por ello la señalización óptima a través del TCR/CD3 implica la asociación de ambos elementos, receptor y correceptor. De esta manera se consigue aproximar físicamente la quinasa lck (en estas etapas más importante que fyn) a sus dianas de fosforilación (ITAMs) y otra Tyr-quinasa fundamental en la célula T, ZAP70 (Weiss y Littman 1994, Chan y cols 1992, Chan y cols 1994), capaz de interactuar con los dominios ITAM fosforilados de la cadena ζ , y que fosforila a su vez a otras proteínas, adaptadores, permitiendo que pueda continuar la cascada de activación del linfocito T.

La propagación de la señal de activación supone la participación de otras muchas proteínas, entre las que destaca por su importancia la fosfolipasa C (PLC) (June y cols 1990). Esta proteína escinde, por una parte, las moléculas de fosfatidilinositolbisfosfato (PIP₂) de la membrana plasmática liberando moléculas de diacilglicerol (DAG) e inositoltrisfosfato (IP₃), que se convierten en fundamentales segundos mensajeros en el proceso de activación (Noh y cols 1995). El IP₃ actúa sobre los canales celulares de Ca²⁺, contribuyendo al aumento de la concentración intracelular del ion (Putney 1990, Berridge y cols 1993), y el DAG activa -en acción conjunta con el Ca²⁺ recién liberado- a otra proteína, con actividad Ser/Thr-quinasa, esencial en el proceso de señalización celular, denominada proteínquinasa C (PKC) (Szamel y

cols 1995). El Ca^{2+} activa, además, a otras muchas enzimas Ca^{2+} -dependientes en su funcionamiento, entre las que sobresale la calcineurina (Crabtree y cols 1994). Por otra parte la PLC activa directamente a otra serie de proteínas dependientes de GTP (ej. Ras) que inician a su vez la cascada de activación mediada por las denominadas MAP quinasas (Jacinto y cols 1998).

La acción conjunta de todos estos elementos señalizadores -enzimas activados vía PKC, proteínas Ca^{2+} -dependientes y la ruta de las MAP quinasas- induce la activación de factores de transcripción responsables de la lectura de genes implicados en proliferación y diferenciación (Jacinto y cols 1998). La PKC activa el factor NF κ B (Loh y cols 1996); el ion Ca^{2+} activa a la calcineurina, que induce a su vez otro factor de transcripción, NFAT, y a través de la ruta de las MAP quinasas se activa el factor AP1 (necesario para la acción del NFAT) (Northrop y cols 1994, Rao 1994, Baier-Bitterlich y cols 1996). Finalmente se transcriben distintos genes implicados en el proceso global de activación celular. Quizá uno de los más importantes, y muy relevante a nuestro trabajo, sea el gen de la IL2 (Pacheco-Castro y cols 1998). ¿Qué papel desempeña la cadena CD3 γ , un elemento señalizador tan temprano, en la apertura del gen de esta citoquina?. Otros genes importantes inducidos más o menos tardíamente tras la activación del linfocito T incluyen *marcadores de activación*, como CD69 y CD154 expresados a las 2-6 h del reconocimiento antigénico y cruciales para la señalización del estado funcional en que se encuentra la célula (CD69) (Sánchez-Mateos y cols 1991) o bien para transmitir la señal de activación a otras células (CD154) (Yang y Wilson, 1996); otras citoquinas (distintas a la IL2) o genes más tardíos implicados en los procesos de *proliferación celular* y por tanto responsables de la expansión del clon(es) específico(s) del antígeno que desencadena la respuesta o la producción de moléculas de "ataque" (perforinas) implicadas en la eliminación de patógenos intracelulares (Figura 4).

1.2 Patología

1.2.1 Inmunodeficiencias primarias conocidas y desconocidas

Las inmunodeficiencias humanas son una categoría heterogénea de enfermedades, que engloba los defectos del sistema inmunitario. Las inmunodeficiencias se clasifican en **primarias o congénitas** (ID) cuando la causa es una mutación en un gen del sistema inmunitario, o en **secundarias o adquiridas** cuando es una causa externa al propio sistema inmunitario el que provoca la deficiencia (Report of a WHO Scientific Group 1998). Las inmunodeficiencias primarias son muy poco frecuentes, de herencia autosómica recesiva (AR) o ligada al cromosoma X (LX) y se agrupan de acuerdo con el tipo celular que se encuentra más afectado, en su número y/o en su función; en alguna de estas deficiencias se conoce el gen causante de la enfermedad, aunque hay otras sin localización genética en la actualidad. Como consecuencia de los defectos se producen infecciones repetidas causadas por protozoos, bacterias, hongos o virus; el tipo de infección observada puede ayudar a definir el componente del sistema inmunitario. Las inmunodeficiencias secundarias pueden ser debidas a la administración de fármacos inmunosupresores, radioterapia, malnutrición, enfermedades del metabolismo, uremia, deficiencias vitamínicas, enfermedades malignas, infecciones (virus de Epstein-Barr) virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), situaciones de estrés (cirugía, politraumatismos) y alteraciones mentales o psicofuncionales (depresión, esquizofrenia, etc...).

Al igual que ocurre con los defectos del complemento, los individuos con deficiencias de linfocitos B son susceptibles a padecer infecciones recurrentes causadas por bacterias encapsuladas, como *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* (llamadas también piógenas, porque inducen la formación de pus), siendo las enfermedades más comunes que desarrollan estos enfermos la neumonía, la otitis media y la sinusitis.

En 1952 se describió la primera inmunodeficiencia, caracterizada por la ausencia de linfocitos B y, por lo tanto, con ausencia de inmunoglobulinas en suero (Bruton y cols. 1952). Como además esta enfermedad era hereditaria y sólo afectaba clínicamente a los varones se denominó **agammaglobulinemia ligada al X** (XLA). El gen defectuoso en esta inmunodeficiencia codifica para una proteína tirosín-cinasa que se encuentra en todos los linfocitos B y en leucocitos polimorfonucleares, denominada *btk* (Vetrie y cols. 1993,

Tsukada 1993). Esta cinasa se asocia en las células B al receptor (BCR), transmitiendo señales al interior celular. Al igual que ocurre con la cinasa *Ick* o *Zap70* en linfocitos T, la ausencia de la proteína *btk* produce un impedimento en la diferenciación de los linfocitos B que permanecen en el estadio pre-B.

En ciertas inmunodeficiencias asociadas a linfocitos B el defecto no se encuentra en la reducción del número de células de este linaje, que se encuentra en los niveles normales, sino que las células B son incapaces de sintetizar uno o varios isotipos de inmunoglobulinas. El caso más claro dentro de éstas es la deficiencia de IgA, la inmunodeficiencia más común, ya que se da en uno de cada 800 individuos de la población caucasoide (Vyas y cols 1975). Los síntomas más característicos son infecciones sinopulmonares, colitis y enteritis, es decir, infecciones de las mucosas. A menudo se encuentra asociada a enfermedades autoinmunes (como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide) o a enfermedades alérgicas. Algunos individuos también desarrollan una deficiencia de IgG₂. También se han descrito individuos con deficiencias selectivas de uno o varios isotipos de IgG. Estos pacientes con frecuencia desarrollan infecciones del tracto respiratorio. El defecto, en algunos casos, está localizado en mutaciones de los genes que codifican para las cadenas pesadas o de las ligeras.

Finalmente podemos incluir en este apartado de defectos de linfocitos B a las deficiencias de síntesis de inmunoglobulinas en individuos menores de un año. Las inmunoglobulinas de origen materno permanecen activas en el recién nacido hasta los 6-12 meses, que coincide con la síntesis de las primeras inmunoglobulinas propias; pero si esta síntesis inicial se retrasa se origina un déficit de inmunoglobulinas, pudiendo producirse infecciones. De todos modos, esta deficiencia es transitoria y desaparece cuando el individuo comienza a sintetizar sus propias inmunoglobulinas.

Otro defecto tradicionalmente asociado a linfocitos B es la inmunodeficiencia común variable (CVID), donde el número de células B es normal pero hay una reducción de los niveles de Igs en el suero. En algunos de estos pacientes parece que el defecto reside en los linfocitos T CD4⁺, que no cooperan bien con los B. A continuación trataremos esta enfermedad con detalle

Tabla 2. Deficiencias de isotipos de inmunoglobulinas

Enfermedad (incidencia)	Igs (suero)	Células B circulantes	Defecto primario	Diagnóstico inmunológico	Disfunciones o consecuencias inmunológicas/clínicas	Herencia Cromosoma	Tratamiento
Agammaglobulinemia ligada al X (1:50.000-1:100.000)	Ausencia de los cinco isotipos de Igs	Ausencia de células B maduras	Mutaciones en el gen <i>Btk</i>	Citometría Niveles de Igs	Inadecuada formación de Ac Infecciones piogénicas	LX Xq21.3-22	GGI
HiperIgM autosómica (<200)	IgM e IgD elevada o normal. Disminución de IgG, IgA e IgE	Sólo IgM e IgD positivas	Desconocido ¿CD40?	Citometría Niveles de Igs	Neutropenia, anemia hemolítica Infecciones bacterianas recurrentes	?	GGI
Deficiencia de IgA (1:700)	Ausencia en suero y secreciones de IgA	Normal o disminuido	Desconocido	Niveles de IgA	Procesos atópicos, tumorales autoinmunes e infecciones bacterianas recurrentes	Variable	Sintomático
Inmunodeficiencia Común variable (IDCV) (1:10.000-1:50.000)	Ausencia o disminución de Igs	Normal o disminuido	Desconocido	Niveles de Igs	Carencia de producción de Ac específicos Infecciones bacterianas	Variable	GGI
Deficiencia de Subclases de IgG	Ausencia de las distintas subclases de IgG	Normal o inmaduras	Desconocido	Niveles de IgG	Infecciones bacterianas recurrentes	AR 14q32.3	GGI
Deficiencia de La cadena κ .	Ig (K) disminuida	Normal o disminuidas las κ positivas	Mutaciones puntuales (2p11)	Niveles de IgG	Infecciones bacterianas recurrentes	AR 2p11	GGI
Agammaglobulinemia autosómica recesiva	Ausencia de los cinco isotipos de Igs	Ausencia de células B maduras	Mutaciones en el gen μ (o λ 5.14)	Niveles de Igs	Inadecuada formación de Ac Infecciones piogénicas	AR 14	GGI

1.2.2 Inmunodeficiencias secundarias

Las inmunodeficiencias secundarias son más frecuentes que las primarias y aparecen en un individuo previamente dotado de un sistema inmunitario normal como consecuencia de efectos nocivos ambientales (yatrógenos, infecciosos, malnutrición). Las funciones inmunitarias que se alteran son variables y se normalizan si se consigue eliminar la causa que las produce. Las principales causas de inmunodeficiencias secundarias en los países industrializados son las yatrógenas y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana que causa el denominado síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Si bien los pacientes pueden presentar un síndrome de infecciones de repetición, en general las pruebas inmunológicas, con excepción del SIDA, no suelen aportar datos de interés para el diagnóstico o el tratamiento. La esplenectomía es una de las causas más conocidas de inmunodeficiencia secundaria, aunque en la actualidad suele dejarse un pequeño resto de tejido esplénico capaz de compensar, en ocasiones de forma muy completa, la totalidad del órgano.

Otra de las causas más corrientes de inmunodeficiencias secundarias la constituyen los fármacos denominados inmunodepresores. Entre ellos se incluyen los glucocorticoides y la mayoría de los productos que se utilizan como antineoplásicos. Las sales de oro, el levamisol, la azatioprina, la penicilamina y la sulfasalazina pueden producir hipogammaglobulinemia, que en ocasiones afecta selectivamente la IgA, dato que es importante tener en cuenta antes de realizar el diagnóstico de estas inmunodeficiencias de anticuerpos y catalogarlas como primarias. La ciclosporina A inhibe la respuesta inmune celular y se utiliza por esta acción para evitar el rechazo en el trasplante de órganos. La edad (vejez o prematuridad) es un factor que predispone a padecer un grado variable de inmunodeficiencia. Algunos procesos patológicos causan *per se* una inmunodeficiencia secundaria, que en ocasiones puede llegar a ser grave; entre ellos los principales son las neoplasias, las pérdidas proteicas y las hepatopatías crónicas, que se deben tener en cuenta en el momento de adoptar una actitud terapéutica. En los países subdesarrollados, la malnutrición constituye una de las principales causas de inmunodeficiencias secundarias; en algunos de dichos países (centroafricanos), el SIDA es también uno de los principales problemas sanitarios.

2

La Inmunodeficiencia Común Variable (CVID)

2.1 Características

Esta inmunodeficiencia, de etiología desconocida, engloba un grupo heterogéneo de enfermedades cuya característica común es la incapacidad de producir anticuerpos por parte de las células B. Es la inmunodeficiencia primaria más frecuente después de la IgAD con una incidencia estimada entre 1:10.000 y 1:50.000. Se han publicado varios estudios sobre la identificación del defecto(s) inmunológico. Sin embargo, no se ha podido establecer un patrón lo suficientemente consistente para realizar una clasificación adecuada. La inmunidad mediada por células T se encuentra afectada en aproximadamente el 30% de los pacientes, por lo que se ha postulado que el defecto primario puede residir en los linfocitos T. Afecta por igual a hombres y mujeres y aunque puede manifestarse a cualquier edad, hay una mayor incidencia en la segunda y tercera década de vida. Al igual que en todas las inmunodeficiencias primarias que afectan la inmunidad humoral, la presentación clínica de la CVID son infecciones sinopulmonares recurrentes por bacterias piógenas. Son frecuentes las citopenias autoinmunes, alteraciones gastrointestinales (enfermedad inflamatoria intestinal, anemia perniciosa), enfermedades autoinmunes (SLE, enfermedad de Graves) y existe mayor incidencia de procesos tumorales (linfomas no Hodgkin). Como era de esperar en un grupo tan heterogéneo de enfermedades, se han descrito varios patrones de heredabilidad (autosómica recesiva, autosómica dominante, ligada al cromosoma X). En cualquier caso, los casos esporádicos sin un patrón de herencia claro son los más frecuentes. En múltiples familias de varios miembros con diagnósticos de CVID e IgAD se heredan a menudo alelos del MHC característicos.

2.2 Etiopatogenia

El origen de la enfermedad no es conocido y, excepto en casos aislados, no hay evidencia de herencia familiar, aunque existe un aumento en la incidencia de la deficiencia de IgA y autoinmunidad en parientes de 1^{er} grado. En cualquier caso, parece existir una predisposición genética y deben intervenir tanto factores genéticos como exógenos, para el desarrollo de la enfermedad:

Se han realizado varios intentos de clasificar la CVID en base a las respuestas inmunológicas obtenidas "*in vitro*" (Saiki y cols. 1982, Ariga y cols. 1987S). Desafortunadamente, no se ha realizado análisis rigurosos para determinar si hay diferencias clínicas en la presentación, desarrollo y curación de la enfermedad. Por lo tanto, después de 40 años de estudio, el fenómeno inmunológico asociado con la CVID es bien conocido pero no hay hipótesis unificadoras derivadas del mismo (Spickett y cols. 1990)

La heterogeneidad de las manifestaciones clínicas e inmunológicas de la CVID ha dificultado las investigaciones ya que varios estudios publicados incluyen pacientes de más de un tipo, dando resultados confusos que son difíciles de comparara con otros estudios. En cualquier caso, esta situación ha sido aliviada en parte por el desarrollo de un sistema de tipaje basado en las respuestas de células B purificadas a anticuerpos anti-IgM de superficie unidos a Sepharose e Interleucina-2 (IL-2) (Bryant y cols. 1992). Usando este método, pueden identificarse 4 grupos de pacientes: 1) un pequeño grupo sin células B y una ausencia completa de respuesta humoral; 2) Grupo A, reducido número de células B circulantes, sin capacidad de formar IgG o IgM; 3) Grupo B (más raro) cuyas células B hacen IgM pero no IgG y 4) Grupo C, con número normal de células B que producen IgG e IgM (**Tabla 2**). Todos los pacientes de CVID testados hasta hoy caen dentro de uno de estos cuatro grupos. El ensayo funciona igualmente bien en células mononucleares no separadas y da los mismos resultados (Zhang y cols.1996), lo que permite al sistema ser adaptado para el diagnóstico de rutina. Lo que es más, el ensayo de fenotipo correlaciona bien con otros parámetros inmunológicos, incluyendo las diferencias en subpoblaciones de PBLs. (North y cols. 1991, Spickett y cols 1992, Farrant y cols. 1994)

Tabla 2. *Distintos desórdenes dentro de la CVID*

	CVID (sin células)	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Células B	No	Baja	Normal	Normal
IgG in vitro	No	No	No	Si
IgM in vitro	No	No	No	Si
Linfopenia	B	B, T CD4	Minor T cell	Rara/ausente
γ_2 -m	Normal	Elevada	Ligeramente elevada	Normal
Proliferación PHA inducida	Normal	Reducida	?	Normal
Proliferación antígeno específica	Normal	Reducida	Reducida	Reducida
Otras características	Genética para confirmar mutaciones en btk variantes leves	Granulomas, esplenomegalia	Estudios genéticos funcionales para HIGM autosómica o ligada a X	Asociación MHC? Enfermedades autoinmunes
Clínica	XLA	GAD	XHIM	VAD

2.2.1 Factores genéticos

En los últimos años se ha producido un enorme avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas responsables de la aparición de numerosas inmunodeficiencias primarias. Sin embargo, las dos más frecuentes de entre estas enfermedades, la deficiencia de IgA y síndrome variable común de inmunodeficiencia (CVID), permanecen aún por esclarecer. En ambas enfermedades, a diferencia de la mayoría de las inmunodeficiencias primarias, no se ha podido definir ni siquiera el modo de transmisión hereditaria, ya que predominan los casos esporádicos. Cuando aparecen varios casos en la misma familia es frecuente ver que ambos procesos aparezcan en miembros distintos de la misma familia. Esto ha hecho pensar que puedan tener un defecto genético común. Más aún, se ha pensado que la deficiencia de IgA y el CVID fueran los extremos opuestos de un espectro, y que en realidad constituyeran básicamente un mismo proceso. De hecho existen casos intermedios, y la

deficiencia de IgA cursa con frecuencia con deficiencia en una o varias subclases de IgG, y los enfermos con síndrome variable común mantienen en muchas ocasiones la producción de IgM (Johnson ML y cols. 1997). Todos estos cuadros presentan habitualmente linfocitos B inmaduros, con las inmunoglobulinas en su superficie, pero sin capacidad para transformarse en células productoras. Esto ha hecho pensar que estos defectos podían afectar a los linfocitos T más que a los B ya que los primeros son necesarios como células colaboradoras para la producción de anticuerpos por los segundos.

Asociación a genes del complejo principal de histocompatibilidad. La deficiencia de IgA, por ser un proceso más frecuente ha sido mejor estudiada que el CVID. Se ha descrito que la susceptibilidad para padecerla se asocia a determinados haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En esta zona del cromosoma 6 existen numerosos genes relacionados con la respuesta inmunitaria y que presentan un gran polimorfismo. Dado el elevado desequilibrio de ligamiento existente entre los diversos genes del MHC, resulta sumamente difícil dilucidar cual es la asociación primaria, y cuales son asociaciones secundarias debidas únicamente a las asociaciones existentes entre estos genes.

Inicialmente, los estudios se centraron en los genes de clase I, observándose que la deficiencia de IgA se asociaba con HLA-A1 y -B8 (Ambrus y cols. 1977). Posteriormente se comprobó que también existía una asociación con los genes de clase II HLA-DR3 y DR7 (Hammarström 1983). Estudios más recientes se centraron en los genes de clase III, y estudiando conjuntamente enfermos con deficiencia de IgA y enfermos con CVID, algunos pertenecientes a las mismas familias, observaron que existía un gran incremento de un alelo nulo del gen que codifica para el isotipo A del componente del complemento C4 (C4A) así como de algunos alelos poco frecuentes del gen que codifica para el componente C2 del complemento (Schaffer y cols. 1989). El problema está en que el alelo nulo de C4A se encuentra la gran mayoría de las veces en un haplotipo que engloba HLA-A1, B8 y DR3, y el poco frecuente alelo C2b que está aumentado en estos procesos aparece en desequilibrio de ligamiento con HLA- DR7 (Schaffer y cols. 1989). Esto hace que diferentes autores atribuyan la asociación primaria, unos a los genes de clase II, otros a los de clase III (Schaffer y cols. 1989, Volanakis y cols. 1992, Olerup y cols. 1992). De los dos grandes grupos que han estudiado la asociación MHC-CVID, el norteamericano (Max D. Cooper y cols) se inclina más por considerar que la asociación primaria es con genes de clase III (Johnson ML y cols. 1997, Schaffer y cols. 1989, Volanakis y cols. 1992). Por el contrario el europeo (Olerup,

Hammarström y cols) defiende que la asociación primaria es con clase II (Hammarström 1983, Olerup y cols. 1990, 1992).

Posición 57 en la cadena DQ beta. Después de establecer la asociación con HLA-DR3 y DR7, Olerup y Cols observaron en un estudio de 89 pacientes con déficit de IgA que la asociación aparecía también con HLA-DR1, y llegaron a la conclusión que lo único que tenían en común los haplotipos que contienen a estos tres alelos DR es genes DQB1 que codifican para cadenas DQ β con aminoácidos neutros (no aspártico) en la posición 57 (Olerup y cols. 1990). Esta posición se había visto ya con anterioridad que es clave en la molécula HLA-DQ, siendo también el marcador genético más importante en la diabetes mellitus tipo I. En ambos procesos se observa que la presencia de ácido aspártico protege, mientras que la presencia de cualquier otro de los aminoácidos existentes en esa posición (todos ellos neutros) confiere susceptibilidad para padecer la enfermedad.

En un estudio posterior, en el que, conjuntamente con los casos de déficit de IgA se estudian 86 enfermos con CVID, Olerup y cols observan las mismas asociaciones con alelos HLA-DR y -DQ en ambos procesos. Encuentran una asociación positiva con tres haplotipos (que en el locus DR portan los alelos DR1, DR3 y DR7) y una fuerte asociación negativa con un haplotipo, que en el locus DR tiene el alelo DR2. Concluyen que también en el CVID la asociación primaria sería con HLA-DQ y el factor más importante la ausencia de aspártico en la posición 57 (Olerup y cols. 1992). Llegan a esta conclusión tras comprobar que la asociación con alelos de los genes DR, DP, C2 y C4A es secundaria. Hacen un análisis estratificado, eliminando tanto en las dos enfermedades como en el grupo control los portadores de los haplotipos DR1, DQ5, DR3, DQ2 y DR7, DQ2 y observan como sigue siendo estadísticamente significativo el aumento de las cadenas DQ β portadoras de un residuo no aspártico en la posición 57 (Olerup y cols. 1990).

En un estudio reciente en nuestro país (De la Concha y cols 1999) en 88 enfermos con déficit de IgA y 39 enfermos con CVID se han corroborado tanto la asociación del déficit de IgA con los haplotipos DR1, DQ5, DR3, DQ2 y DR7, DQ21 como con el aumento de las cadenas DQ β portadoras de un residuo no aspártico en la posición 57. Sin embargo estas asociaciones, muy significativas en el caso del déficit de IgA, no lo son en el CVID. Las diferencias entre ambos procesos son llamativas, y discordantes con lo encontrado en estudios

anteriores en el norte de Europa y Estados Unidos. Hay que resaltar que en este estudio, a diferencia del realizado en pacientes norteamericanos (Volanakis y cols. 1992) no se incorporan familias en las que distintos miembros padezcan, cada uno, una de las enfermedades. Dado que el CVID es heterogéneo, es muy probable que en los distintos estudios las casuísticas no sean superponibles, e indudablemente es mucho más probable encontrar una misma base genética en los enfermos de déficit de IgA y CVID si se incluyen los que pertenecen a una misma familia. Sin embargo, no todos los resultados referentes a CVID son discordantes, ya que si bien no se observa una asociación a haplotipos concretos, sí se observa una mayor susceptibilidad a la enfermedad en aquellos sujetos que son portadores de dos HLA-DQ con cadenas beta en las que el residuo 57 es no aspártico.

Homozigosis para los genes HLA-DR y DQ. En el estudio realizado en nuestro país (De la Concha y cols 1999) se describe además, por primera vez, una asociación entre homozigosis en DR, DQA1 y DQB1 y susceptibilidad a CVID. En el caso del déficit de IgA también se ve un aumento de la frecuencia de enfermos que presentan los dos haplotipos HLA iguales, pero en este caso el aumento es estadísticamente significativo y además es exclusivamente debido a la presencia de individuos con déficit de IgA homozigotos para los haplotipos DR1, DQ5, DR3, DQw2 y DR7, DQw2. Este aumento es proporcional al aumento de la frecuencia de cada uno de estos haplotipos en la población portadora del déficit.

En los enfermos con CVID el aumento de homozigotos para HLA es estadísticamente significativo ($p < 0,001$) y confiere un riesgo relativo para padecer la enfermedad de 5,58. Dado que se había observado que la presencia de dos alelos HLA-DQB1 no aspártico en la posición 57 confieren susceptibilidad a la enfermedad, se realizó un análisis estratificado para comprobar si la asociación a homozigosis era debido exclusivamente a este factor o si la presencia de dos haplotipos HLA iguales, incluso con alelos que codifiquen para cadenas DQ β con Asp57, era suficiente para aumentar el riesgo de padecer la enfermedad. Este estudio permitió concluir que efectivamente la presencia de dos haplotipos HLA iguales estaba asociado a un aumento del riesgo, independientemente de los alelos presentes en esos haplotipos.

El polimorfismo a nivel de los genes que codifican para las moléculas presentadoras de antígenos (genes HLA) es el mayor de todos los observados en el genoma. Se piensa que la pluralidad en las moléculas presentadoras de antígeno es un factor esencial en la

supervivencia de la especie, ya que facilita el reconocimiento de péptidos derivados del procesamiento de esos antígenos, al aumentar por un lado las posibilidades de unión y presentación de los péptidos antigénicos a las moléculas presentadoras (a más moléculas presentadoras diferentes, mayores posibilidades de asociación) y por otro lado al aumentar las posibilidades de reconocimiento de la asociación péptido antigénico-molécula presentadora por los clones de linfocitos T.

Las moléculas HLA de clase II, esenciales para la iniciación de la respuesta inmunitaria, están compuesta por dos cadenas, alfa y beta, codificadas por genes presentes en la región de clase II del MHC. Para las moléculas HLA-DR existen un solo gen A, no polimórfico, y generalmente dos genes B funcionales que codifican para cadenas beta y forman dos moléculas HLA-DR distintas por haplotipo. La región DQ tiene un gen A y uno B polimórficos por haplotipo. Dado que se ha comprobado que se pueden formar moléculas híbridas entre la cadena alfa codificada por un cromosoma y la cadena beta codificada por el otro cromosoma, existen en el caso de que ambos haplotipos sean distintos cuatro tipos de moléculas HLA-DQ distintas.

Los individuos que presentan genes de clase II iguales en sus dos haplotipos disminuyen la diversidad de sus moléculas HLA-DR de cuatro a dos, y HLA-DQ de 4 a 1. Esta merma importante pudiera tener consecuencias en la capacidad para elaborar una respuesta inmunitaria. De hecho diversos trabajos describen desventajas para estos individuos. Así se ha observado que existe un menor número de homocigotos para HLA en la población norteamericana de lo que cabría esperar estadísticamente, y que esto no se relaciona con ningún alelo en particular (Kostyu y cols. 1993). También que el porcentaje de homocigotos para HLA disminuye en la población con la edad, indicando una menor vida media de aquellos (Dorak y cols. 1994), y que existe una mayor dificultad por parte de los homocigotos para eliminar el virus de la hepatitis B después de una infección, cronicándose el proceso y evolucionando más fácilmente a una cirrosis (Pollicino y cols. 1996). Finalmente de entre los procesos inmunológicos, se ha descrito una mayor incidencia de lupus eritematoso sistémico en homocigotos para HLA clase II, independientemente del haplotipo que porten (Skarsvag y cols. 1992).

En el caso de COVID también parece existir una relación entre la susceptibilidad a padecerlo y la homocigosis para HLA clase II, por lo que cabría pensar que una menor

capacidad de presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T pudiera influir en la posterior capacidad para desarrollar la enfermedad a diferencia de lo que ocurría en el déficit de IgA.

Resumen. En la relación entre genes HLA y CVID se encuentran dos factores asociados de forma independiente: la presencia de dos cadenas HLA-DQ β con residuos no aspártico en la posición 57, y la existencia de homocigosis en los loci HLA de clase II. De los dos factores el primero es común con el déficit de IgA, mientras el segundo, que tiene mayor relevancia, como lo demuestra el que el riesgo relativo sea mayor, es exclusivo del CVID. Habría que estudiar si las dos asociaciones lo son con diversas formas de CVID y que diferencias podrían existir entre ellas.

2.2.2 Factores exógenos o adquiridos

La enfermedad puede aparecer tras la rubéola congénita o infección postnatal por virus de Epstein-Barr (EBV) (Zuccaro y cols. 1997), así como por la administración de sales de oro, pero en este último caso suele ser transitoria.

2.3 Clínica

Muchos pacientes pueden padecer enfermedades autoinmunes durante años, antes de que se detecte la hipogammaglobulinemia o que aparezcan las infecciones de repetición. Las infecciones sinopulmonares recurrentes (otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonías) suelen ser la presentación inicial en la mayoría de los casos. Los microorganismos responsables son Neumococo, *Haemophilus influenzae* y otras bacterias piógenas. Suelen ser infecciones crónicas, más que agudas o diseminadas, a diferencia de la XLA. Aparecen bronquiectasias, enfermedad intersticial pulmonar crónica e insuficiencia pulmonar, aún a pesar de la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas. La insuficiencia respiratoria es la causa más frecuente de muerte. Las infecciones sistémicas son raras en pacientes tratados con terapia sustitutiva. A diferencia de los pacientes con enfermedad de Bruton, las manifestaciones gastrointestinales son frecuentes: diarrea crónica, intolerancia a la lactosa, malabsorción en aproximadamente el 50% de los pacientes y, en ocasiones, enteropatía pierde proteínas. Estas alteraciones se acompañan en algunos casos de atrofia de vellosidades

intestinales, hiperplasia nodular linfoide o infiltración linfoide difusa, solas o en combinación. En otros pacientes, las alteraciones intestinales están causadas por infecciones, especialmente por *Campylobacter* o por *Giardia lamblia*. Pueden existir, además enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, atrofia gástrica o anemia perniciosa. También, el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, la hepatitis crónica activa (viral o autoinmune) y la colelitiasis son hallazgos frecuentes. Muchos de estos pacientes tienen manifestaciones articulares en forma de artritis, y algunos artritis reumatoide clásica; más frecuentemente, la artritis es atípica, sin nódulo subcutáneos, erosiones articulares ni afectación de las articulaciones interfalángicas proximales. Se pueden encontrar también otras enfermedades autoinmunes como hipotiroidismo, enfermedad de Graves o Lupus eritematosos sistémico. Las citopenias autoinmunes se hallan en un 10-50% de los pacientes, siendo la anemia hemolítica y trombocitopenia las más frecuentes, así como también el síndrome de Evans (anemia hemolítica, trombocitopenia y neutropenia). La incidencia de tumores malignos, especialmente linfomas no-Hodgkin, es mayor que la población general, al igual que la de carcinoma gástrico. Junto con la insuficiencia pulmonar, los tumores malignos son la causa más frecuente de muerte en estos pacientes. La asociación entre hipogammaglobulinemia adquirida y timoma se conoce como síndrome de Good. La hiperplasia linfoide puede causar síntomas clínicos de enfermedad pulmonar crónica por neumonía linfoide intersticial, o malabsorción por hiperplasia nodular linfoide intestinal. En la exploración física en estos pacientes, se encuentra aumento de tejido linfoide (adenopatías, esplenomegalia) a diferencia de la XLA.

2.3.1 Diagnóstico y diagnóstico diferencial

Se considerarán los datos clínicos y de laboratorio mencionados: las infecciones recurrentes, la hipogammaglobulinemia y la inadecuada producción de anticuerpos tras inmunización. Además, la biopsia de tejidos linfoides mostrará carencia de células plasmáticas, aún cuando exista hiperplasia linfoide, y ausencia de células en las áreas B dependientes. El diagnóstico diferencial hay que hacerlo con la agammaglobulinemia ligada al X, pero hay suficientes datos distintivos, como son la presencia de células B con inmunoglobulinas de superficie en la CVID, la existencia de tejido linfoide a la exploración, edad de aparición del cuadro, etc... En las inmunodeficiencias secundarias a cuadros de

malabsorción con pérdida proteica, puede existir hipogammaglobulinemia, pero en este caso estará disminuida también la albúmina.

2.3.2 Tratamiento

Consiste en la administración de gammaglobulina intravenosa, según dosis estándar, y antibióticos de forma profiláctica. Se realizará monitorización de los pacientes a intervalos regulares, mediante radiografías de tórax y tests de función pulmonar, para determinar la eficacia del tratamiento. Se tratarán los problemas sobreañadidos, como son la malabsorción o los procesos autoinmunes. A este respecto, hay que ser cautos con las dosis de corticoides administradas, puesto que los pacientes están *per se* inmunodeprimidos. Con el tratamiento adecuado pueden sobrevivir hasta la quinta o sexta década de la vida. La principal complicación es la enfermedad pulmonar crónica, que puede desarrollarse aún a pesar del tratamiento con gammaglobulina intravenosa.

2.4 Datos de laboratorio

2.4.1 Linfocitos B

Las evidencias permiten establecer que al menos un subgrupo de pacientes con CVID presentan defectos intrínsecos en los linfocitos B, aunque por el momento no puede hablarse un único defecto puesto que existen al menos cinco grupos distintos en basados en su función. En algunos pacientes el defecto apunta hacia un incorrecto proceso secretor. En otros, la capacidad funcional puede estar relacionada con anomalías en la estructura o en el control de los genes que codifican las inmunoglobulinas, las citocinas o sus receptores. Por ejemplo, Levy Y et al (Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Oct 27;95(22):13135-40) encuentran dos pacientes con una dramática reducción de la hipermutación somática con un 40-75% de los transcritos de IgG totalmente exentos de mutaciones en las células B de memoria circulantes. Estudios posteriores indican que esto puede suceder en al menos el 20% de los afectados, pero no ha podido hasta el momento correlacionarse con ningún patrón clínico. Puesto que la hipermutación somática tienen lugar predominantemente en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, el defecto puede reflejar el hecho de que los centros germinales del bazo a menudo se desarrollen pobremente o se encuentren bloqueados por infiltrados granulomatosos en estos pacientes.

Otra posibilidad es que existan defectos hereditarios en la reparación del DNA que se encuentran enmascarados, y que podrían ocasionar una defectuosa hipermutación, lo que puede contribuir a un comprometido sistema de maduración de células B. Esto está respaldado por un incremento de la sensibilidad a daños por radiaciones en linfocitos de algunos pacientes con CVID, y por escrutinios clínicos que demuestran un aumento en la predisposición a padecer ciertos tipos de cáncer. La deficiencia selectiva de IgA, estrechamente relacionada con la CVID, lo está también a la ataxia-telangiectasia y al síndrome de Nijmegen, ambas son inmunodeficiencias causadas por defectos heredados en la maquinaria de reparación del ADN.

También Ghia P et al (Immunol Today 1998 Oct;19(10):480-5) encuentran mutaciones en los dos alelos del gen que codifica para la cadena subrogada ligera lambda 5/14.1 de un paciente. Kaneko H et al (Clin Exp Immunol 1998 Feb;111(2):339-44) no detectan expresión del gen Pax5 en PBLs de pacientes con linfopenia B. Este gen es indispensable para el desarrollo de las células B. Ratones deficientes en Pax5 son incapaces de producir células B maduras lo que conduce a la completa detención del desarrollo de las células B en un estado precursor. Sin embargo, CVID PBLs estimuladas con IL-2, IL-10 y anti-CD40, expresan el gen Pax5, por lo que el defecto de la expresión del gen Pax5 puede estar causado por un desorden en la regulación de la células T.

El fenotipo y función de las células B de pacientes CVID también se muestra muy heterogéneo. Un pequeño subgrupo de pacientes muestran un defecto en la señalización a través de CD40. Estos pacientes tienen elevados niveles en suero de IgM y pueden ser HIMX mal diagnosticados. Brouet JC y cols (Eur J Immunol 2000) han estudiado la subpoblación de células B de memoria en 20 pacientes (CVID). El número de células CD27⁺ B era normal o estaba aumentada en 6 pacientes (con el 95% de células B CD27⁺ en 1 paciente) y disminuido en 14 enfermos. En 13 o 15 pacientes estudiados, la molécula CD27 era detectable en menos del 50% de células B IgG o IgA positivas, indicando un defecto en la maduración de estas células de memoria. Dentro del grupo de pacientes con un bajo número de células B CD27⁺, no se consigue inducir la molécula tras la estimulación *in vitro* de células B purificadas en 3 de 5 pacientes estudiados, sugiriendo un defecto intrínseco de estas células. Estos datos confirman la heterogeneidad de los defectos inmunológicos en pacientes CVID. La defectuosa

expresión y /o función de CD27-CD70, miembros de la familia del TNF /TNF receptor, contribuyen al defecto inmunológico en la CVID.

Denz A et al, (Eur J Immunol 2000 Apr;30(4):1069-77) analizando el patrón de expresión de marcadores de activación de superficie, ven que los pacientes de tipo A muestran una reducida expresión del ligando de CD28/CTLA-4, CD86 (B7-2), y del marcador de activación CDw137 comparado con las células B de donantes sanos y de pacientes CVID que no son del tipo A. La baja expresión de CD86 correlaciona con reducidos niveles de expresión de su RNAm. Como la estimulación combinada vía BCR y CD40 no recupera los defectos de expresión de CD86 y CDw137, concluyen que las células B de los pacientes CVID tipo A presentan una incapacidad funcional para cooperar con las células T.

También se han identificado defectos en la transmisión de señales en esta subpoblación. Schwartz R et al (P Clin Diagn Lab Immunol 1999 Nov;6(6):856-60) demuestran un defecto de fosforilación de proteínas tirosinas. Sus resultados revelan dos distintos grupos de pacientes CVID. El primer grupo son pacientes (7 de 11) cuyos células B muestran bajos niveles de fosforilación de tirosin cinasas tras estimulación del BCR. En estos pacientes, la implantación de componentes de la membrana plasmática recupera los niveles de fosforilación normales así como la habilidad de secretar IgM y /o IgG tras estimulación. El segundo grupo, son los pacientes cuyas células B expresan niveles normales de fosforilación tras estimulación, sin la recuperación de la habilidad de secretar inmunoglobulinas tras implantación de la membrana plasmática y estimulación con lipopolisacáridos.

2.4.2 Linfocitos T

El mecanismo molecular responsable de este heterogéneo síndrome no ha podido aún identificarse, siendo uno de los problemas aparentemente responsable de ello el hecho de que este síndrome incluye, muy probablemente, un número variable de distintos defectos. Al menos el 30% de los pacientes son linfopénicos, siendo la subpoblación CD4⁺ la más afectada, lo que posiblemente influye en los bajos niveles de síntesis de IL-2 producida *in vitro* por células mononucleares de sangre periférica detectados en estos pacientes.

La expresión de CD154 (CD40L) en células T activadas es, por lo general, normal aunque existe en un grupo de pacientes con un defecto de inducción, implicado en defectos en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas.

La mayoría de pacientes tienen un defecto en la activación con antígeno en las linfocitos T CD4+ medido por el número de células circulantes respondedoras tras inmunización. Esto puede ser debido a un defecto en las células presentadoras de antígenos profesionales, y no en las T, ya que varios defectos en las APC han sido descritos. Puede haber un pequeño subgrupo de pacientes con defectos en el accionamiento con el complejo CD3, pero esto necesita confirmarse.

Otros pacientes presentan un patrón de elevada producción de interferón- γ por los linfocitos T circulantes, particularmente por la subpoblación CD8, elevada expresión en el número de DR CD4+, con modulación positiva en la expresión de Fas, y un incrementado ratio de apoptosis. Hay un aumentado estado de activación de monocitos circulantes que producen oxígeno reactivo, e IL-12 tras estimulación *in vitro* con lipopolisacáridos (LPS). Esto sugiere un cambio patológico hacia un tipo de respuesta Th1. La producción de el factor de necrosis tumoral TNF tanto por células T como por monocitos esta elevado en un subgrupo de pacientes con granulomas. Esas anormalidades parecen específicas de CVID y no se han visto en pacientes con ALX, que tienen la misma terapia y sufren de las mismas infecciones.

La recuperación de la producción de anticuerpos tras la infección con HIV en pacientes CVID es importante. Hay tres casos publicados, que han sobrevivido 5 años sin el tratamiento con inmunoglobulinas. Solo se ha recuperado la producción de anticuerpos IgG e IgM en estos 3 pacientes, mientras que la IgA sigue siendo indetectable. Estos casos demuestran que la CVID es potencialmente reversible mediante factores inmunoreguladores.

3

Herpesvirus saimiri (HVS)

3.1 HVS como modelo de estudio de inmunodeficiencias del linaje T

Una de las mayores dificultades en el estudio de las deficiencias de células T es la disponibilidad de un número de células adecuado y constante para poder realizar los diferentes ensayos. Hasta ahora los estudios celulares que implicaban el trabajo con células T humanas se llevaban a cabo utilizando linfocitos primarios, o líneas celulares de linfocitos T dependientes de IL-2 y a menudo, también de re-estimulaciones semanales con células alogénicas. Este sistema es, sin embargo, limitado, ya que la vida media de estas líneas celulares no es muy larga (2-6 meses) y el número de células que se obtiene siempre es finito. La immortalización de linfocitos T con el retrovirus HTLV-1 (Human T cell Leukemia Virus Type 1) eliminaba estos problemas, pero tenía en cambio, un gran inconveniente: tras una primera fase IL-2-dependiente, los linfocitos T se hacen independientes de esta citocina y pierden el receptor clonotípico, haciéndolos inútiles para el análisis funcional específico. Otro problema añadido es que el HTLV-1 sólo es capaz de immortalizar linfocitos T CD4. (Inatsuki et al 1989, Yssel et al 1989). Recientemente y, al igual que ocurre con la generación de células B transformadas por el virus de Epstein-Barr (EBV) (Swendeman y Thorley, 1987), se ha desarrollado un sistema de generación de líneas de células T transformadas con el virus *Herpesvirus saimiri* (HVS) (para una revisión Meinl y cols 1995). Este virus es un exótico miembro de la subfamilia de γ -herpesvirus, entre los que también se encuentran el virus de Epstein-Barr (EBV) y el herpesvirus humano tipo 8 (HHV8).

La infección de células T con HVS, específicamente las cepas del subgrupo C como C488, genera "*in vitro*" líneas celulares inmortales de fenotipo CD4⁺ y CD8⁺, cuyo crecimiento es continuo y estable (Biesinger y cols 1992). Las células T transformadas con HVS-C488 no producen partículas virales, tienen un crecimiento independiente de estimulación antigénica, aunque son dependientes de la adición de IL2 exógena y de que exista una alta concentración celular en cultivo, siendo su tasa de duplicación de 2-4 veces por semana. La transformación con HVS se puede realizar a partir de linfocitos T de sangre periférica, de cordón umbilical (Biesinger y cols 1992), de clones previamente establecidos, o

incluso a partir de precursores intratímicos CD34⁺ de linfocitos T (Pacheco-Castro y cols 1996). El receptor para HVS no ha sido aún identificado, pero es muy probable que sea una molécula de superficie altamente conservada y con una amplia expresión celular (45 F99).

Los linfocitos T transformados tienen un fenotipo de células T CD4⁺ o CD8⁺ maduras (expresando marcadores característicos como CD3, CD2, CD5, CD7, CD11a/CD18 (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), Weber y cols 1993); salvo en los casos donde se parte de precursores intratímicos CD34⁺, en los que se conservan fenotipos inmaduros CD4⁺ CD8⁺ (Pacheco-Castro y cols 1996). Además expresan ciertos marcadores de activación (como CD25, CD26, CD30, CD45RO, CD69, CD86 (B7.2), CD154, HLA-DR), aunque desaparecen otras moléculas de membrana (como CD28). La transformación de linfocitos T de sangre periférica con HVS es policlonal (con tendencia a la oligoclonalidad), y mantiene la presencia de casi todo el repertorio de regiones V β originales (Weber y cols 1993). Desde el punto de vista funcional, las líneas de linfocitos T transformadas con HVS mantienen intactas las señales a través del complejo TCR/CD3, tanto las de activación inmediata -movilización de calcio intracelular o los patrones de fosforilación tras estimulación (Bröker y cols 1993)- como las de activación temprana/tardía -inducción de proteínas de activación, inducción de citoquinas, citotoxicidad o respuesta proliferativa (Mittrücker y cols 1993; De Carli y cols 1993)-.

También existen cambios fenotípicos y funcionales característicos tras la infección de linfocitos T humanos con HVS. Primeramente, se ha observado la expresión "de novo" de una molécula típica de granulocitos, CD66a, miembro de la familia CEA (Götze et al., manuscrito en preparación). En segundo lugar, la tirosina-cinasa p53/56lyn, que generalmente no se expresa en células T, se encuentra enzimáticamente activa en las células T transformadas (48, 58 F99), característica compartida con las células T inmortalizadas con HTLV-1 (59F99). Tercero, HVS cambia el rango de citocinas secretado por las células T estimuladas hacia un perfil Th1; aumento de la producción de IL-2 e IFN- γ y disminución de IL-4 e IL-5 en las células T transformadas en comparación con sus células parentales (47F99). Además, muchos de estos clones secretan grandes cantidades de CC quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES, productos típicos del fenotipo Th1. Finalmente, la alteración funcional más sorprendente inducida por HVS es la hiper-respuesta tras la estimulación a través de CD2. El crecimiento autocrino de las células transformadas con HVS depende de la activación mutua

vía contactos CD2/CD58 (Mittrücker y cols 1992) y este crecimiento puede ser inhibido mediante anticuerpos anti-CD2, anti CD58 o anti-CD25.

La inmortalización con HVS se ha utilizado para estudiar y caracterizar distintas líneas celulares T o clones con especificidades frente a diversos antígenos -proteína básica de mielina, toxoide tetánico, proteínas purificadas de la tuberculina o proteínas de unión a níquel (Weber y cols 1993; Mittrücker y cols 1993)-. Recientemente se ha utilizado este modelo de transformación de linfocitos T con HVS en el estudio de la deficiencia humana de CD3 γ (Rodríguez-Gallego y cols 1996), así como en otras inmunodeficiencias primarias de linfocitos T, como la deficiencia de MHC de clase II (Zapata y cols 1998), la ataxia-telangiectasia (Rivero y cols 1997), el síndrome de Wiskott-Aldrich (Gallego y cols 1997), o inmunodeficiencias secundarias, como el SIDA (Saha y cols 1996). En todas las inmunodeficiencias primarias las líneas de linfocitos transformadas con HVS preservaron los defectos fenotípicos y funcionales descritos en sangre periférica.

3.2 Activación del linfocito T "*in vitro*"

En la actualidad es posible emular en el laboratorio la activación de las células T, y analizar posteriormente todos sus parámetros funcionales característicos. Para ello se utilizan distintos estímulos, más o menos específicos, tanto de membrana como transmembranales (Tabla). De entre los **estímulos que actúan a nivel de membrana** destacan los anticuerpos monoclonales (especificidad) dirigidos contra proteínas de la superficie de la célula T (CD3, CD2, CD28, CD69...), que permiten estudiar distintas vías de activación de forma independiente; aunque también se emplean otros agentes estimuladores menos específicos, como las lectinas vegetales fitohemaglutinina (PHA), o con canavalina A (ConA), que inducen una activación global de la célula. Dentro de este primer grupo también estaría la IL-2, una citocina que se une a su receptor y produce la división y activación del linfocito T. Los **estímulos transmembranales** más utilizados son los ésteres de forbol (ej. PMA), activador directo de la PKC; la ionomicina, un ionóforo que abre canales de calcio en la membrana o bien una combinación de ambos. La estimulación del linfocito T con ambas sustancias de forma conjunta suple todos los pasos requeridos para la activación vía complejo TCR/CD3, y pone en marcha toda la maquinaria de activación posible de cada tipo de células T.

Una vez estimuladas las células, bien a través de receptores en su membrana o bien de forma transmembranal, se pueden realizar estudios funcionales de esas células y analizar las respuestas de tipo inmediato (movilización de Ca^{2+} intracelular y fosforilación), tempranas (síntesis de citocinas y moléculas de activación) y tardías (proliferación, secreción de citoquinas).

3.3 Preguntas funcionales que se pueden hacer

Mitógeno	Respuesta en PBL	Respuesta en HVS
Anti-CD3	Proliferación Síntesis de citocinas Inducción de moléculas de activación Movilización de calcio intracelular, Activación de proteínas intracelulares	Proliferación Síntesis de citocinas Inducción de moléculas de activación, Movilización de calcio intracelular, Activación de proteínas intracelulares
IL-2	Proliferación	Proliferación
Phorbol 12- Myristate 13- Acetate	Proliferación Síntesis de citocinas Inducción de moléculas de activación, Movilización de calcio intracelular	Proliferación Síntesis de citocinas Inducción de moléculas de activación Movilización de calcio intracelular
Fitohemaglutinina	Proliferación	Citolisis
CD2	Proliferación	Proliferación
Concanavalina A	Proliferación	

Objetivos

Es probable que entre los pacientes con CVID con defectos en los linfocitos T de sangre periférica, haya dos grupos: pacientes con defectos primarios y estables de los linfocitos T y pacientes con defectos secundarios. Desgraciadamente, cada paciente es probablemente único, la disponibilidad de sangre es limitada (lo que impide hacer estudios bioquímicos) y los estudios comparativos son por ello muy difíciles. Gracias a la transformación con *Herpesvirus saimiri*, este problema se reduce enormemente, ya que las líneas así generadas, crecen indefinidamente conservando su TCR y su capacidad funcional. Los objetivos concretos fueron los siguientes

1. Transformar los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de 40 pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) utilizando *H. saimiri*, con objeto de preservar, donde existan, los defectos funcionales de dicho linaje como modelos *in vitro*.
2. Analizar fenotípicamente las líneas transformadas.
3. Analizar la inducción de proteínas de activación (CD154, CD69) y factores solubles (IL-2, TNF- α , IFN- γ), implicados en la cooperación T-B, en las líneas transformadas.
4. Diferenciar y caracterizar a los pacientes con defectos primarios de los linfocitos T.

Materialles y Métodos

1 Pacientes y controles

Un total de 40 pacientes, 17 mujeres y 23 hombres diagnosticados con CVID y 40 donantes sanos, pareados en sexo y edad, fueron incluidos en el estudio. La edad de los enfermos en el momento de la extracción de la sangre variaba desde los 11 hasta los 62 años (media = $31,2 \pm 14$). Además se incluyeron 9 pacientes ALX como controles, puesto que es una inmunodeficiencia con las mismas características clínicas que la CVID (pero con un defecto intrínseco - deficiencia de Btk- en las células B bien caracterizado) y con el mismo tratamiento. También se incluyeron 2 pacientes con Ataxia Telangiectasia.

Tabla. *Enfermos CVID que han intervenido en el estudio.*
En la tabla se muestra la clave del paciente junto con sus iniciales.

Clave	Nombre	Sexo	Edad	Edad Comienzo
1	RHE	M		
2	DRD	V	16	
3	PCP	M	41	12
4	LGM	V	21	14
5	JAR	V	26	16
6	MAI	M	49	47
7	RAL	V	15	10
8	JCG	V	24	2
9	DBP	M	44	14
10	MCC	V	19	12
11	SSA	V	25	7
12	EMA	M	21	15
13	SLM	M	13	4
14	ANZ	M		
15	VEP	V	21	15
16	JSO	V	33	12
17	CNL	M	41	13
18	AB	V	39	22
19	EMA			
20	SGA	V	40	1
21	CMC	M	35	16
22	LPP	M	32	1
23	BFP	M	40	22

24	PJGJ	V	13	1
25	PGC	V	12	4
26	DGL	V	11	1
27	CGP	M	51	31
28	CJL	V	26	1
29	MJL	M	36	7
30	PMR	V	57	46
31	DPR	V	12	5
32	JPA	V	22	14
33	DSR	M	62	52
34	ASM	M	44	37
35	MLS	M	57	8
36	RMG	V	31	18
37	DAM	V	24	12
38	RBM	V	42	17
39	ACL	M	39	13
40	SMG	V		

1.1. Clínica

Se incluyó en el grupo a todos aquellos pacientes de acuerdo con el criterio diagnóstico del grupo de expertos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (Clin Exp Immunol 1999; 118: 1-28). En 11 pacientes (5 hombres -Nº 5, 10, 20, 31, 37- y 6 mujeres - 6, 17, 22, 27, 33, 39-) fueron detectados autoanticuerpos y 9 pacientes (4 hombres - 11, 15, 30, 38- y 5 mujeres - 3, 17, 22, 27, 33-) padecían enfermedades de tipo autoinmune.

1.2 Inmunología

Todos los pacientes presentaban en el momento del estudio defectos en alguno de los distintos subtipos de inmunoglobulinas (Tabla). Concretamente, todos los pacientes excepto uno (número 6) poseían valores de IgG inferiores al rango de normalidad y absolutamente todos presentaban niveles de IgA por debajo de los niveles normales. Sin embargo, 6 pacientes eran capaces de producir niveles de IgM comparables a los normales.

Tabla. Niveles de inmunoglobulinas (mg/dL) en pacientes COVID.

Los rangos de normalidad de las inmunoglobulinas eran los siguientes:

IgG = 1004 ± 267 (520-1740)

IgA = 178 ± 66 (77-362)

IgM = 155 ± 76 (79-231)

Clave	IgG	IgA	IgM	IgE	Clave	IgG	IgA	IgM	IgE	Clave	IgG	IgA	IgM	IgE
1					14					27	230	5	13	2
2					15	316	14	26	2	28	120	12	6	3
3	74	5	12	2	16	128	9	13	35	29	110	5	7	2
4	75	5	7	2	17	108	5	17	2	30	282	5	9	5
5	417	7	47	2	18	308	5	16	22	31	450	43	29	23
6	580	100	101	35	19					32	156	5	27	2
7	363	5	45	2	20	485	12	40	2	33	169	9	17	2
8	402	38	17	85	21	102	5	8	2	34	32	5	91	2
9	370	47	91	2	22	14	6	11	2	35	14	5	18	2
10	33	5	92	2	23	194	5	6	2	36	343	35	15	2
11	2	5	77	2	24	115	17	67	8	37	34	5	5	2
12	369	5	76	2	25	447	55	65	45	38	284	5	23	2
13	191	10	20	2	26	480	48	37	2	39	55	5	13	2
										40				

Aunque solamente 5 pacientes presentaban linfopenia (6, 21, 22, 36, 38), el número absoluto de linfocitos T CD3⁺ estaba por debajo de los valores normales (1224-1646) en todos los pacientes excepto en 14 de ellos. Aún más, los linfocitos cooperadores CD4⁺ (723-1124) estaban disminuidos también en todos excepto en 9 pacientes (Tabla).

Tabla. Fenotipo y función de las células mononucleares de sangre periférica de los enfermos COVID.

Clave	Linfocitos	CD3	CD4	CD19	Proliferación
1					
2					
3	950	693	237	95	NORMAL
4	1840	1435	423	110	NORMAL
5	1220	817	525	244	NORMAL
6	860	560	480	170	NORMAL

Materiales y Métodos

7	1820	1670	940	80	BAJA
8	1280	537	230	460	BAJA
9	1500	1080	420	90	NORMAL
10	1000	640	100	120	BAJA
11	3170	2560	507	190	BAJA
12	2370	1960	1208	71	NORMAL
13	2110	1666	928	63	BAJA
14					BAJA
15	1200	720	324	84	BAJA
16	2310	947	485	1224	NORMAL
17	1590	1080	700	238	NORMAL
18	1510	1230	498	166	BAJA
19					
20	2700	2079	1160	162	NORMAL
21	630	491	233	25	NORMAL
22	750	540	135	52	NORMAL
23	1320	990	448	53	BAJA
24	3600	2590	1190	720	NORMAL
25	2280	1846	616	182	BAJA
26	2500	1375	800	150	NORMAL
27	1460	1124	423	160	NORMAL
28	1500	1155	645	105	NORMAL
29	1530	1254	200	183	NORMAL
30	2690	2205	915	215	NORMAL
31	1830	1170	421	240	BAJA
32	1370	960	397	260	NORMAL
33	1100	760	550	110	BAJA
34	2240	1433	716	710	NORMAL
35	1720	1220	240	103	NORMAL
36	380	296	216	38	NORMAL
37	1100	836	253	143	NORMAL
38	740	622	363	30	BAJA
39	3200	2496	1120	352	NORMAL
40					

2 Transformación de linfocitos T con *Herpesvirus saimiri*

2.1 Obtención de sobrenadante infectivo de HVS

Para generar el sobrenadante infectivo de HVS, un cultivo de células OMK (fibroblastos de mono aullador, susceptibles de ser lisados por el virus), previamente cultivado en medio MEM (*Gibco BRL*) suplementado con 1% Glu, 1% Ab, 1% y 20% FCS, se infectó con un medio que ya contenía el virus (cedido originalmente por B. Fleckenstein). Este cultivo se mantuvo en medio BME (*BioWhitaker*) suplementado con 1% Glu, 1% Ab, 1% de aminoácidos esenciales y 20% FCS hasta que la monocapa característica de este tipo de cultivos estaba completamente lisada (10-15 días). El sobrenadante del cultivo lisado, rico en partículas virales, fue utilizado como fuente de HVS en sucesivas infecciones, tanto de linfocitos T como de células OMK (para generar más sobrenadante infectivo). El sobrenadante se mantuvo siempre a 4°C no más de 6 meses desde su obtención, fecha en que se preparó un nuevo lote.

2.2 Infección de linfocitos aislados de sangre periférica con sobrenadante HVS.

Los linfocitos de sangre periférica obtenidos se resuspendieron en medio CG-RPMI (proporción 1/1; *Vitromex* y *Gibco BRL* respectivamente) suplementado con 1% Glu, 1% Ab, 10% FCS, 40 UI/ml de rIL2 (donada por *Hoffmann-LaRoche*) y 1% PHA (*Sigma*), a una concentración final de $1-2 \times 10^6$ células/ml. El mismo día del aislamiento se añadió a cada mililitro de suspensión celular otro mililitro de sobrenadante infectivo del virus (1/1), dejándose las células en cultivo -en placas de 24p (*Costar*)- durante 7 días sin retirar el medio. Pasado este tiempo los cultivos fueron cambiados periódicamente (cada 3-4 días) con el mismo medio CG-RPMI arriba descrito, pero en ausencia de PHA. Las células, en todos los casos, se mantuvieron a una concentración óptima de crecimiento de 1×10^6 células/ml. En paralelo, y como control de infección, se generaron cultivos en las mismas condiciones de crecimiento, que no fueron expuestos al virus. La muerte de los cultivos no infectados (control de infección) frente a la supervivencia de los expuestos al virus y la adquisición de morfología linfoblastoide en las células expuestas fueron los criterios elegidos para considerar inmortalizada una línea (Pacheco-Castro y cols 1995).

3 Caracterización fenotípica

3.1 Fenotipo Básico: Citometría

Para la detección de moléculas linfocitarias se utilizaron los anticuerpos monoclonales listados en la Tabla (X). La expresión de los distintos marcadores linfocitarios, de superficie o intracelulares, se analizó mediante técnicas de citometría de flujo tal y como se describe en los puntos 3.1.- y 3.2.-. Todas las tinciones, tanto de PBL como de linfocitos transformados con HVS, se llevaron a cabo de la misma manera. La cuantificación del marcaje de superficie o intracelular se realizó por citometría de flujo en un citómetro EPICS ELITE (*Coulter, Hialeah, FL*). Las células se seleccionaron por criterios de tamaño /complejidad para eliminar las no viables, analizándose 10.000 células por muestra. Se consideraron positivas todas las células con intensidades de fluorescencia por encima del límite superior de los correspondientes controles negativos (anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo y especie que los empleados para la tinción). Los resultados se representaron en histogramas de intensidad fluorescencia uni- o bidimensionales. En los primeros, las abscisas representan la intensidad de fluorescencia en una escala logarítmica, y las ordenadas representan el número de células en unidades arbitrarias. En el caso de análisis de dos colores, las abscisas representan la intensidad de fluorescencia verde y las ordenadas la intensidad de fluorescencia roja.

Tabla. Anticuerpos monoclonales empleados en el presente trabajo para el análisis fenotípico y funcional mediante citometría de flujo. En todos los casos se añadieron 10 μ l de anticuerpo por cada millón de células.

Especificidad	Nombre	Tipo /Dilución
CD3 $\epsilon\delta+$ $\epsilon\gamma$	Leu4	50 μ g /ml
CD4	Leu3a	50 μ g /ml
CD8a	Leu2a	50 μ g /ml
CD69	Leu23	25 μ g /ml
CD154		50 μ g /ml
IL-2	Anti-human IL-2	25 μ g /ml
TNF- α	Anti-human	25 μ g /ml
IFN- γ	Anti-human	25 μ g /ml

3.1 Tinciones Extracelulares

Las células se lavaron 2 veces con PBS- 1% FCS y se resuspendieron a una concentración final de 1×10^6 células /ml en la misma solución, antes de dispensar 100 μ l de suspensión a cada uno de los pocillos de una placa de 96p con fondo en V (Costar). A continuación se centrifugaron las placas a 1.400 rpm durante 10 minutos y a 4°C y se decantó finalmente el sobrenadante. Posteriormente se añadieron a cada pocillo las cantidades adecuadas del correspondiente anticuerpo monoclonal, se resuspendieron las células cuidadosamente, y se incubaron de este modo durante 30-40 minutos a 4°C y protegidas de la luz. Tras la reacción de marcaje, y para los anticuerpos previamente conjugados con un grupo fluorescente –FITC y /o PE-, las células se lavaron otras 2 veces con PBS-1% FCS, se resuspendieron en 500 μ l de PBS-1% formaldehído y se analizaron finalmente por citometría de flujo.

3.2 Tinciones Intracelulares

Todos los marcajes intracelulares se llevaron a cabo en tubos Eppendorf (*Labclinics*) de 1,5 ml. Las células se lavaron en PBS a temperatura ambiente y se resuspendieron en la misma solución a una concentración final de 5×10^6 células /ml, antes de dispensar 5×10^5 células /tubo, y volver a lavar de la misma manera. Tras decantar los sobrenadantes, las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS-4% formaldehído y se incubaron de este modo durante 20-30 min a temperatura ambiente. A continuación se permeabilizaron las células lavando los tubos 2 veces con PBS-0,1% saponina (*Sigma*) resuspendiéndolas en 100 μ l de PBS-1% saponina, y finalmente se incubaron con las cantidades adecuadas de los correspondientes anticuerpos durante 30-40 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz. De forma similar a las tinciones extracelulares, tras la reacción de marcaje, y para los anticuerpos previamente conjugados con un grupo fluorescente –FITC o PE-, las células se lavaron otras 2 veces con PBS-0,1% saponina, se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se analizaron finalmente por citometría de flujo

4 Análisis funcionales

4.1 Inducción de proteínas de activación

Para realizar los análisis de inducción de proteínas de activación en las células transformadas con HVS, éstas se mantuvieron previamente en medio CG-RPMI, sin rIL2 ni suero, durante toda la noche anterior al experimento (día previo al correspondiente cambio de medio). Posteriormente se resuspendieron en medio CG-RPMI sin rIL2 a una concentración de 500.000 células /ml, se añadieron 200 µl de la suspensión celular en placas de 96 pocillos con fondo en U en ausencia o en presencia de 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (IOT3b) inmovilizado o PMA (10 ng/ml, *Sigma*) más ionomicina (750 ng/ml, *Sigma*), y se incubaron durante 9 horas, (para la determinación de CD69 y CD40L).

En el caso de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (IOT3b, *Immunotech*), se adsorbió previamente el anticuerpo monoclonal a la placa. Para ello se resuspendió el anticuerpo monoclonal anti-CD3 a la concentración de trabajo en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8 estéril, se añadieron 50 µl por cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U y se incubó durante 8 h a 4 °C, guardándose después a -20°C hasta el momento de su utilización. Antes de añadir las células a los pocillos con anti-CD3 inmovilizado se realizaron 3 lavados con medio RPMI (añadiendo 200 µl/pocillo y decantando posteriormente).

Tras la activación, se lavaron las células dos veces con PBS (centrifugación a 1200 rpm, 4 °C, 8 min) y se realizó la tinción con anticuerpos anti-CD154 y anti-CD69 como se indica en el apartado 3.1. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo.

4.2 Inducción de citocinas

Al igual que en los casos anteriores, para la inducción de citocinas las células transformadas con HVS se mantuvieron previamente en medio CG-RPMI, sin rIL2 ni suero, durante toda la noche previa al experimento. Las células T transformadas con HVS fueron resuspendidas en medio CG-RPMI, sin r-IL2 ni suero, a una concentración de 500.000 células/ml, se añadieron 200 µl de esta suspensión celular en placas de 96 pocillos en fondo en U en ausencia o en presencia de 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (IOT3b) inmovilizado (como se indica en el apartado 4.1) o PMA (10 ng/ml, *Sigma*) más ionomicina (750 ng/ml, *Sigma*), y se incubaron durante 9 h a 37 °C. A las dos horas del inicio de la incubación se

añadieron 2 $\mu\text{g/ml}$ de Brefeldina A (*Sigma*) en cada pocillo con el fin de bloquear el transporte intracelular y acumular las citocinas sintetizadas. Tras la activación, se pasaron las células a tubos Eppendorf (*Labclinics*), se lavaron dos veces con PBS (centrifugación a 1.200 rpm, 4 °C, 8 min), y se fijaron con 500 μl de PBS con formaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Por último se realizaron los marcajes intracelulares con anticuerpos anti-IL2 y anti-TNF α conjugados con PE y FITC respectivamente, o con anti-IFN- γ conjugado con PE, tal y como se indica en el apartado 3.2. Posteriormente se analizaron las muestras por citometría de flujo.

Resultados

Obtención y caracterización fenotípica de células T de pacientes con CVID transformadas con HVS

Tras la exponer las células mononucleares de sangre periférica de 40 pacientes diagnosticados con CVID y de 40 individuos sanos a *Herpesvirus saimiri* (HVS) en las dos diferentes condiciones de cultivo expuestas anteriormente en Materiales y Métodos (Pág.), se obtuvieron 59 y 66 líneas puras de células T transformadas con HVS, respectivamente (Tabla I). El análisis mediante inmunofluorescencia del inmunofenotipo de las células T transformadas de pacientes con CVID indicó que el porcentaje y la intensidad de la expresión en la superficie celular del complejo TCR/CD3 y de CD4 o CD8 era comparable al de las células T transformadas de individuos normales (¿TABLA?).

Tabla X. Distribución fenotípica en líneas T transformadas con *Herpesvirus saimiri* procedentes de distintas muestras^a

Fenotipo	CVID (n=59)	AT (n=26)	AXL (n=9)	Normales (n=66)
CD4 ⁺	27 *	8	0	3
CD8 ⁺	73 *	92	100	97

^a Porcentaje de líneas T transformadas con fenotipo CD4⁺ o CD8⁺ obtenidas de los cultivos celulares indicados entre paréntesis. CVID = Inmunodeficiencia común variable. AT= Ataxia telangiectasia. XLA = Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. * $p= 2 \times 10^{-5}$ vs. normales (Test exacto de Fischer). Solo se resaltan diferencias estadísticamente significativas.

El análisis fenotípico de nuestras líneas reveló, inesperadamente, una proporción significativamente mayor de líneas T CD4⁺ y una menor proporción de líneas CD8⁺ T comparado con las líneas obtenidas de individuos sanos (27% vs. 3%, 73% vs. 97%). Para saber si este inesperado resultado era específico para las células de individuos inmunodeficientes, transformamos células de otras dos inmunodeficiencias no relacionadas y que también presentan una deficiencia de anticuerpos, pero que a diferencia de la CVID se conocen las mutaciones primarias responsables de la enfermedad: ataxia telangiectasia (AT)¹ y la agammaglobulinemia ligada a X² o enfermedad de Bruton (XLA). No se observaron diferencias entre la proporción de líneas de células T CD4⁺ o CD8⁺ T de estas dos inmunodeficiencias cuando se compararon con los controles. Los resultados pueden reflejar una ventaja de las células T CD4⁺, o una desventaja de las T CD8⁺, dentro de un significativo grupo (27%) de pacientes con CVID, que únicamente se pondría de manifiesto tras la exposición al *Herpesvirus saimiri* en nuestras particulares condiciones de cultivo.

¹ La **ataxia-telangiectasia** es un trastorno neuroinmunológico progresivo, de herencia autosómica recesiva, causado por mutaciones en el gen ATM (AT mutated) situado en el cromosoma 11, que codifica una proteína que interviene en la transducción de señales, regulación del ciclo celular, reparación del ADN y procesos de recombinación somática. Los síntomas, que aparecen a partir de los 2 años, consisten en ataxia cerebelar progresiva, telangiectasia en ojos y orejas e infecciones sinopulmonares recurrentes. La incidencia es de 1:40.000. Los linfocitos sufren frecuentemente roturas, inversiones y translocaciones en los complejos de genes del TcR y de las inmunoglobulinas de los cromosomas 7 y 14 respectivamente, mientras que en los fibroblastos ocurre al azar. Por esto, y aunque no existe un patrón inmunológico único, por regla general, los individuos afectados presentan deficiencias en la función de los linfocitos T y el 40% de los pacientes desarrollan defectos en la inmunidad humoral, como deficiencias IgA o deficiencias de los isotipos IgG2-IgG4. Asimismo, el 95 % de los pacientes tienen una concentración elevada de α -fetoproteína, que es síntoma de un defecto de formación y maduración de órganos. El defecto génico (más de 150 mutaciones identificadas; todas únicas) afecta a una proteína que interviene en la reparación del ADN, ya que las células de estos enfermos presentan una gran susceptibilidad a las mutaciones provocadas por radiaciones ionizantes.

² La **deficiencia de Btk** es una inmunodeficiencia caracterizada por la ausencia o profunda disminución de los niveles de inmunoglobulinas en el suero y del número de linfocitos B circulantes. La enfermedad tiene una frecuencia de 1:50.000 a 1:100.000 habitantes. El defecto génico último, localizado en la porción media del brazo largo del cromosoma X (Xq21.3-22), radica en un gen que codifica para una proteína tirosin cinasa ubicua denominada Btk (*Bruton's agammaglobulinaemia tyrosine kinase*). La carencia de esta proteína, necesaria para la expansión de las células B en un punto crítico de su maduración, afecta el desarrollo del linaje B de tal forma que aún existiendo células pro-B, hay muy pocas células pre-B (con cadena μ intracitoplasmática) y estas son incapaces de diferenciarse hacia células B maduras, lo que en definitiva implica la ausencia de gammaglobulinas por la falta de células productoras de anticuerpos. El desarrollo de los linfocitos T, los monocitos y los granulocitos no se encuentra afectado. Los primeros síntomas consisten en infecciones bacterianas repetidas, otitis, bronquitis, neumonía, meningitis, conjuntivitis y ocasionalmente dermatitis y malabsorción. Existe una forma de agammaglobulinemia que se hereda de forma autosómica recesiva en la que cerca de la mitad de los pacientes tienen mutaciones en el gen de la cadena pesada μ o en el gen λ 5/14.1 y no en el gen de la Btk.

Inducción de moléculas de superficie en líneas HVS CD4⁺

Los linfocitos T se comunican con otras células del sistema inmune mediante la expresión *de novo* de moléculas en su superficie, así como mediante la generación de factores solubles como lo son las citocinas. Tras la activación del linfocito T a través de su complejo TcR/CD3 se produce la inducción de dichas moléculas de superficie.

Una de estas moléculas es CD154, antes denominada CD40L, la cual está implicada en la cooperación de los linfocitos T con los linfocitos B, y es decisiva en la maduración y diferenciación de las células B a células plasmáticas o productoras de anticuerpos así como del cambio de isotipo. La activación directa de CD154 genera señales coestimuladoras que regulan la producción de IL4 (Vilcek J et al, 1991) y la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) (Malinin NL et al, 1997). CD154 interacciona con la molécula CD40 presente en la superficie de los linfocitos B (Clark EA et al, 1994) promoviendo la activación de los linfocitos B (incluyendo la expresión de CD23), diferenciación y switch de Igs por parte de éstos (Lederman SM et al, 1992b). CD154 es una molécula de 33 kDa expresada en linfocitos T CD4⁺ y algunos CD8⁺ activados, monocitos, células NK, mastocitos y basófilos. Es una glicoproteína de membrana tipo II con una secuencia homóloga a TNF α y una estructura terciaria similar al trímero TNF α . El estudio de CD154 (CD40L) era de gran interés ya que un defecto en su expresión podría explicar en parte la deficiencia en la producción de inmunoglobulinas típica de estos pacientes.

Por lo tanto, lo siguiente que nos propusimos fue comparar la capacidad intrínseca de un número de líneas celulares puras de pacientes con CVID con líneas T puras de individuos normales tanto HVS CD4⁺ como CD8⁺ T para generar tales señales *in vitro* en respuesta tanto a estímulos de membrana (anti-CD3) y transmembranales (PMA + Ionomicina).

Asimismo, la expresión de CD154 induce la delección clonal de células B cuyo receptor ha sido desensibilizado por estimulación con antígenos propios o por no unirse antígeno al receptor de la célula B (Rathmell JC et al, 1996).

Cuando analizamos la inducción de CD154 en todas las líneas T CD4⁺ disponibles, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las líneas HVS CD4⁺ normales y HVS CD4⁺ de pacientes con ninguno de los estímulos utilizados (Figura 1).

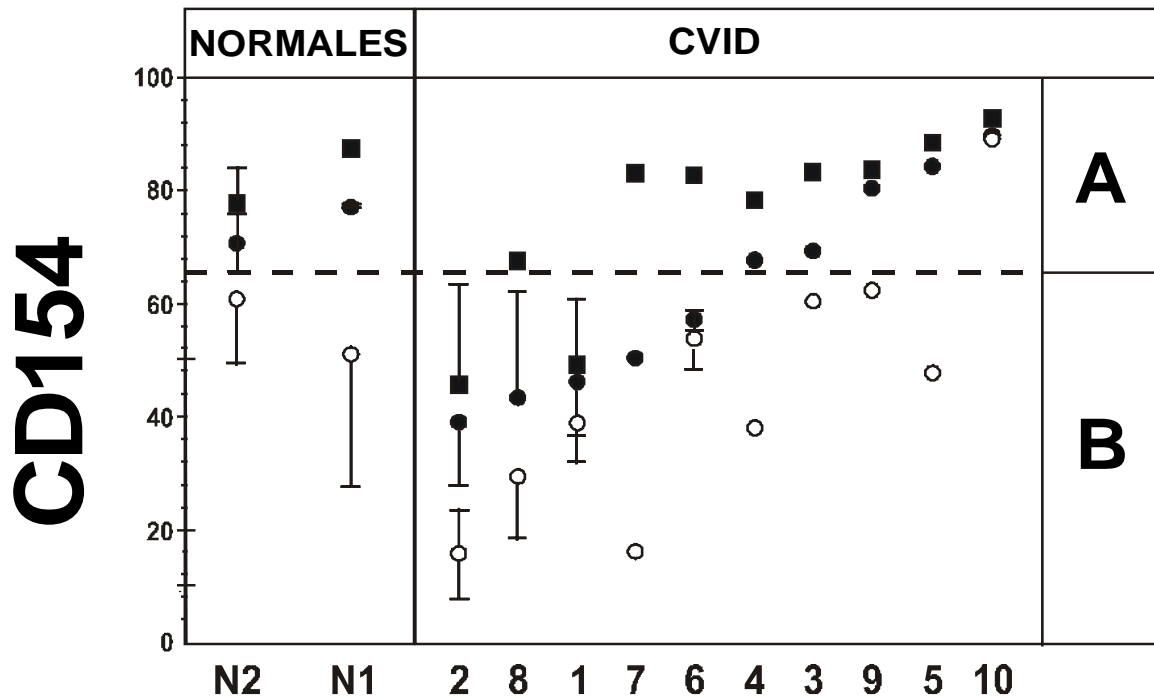


Figura 1.- Porcentaje de células HVS CD4⁺ CD154 positivas en dos individuos normales y 10 pacientes CVID ordenados de menor a mayor en respuesta a la estimulación con anti-CD3. Las células fueron analizadas sin estimular (○) o estimuladas durante 9h en la presencia de anti-CD3 (●) o PMA+ION (■). Cuando el experimento fue repetido (normalmente tres veces), se representa la media \pm DS. La línea discontinua representa el límite inferior de respuesta obtenido en las líneas normales tras estímulo con anti-CD3.

Sin embargo, observamos que la mitad de nuestros pacientes (5 de 10) estaban por debajo de la expresión mínima de CD154 obtenida en las células HVS CD4⁺ de individuos normales tras la estimulación con anti-CD3 (línea discontinua en la Figura 1).

De acuerdo con esto, agrupamos nuestros pacientes en dos grupos diferentes *a)* aquellos en los que la inducción de CD154 tras estimulación con anti-CD3 era similar a la obtenida en el grupo de individuos normales (A de altos respondedores en las Figuras 1 y 2), y en los que el valor medio de expresión tras el estímulo membranal era de un 78% comparado con un 73,6% de expresión en las células transformadas CD4⁺ de individuos normales y *b)* aquellos cuya respuesta estaba por debajo del límite indicado (B de bajos

respondedores en las Figuras 1 y 2), valor medio de expresión 46.8% comparado con la expresión en las células de individuos normales 73,6%. Una diferencia altamente significativa apareció entre el subgrupo de CVID B y los otros dos subgrupos (A CVID pacientes o controles normales (Figura 2).

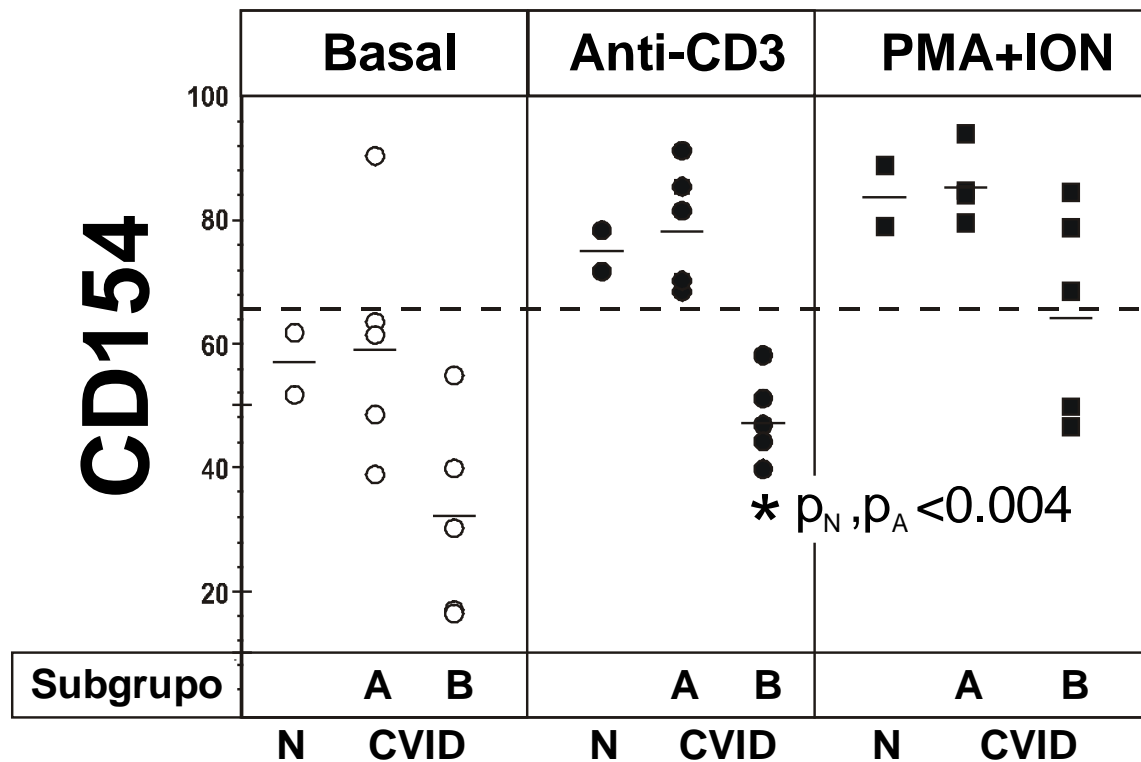


Figura 2.- Mismos datos que en la Figura 1, agrupados por el grado de respuesta a la estimulación con anti-CD3. Los pacientes con una respuesta por debajo o por encima del límite inferior de respuesta obtenido en los individuos normales (línea discontinua en la Figura 1) fueron agrupados como B (Bajos) o A (Altos) respondedores. Las pequeñas líneas horizontales representan la media estadística de células HVS CD4⁺ CD154 positivas para cada grupo o subgrupo. La significación estadística en todas las comparaciones realizadas entre grupos y subgrupos era mayor de 0.05 excepto donde se indica (B vs N, $p_N=0.004$; B vs A, $p_A=0.0004$; B vs N+A, $p_{N+A}=0.0001$). Con objeto de incrementar el número de controles dos líneas de células AT transformadas (previamente demostrada su normalidad en la inducción de CD154 [45]) fueron incluidas en el análisis (B vs N+AT, $p_{N+AT}=0.0005$)

Estos resultados sugieren la existencia de un subgrupo de pacientes con CVID (B) con un defecto intrínseco en la inducción de CD154 a través de CD3. Este defecto funcional impide a una significativa fracción de las células T CD4⁺ modular positivamente CD154 tras la estimulación a través de CD3 (Fig. 2), sin embargo, atendiendo a la intensidad de fluorescencia media (MFI = Mean Fluorescence Intensity) obtenida en las tinciones, las

células capaces de inducir esta molécula de superficie consiguen alcanzar niveles de expresión comparables a los conseguidos por las células CD4⁺ transformadas de individuo normales. (Figura 3 y datos no mostrados).

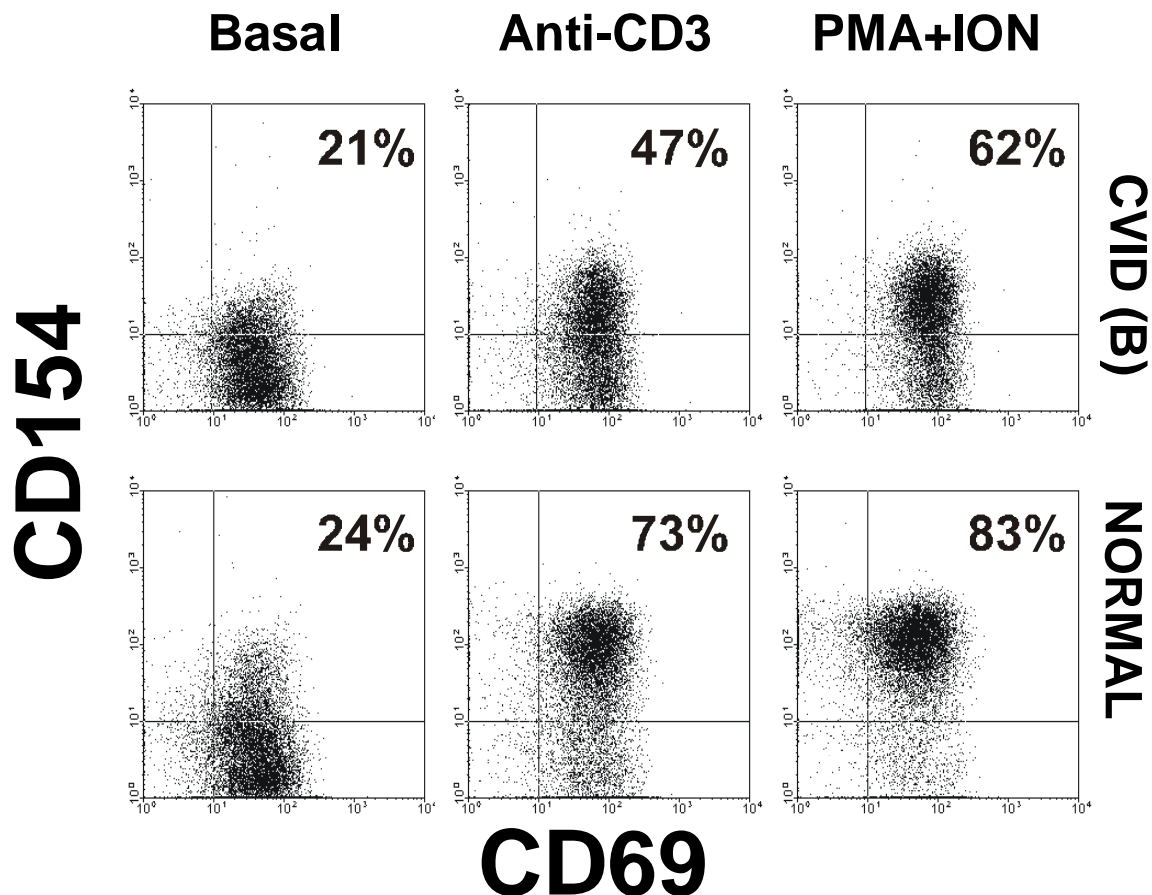


Figura 3.- Dot plots representativos de un análisis mediante citometría de flujo en dos colores con anti-CD154-PE y anti-CD69-FITC en células HVS CD4⁺ del paciente número 2 (subgrupo B) comparadas con las células HVS CD4⁺ de un donante sano (Normal número 1), tanto sin estimular como estimuladas.

Con objeto de explorar si el defecto observado era específico para CD154, analizamos la inducción de otra molécula utilizada como marcador de activación, denominada CD69. CD69 es una molécula perteneciente a la superfamilia de las lectinas animales tipo C. Es el antígeno inducible que más temprano aparece tras la activación de los linfocitos T con una amplia variedad de estímulos. No se detecta en linfocitos de sangre periférica en reposo y aparece tan solo 30-60 minutos después de su estímulo. La regulación a nivel genético es aun más rápida y, como ocurre con otros genes inmediatos, el gen CD69 tiene una expresión rápida y transitoria seguida de una degradación prácticamente instantánea a nivel de ARNm.

No se conoce ligando fisiológico de CD69. Tal y como estaba descrito previamente (38), CD69 se expresa constitutivamente en las células T transformadas, y en contraste con CD154, solo se induce levemente tras estimulación (Figs. 3 y 4). No encontramos diferencias estadísticamente significativas ni en los niveles de expresión (MFI) ni en los de inducción (%) de CD69 entre los pacientes CVID o cualquiera de los subgrupos (Fig. 4). Por lo tanto, el defecto observado en el grupo denominado CVID B era específico para CD154.

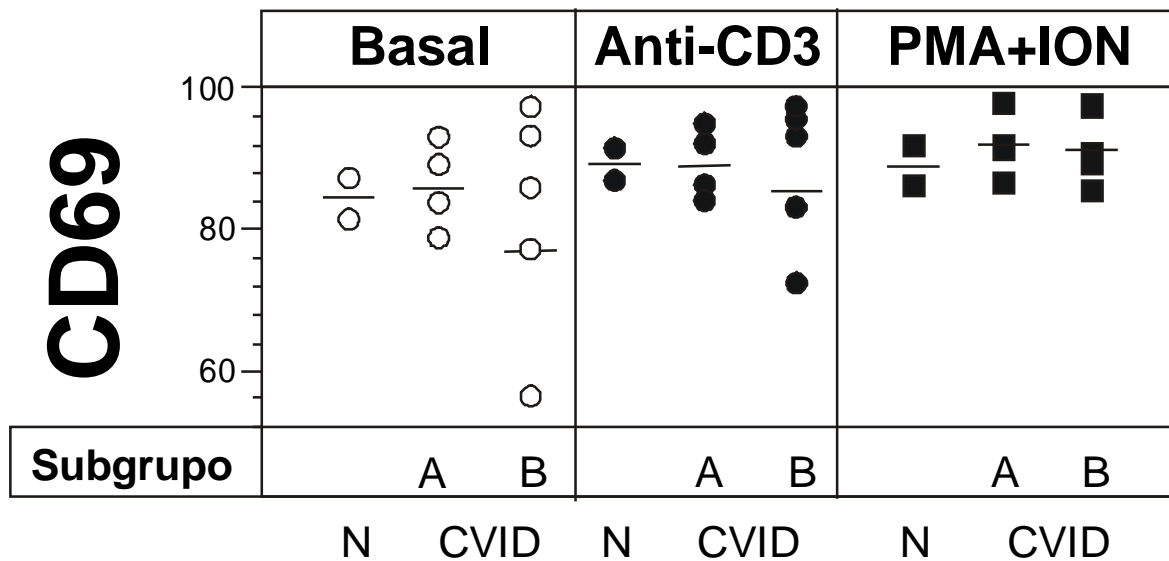


Figura 4.- Porcentaje de células HVS CD4+ CD69 positivas agrupadas en Normales (N) y pacientes CVID como en la Figura 2.

El bajo número de líneas de células T HVS CD4+ normales disponibles (aunque ampliamente analizadas, *Ver pie de la Figura 2*) y el hecho de que la muestra de líneas HVS CD4+ procedentes de pacientes no mostrasen, como grupo, diferencias significativas en la inducción de ninguna de las moléculas de superficie cuando se compararon con los controles, impone un cauteloso análisis de los datos obtenidos.

Inducción de moléculas de superficie en líneas HVS CD8⁺

A continuación realizamos un estudio similar en 15 líneas de células T HVS CD8⁺ (Fig. 5), puesto que previamente se habían descrito defectos funcionales en las células T CD8⁺ de algunos pacientes con CVID (29) y sabíamos que CD154 puede expresarse en células Tc (48).

Tal y como sucedió con las líneas de células HVS CD4⁺, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las líneas de células T HVS CD8⁺ normales y las de los pacientes con CVID (Fig. 5). En cualquier caso, los resultados obtenidos mostraban un patrón de expresión en las líneas HVS CD8⁺ completamente distinto del de las líneas HVS CD4⁺. Tanto las células normales como las células CVID CD8⁺ mostraron un amplio rango de inducción para la molécula CD154 (desde menos del 5% hasta un 80% con alguno de los estímulos utilizados). Esto impidió establecer subgrupos de alta o baja expresión (A o B), puesto que el límite más bajo de expresión en las líneas normales sería menor del <5%.

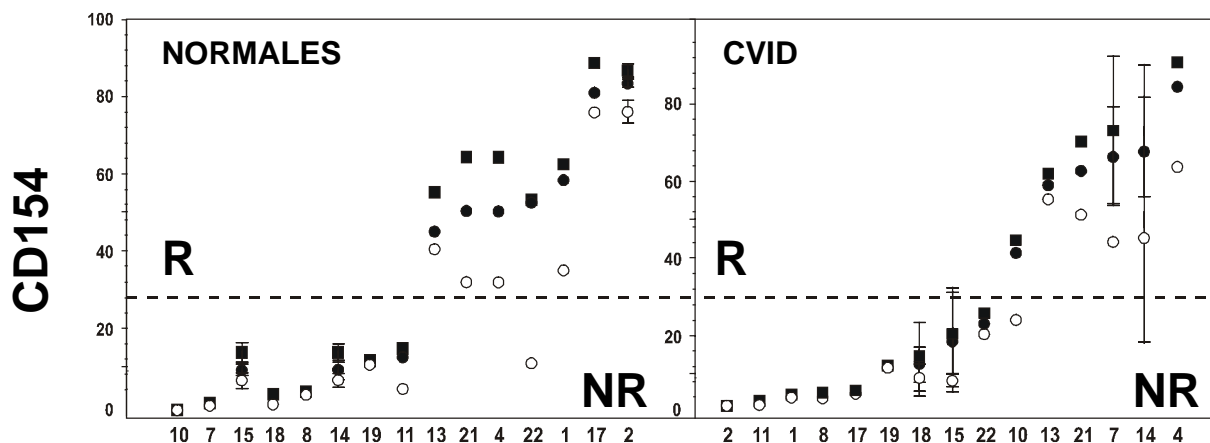


Figura 5.- Porcentaje de células HVS CD8⁺ CD154 positivas en 15 pacientes CVID y 15 controles sanos, pareados en sexo y edad, ordenados de menor a mayor en respuesta a la estimulación con anti-CD3. Los números en el eje de abscisas representan el n° de paciente (algunos de los cuales también están en la Figura 1) y su control respectivo. Las células fueron analizadas sin estimular (○) o estimuladas durante 9h en la presencia de anti-CD3 (●) o PMA+ION (■). Cuando el experimento fue repetido (normalmente tres veces), se representa la media ± DS. La línea discontinua define arbitrariamente el límite entre respondedores (R) y no respondedores (NR) en la expresión de CD154.

En contraste, pudimos establecer dos subgrupos dentro de las líneas normales y las de pacientes CVID, *a*) aquellos cuyo tanto por ciento de expresión de CD154 era muy bajo antes y después de la estimulación (por debajo de la línea discontinua establecida arbitrariamente en la Fig. 5), y que denominamos No Respondedores (NR), y *b*) aquellos que expresaban basalmente y tras estimulación CD154 (por encima de la línea discontinua establecida arbitrariamente en la Fig. 5), denominados Respondedores (R). No se detectaron diferencias significativas en la inducción de CD154 entre las líneas HVS CD8⁺ de donantes sanos y las de los pacientes en ninguno de los dos subgrupos establecidos R (o NR) (Fig. 6), aportando solidez a los datos encontrados en las líneas CD4⁺.

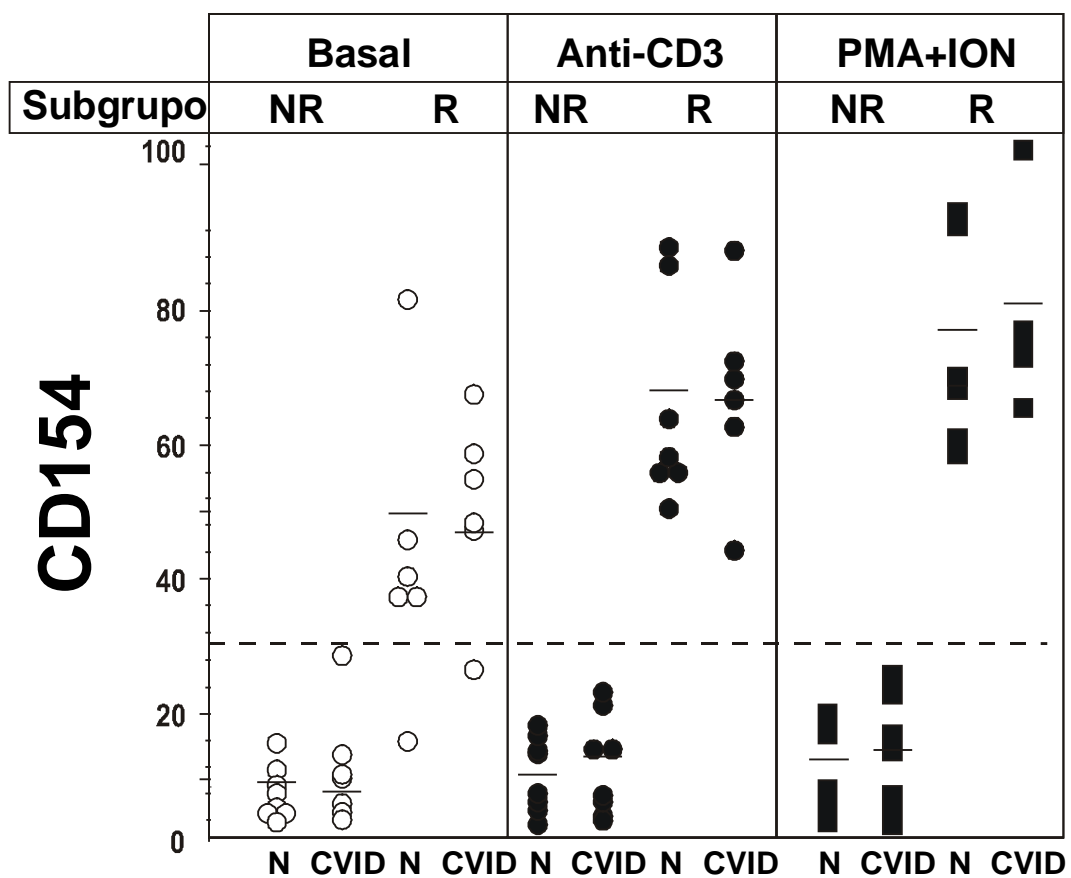


Figura 6.- Mismos datos que en la Figura 5, agrupados por el tipo de respuesta a la estimulación con anti-CD3 (NR o R, ver Fig. 5). Las pequeñas líneas horizontales representan la media estadística de células HVS CD8⁺ CD154 positivas para cada grupo o subgrupo. La significación estadística en todas las comparaciones realizadas entre grupos y subgrupos era mayor de 0.05

El análisis de la expresión e inducción de CD69 en las líneas de células T HVS CD8⁺ no reveló ninguna tendencia en el subgrupo NR de los pacientes ni tampoco en los normales (Fig. 7), apoyando la idea de que el estado en el subgrupo NR es específico para CD154 en las líneas CD8⁺ (pero no en las CD4⁺).

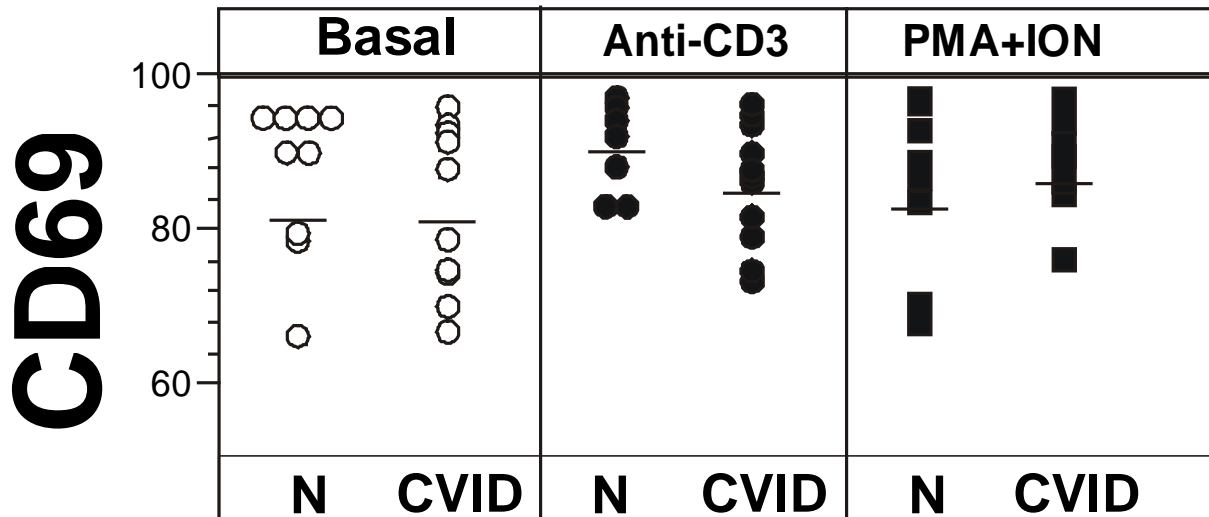


Figura 7.- Porcentaje de células HVS CD8⁺ CD69 positivas agrupadas en Normales (N) y pacientes CVID como en la Figura 6.

El análisis de CD69 reveló, al igual que fue observado en las líneas CD4⁺, que se expresa constitutivamente y únicamente se induce ligeramente tras estimulación, tal y como se observa en las líneas HVS. El análisis de inducción en dos colores de CD154 y CD69 en las células del subgrupo R demuestran que no existen diferencias distinguibles entre las normales y las de los pacientes con CVID (Fig. 8).

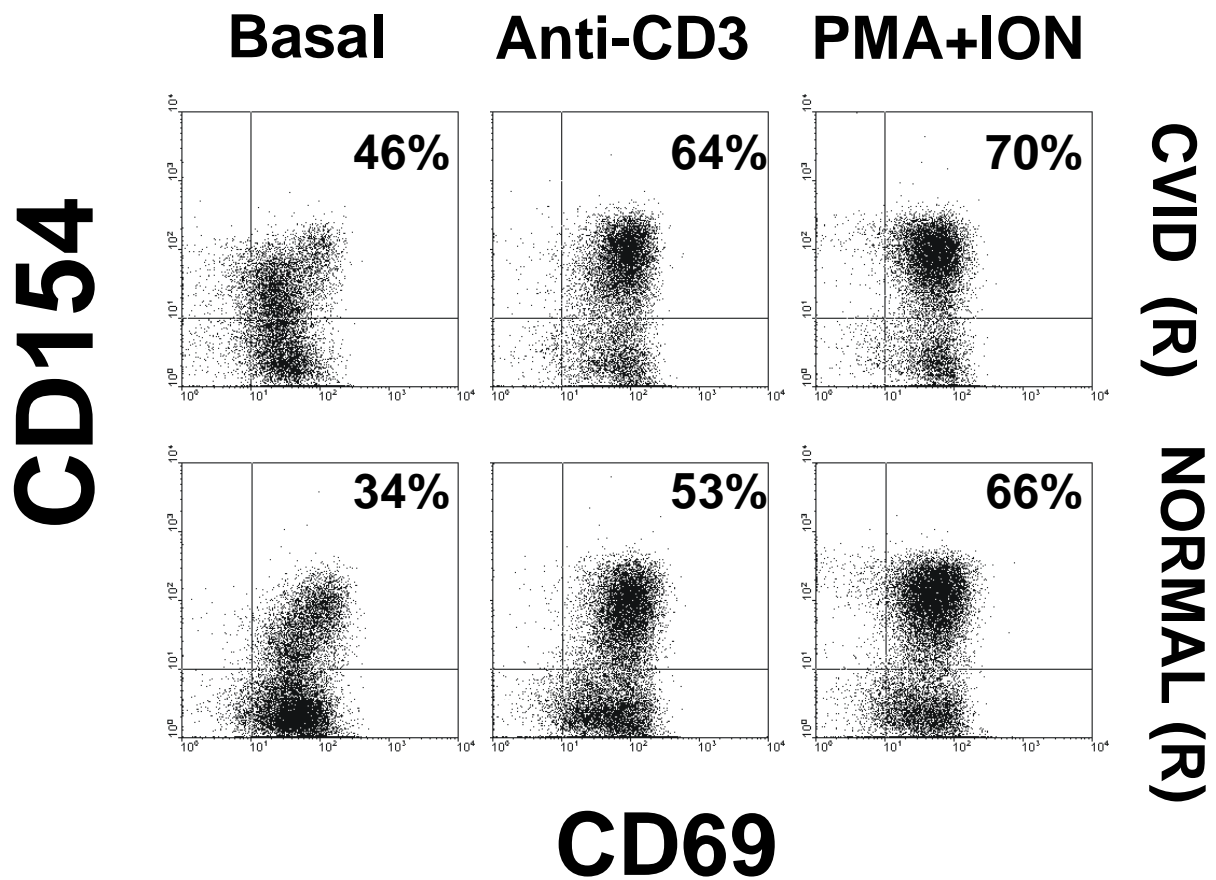


Figura 8.- Dot plots representativos de un análisis mediante citometría de flujo en dos colores con anti-CD154-PE y anti-CD69-FITC en células HVS CD8⁺ del paciente número 6 (subgrupo R) comparadas con las células HVS CD8⁺ de un donante sano (Normal número 4, subgrupo R), tanto sin estimular como estimuladas.

Inducción de citocinas intracelulares en líneas HVS CD4⁺

Nuestro siguiente objetivo fue medir mediante citometría de flujo la habilidad de las líneas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes CVID transformadas con HVS para generar diversas citocinas (IL-2, Factor de necrosis tumoral -alpha -TNF- α e interferón-gamma -IFN- γ) basalmente y tras estimulación *in vitro* con anti-CD3 o acetato de forbol mirístico (PMA) + ionomicina (ION) durante 9 horas. Desafortunadamente, la citocina IL-4 no puede medirse en células T transformadas, puesto que adquieren un fenotipo Th1 (34). No encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos las líneas HVS CD4⁺ de los controles y de los pacientes, analizadas como grupo, en ninguna de las citocinas analizadas. Sin embargo, tal y como se observó en las inducción de CD154 en las líneas CD4⁺ de los pacientes (Fig. 1, Pág. x), una importante proporción líneas CD4⁺ de los pacientes CVID analizadas (4 de 10) se encontraban por debajo del limite inferior de inducción de IL-2 obtenido en los controles sanos tras estimulación con anti-CD3 (línea discontinua en la Fig. 9).

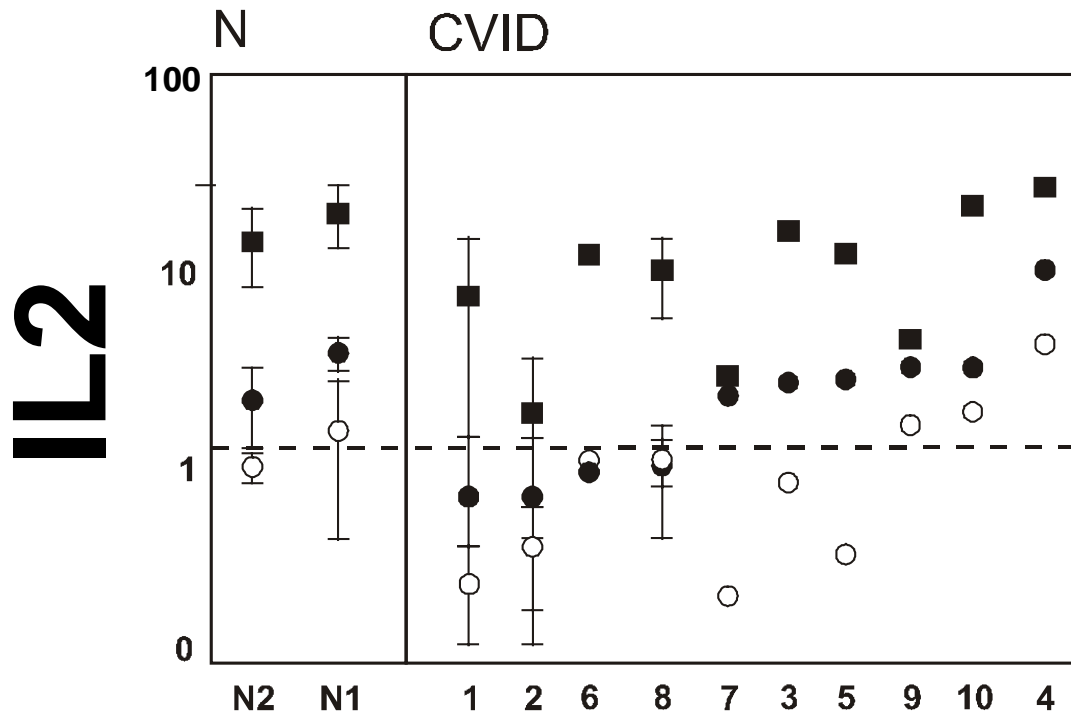


Figura 9.- Porcentaje de células HVS CD4⁺ IL-2 positivas en dos individuos normales y 10 pacientes CVID ordenados de menor a mayor en respuesta a la estimulación con anti-CD3. Las células fueron analizadas sin estimular (○) o estimuladas durante 9h en la presencia de anti-CD3 (●) o PMA+ION (■). Cuando el experimento fue repetido (normalmente tres veces), se representa la media \pm SD. La línea discontinua representa el límite inferior de respuesta al estímulo con anti-CD3 obtenido en las líneas control.

Interesantemente, estos cuatro pacientes pertenecían al subgrupo denominado B definido también, en la Figura 1, como bajos respondedores para la inducción de CD154. Cuando las líneas de los pacientes CVID fueron agrupados en los mismos subgrupos que los definidos como A y B en la Figura 1, observamos una diferencia significativa entre el grupo de pacientes B y el A (Fig. 10) o entre el grupo A + las líneas normales (Ver pie de la Figura 10).

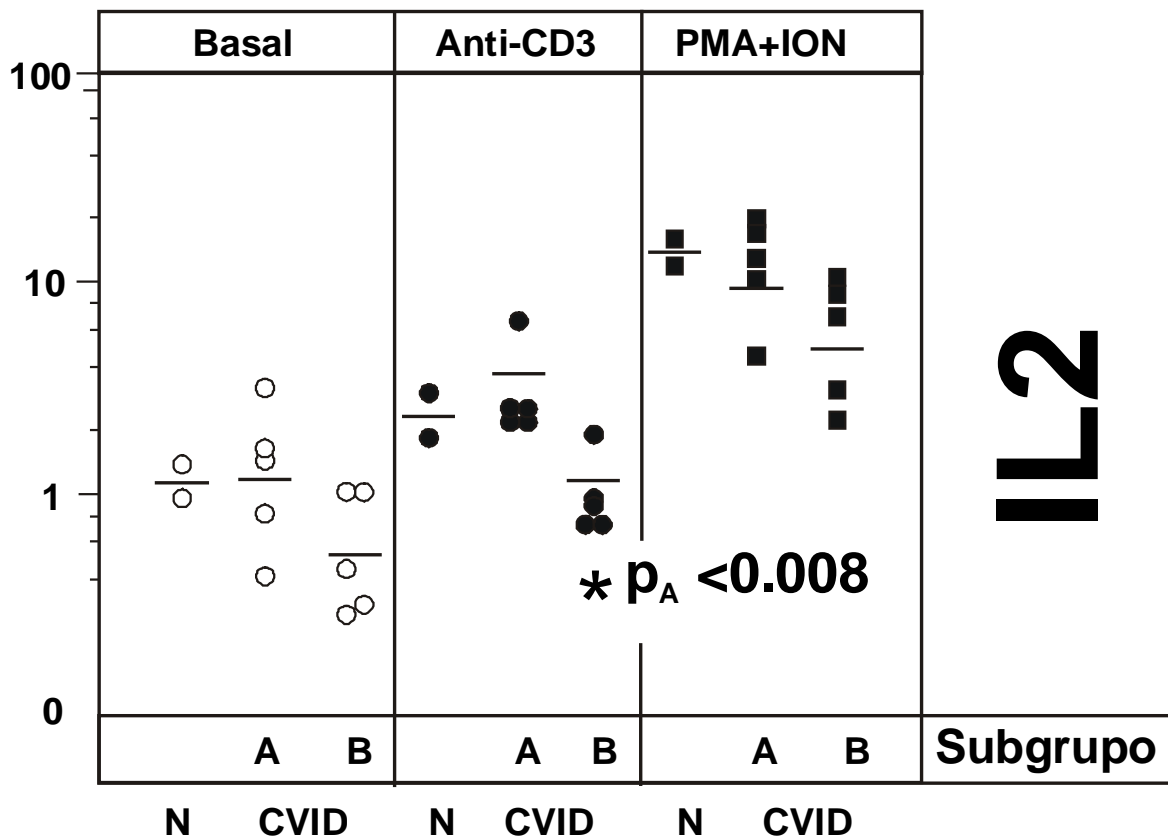


Figura 10.- Mismos datos que en la Figura 9, agrupados por el grado de respuesta al estímulo con anti-CD3. Los pacientes fueron agrupados como Altos (A) o Bajos respondedores (B) de acuerdo con su respuesta en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3 (Fig. 2). La pequeña línea horizontal indica la media estadística del número de células positivas para cada grupo o subgrupo. **La significación estadística en todas las comparaciones realizadas entre grupos y subgrupos era mayor de 0.05 excepto donde se indica (B vs A, $p_A=0.008$; B vs N+A, $p_{N+A}= 0.005$ y H vs N).**

Concluimos, por lo tanto que el subgrupo B identifica un grupo de pacientes con CVID cuyos linfocitos T CD4⁺ presentan un defecto en la capacidad para generar señales cooperadoras, tanto de membrana (CD154) como solubles (IL-2). Aún más, se observa una correlación estadísticamente significativa ($r = 0.84$, $p = 0.0012$) entre la inducción mediada por la estimulación con anti-CD3 de CD154 y de IL-2 (Fig. 13).

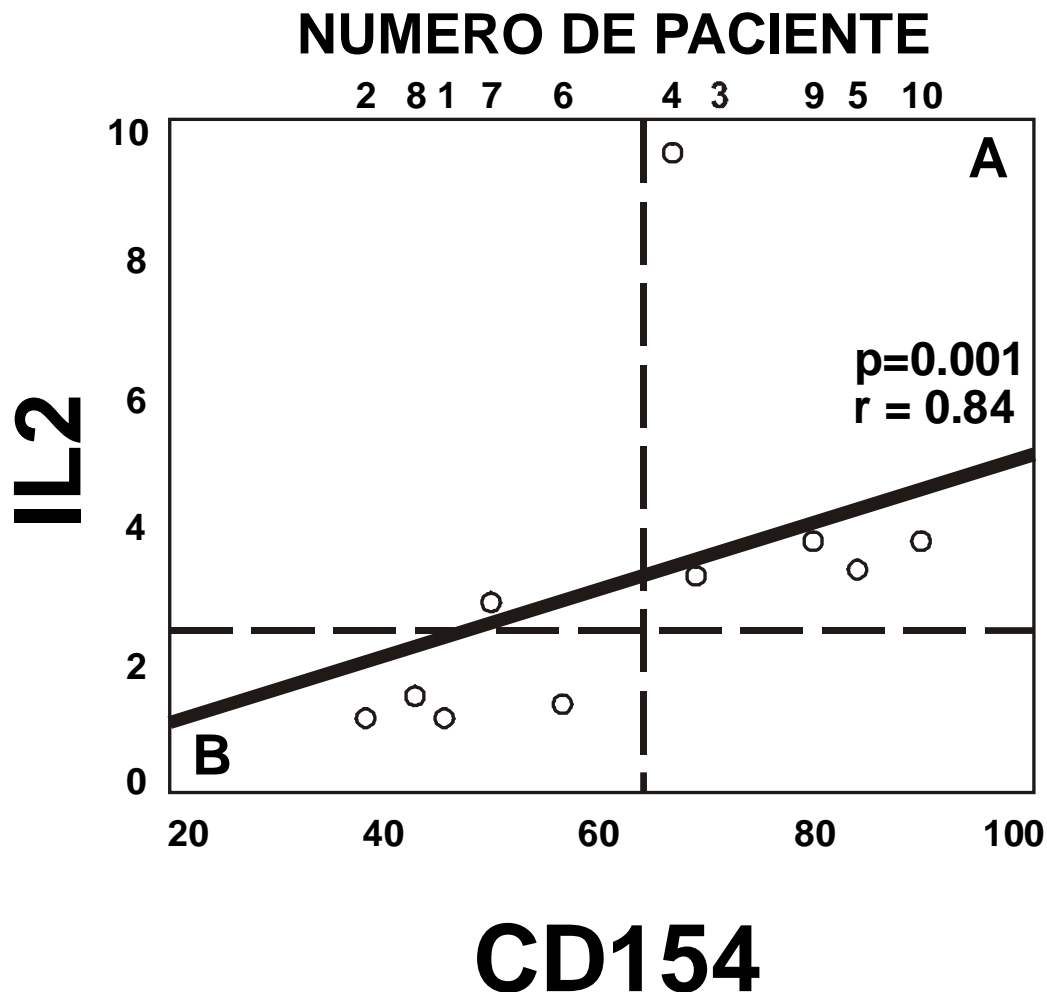


Figura 11.- La inducción de IL-2 por células T transformadas CVID CD4⁺ tras estimulación con anti- CD3 correlaciona significativamente con la inducción de CD154 con el mismo estímulo ($p = 0.0012$, $r = 0,84$). Las líneas discontinuas marcan el límite inferior de inducción obtenida en las líneas control tras estimulación con anti-CD3. Los pacientes definidos como A y B en la Figura 2 se agrupan claramente por encima o debajo del límite para IL-2 respectivamente, excepto con un único paciente.

A continuación realizamos el mismo estudio de inducción en las células HVS CD4⁺ para la citocina TNF- α . Como puede observarse en la Figura 12, solamente uno de los pacientes (Número 1) se encontraba por debajo del límite inferior de respuesta al estímulo con anti-CD3. De nuevo no encontrábamos diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el de controles.

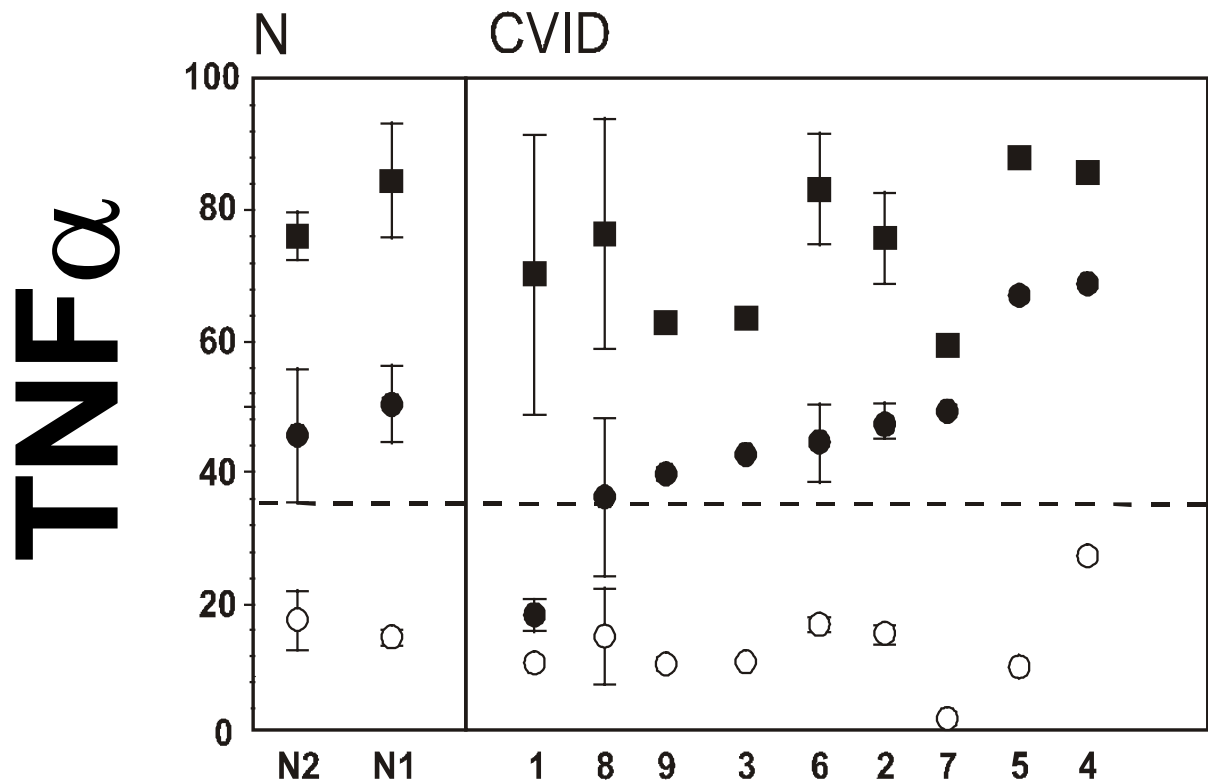


Figura 12.- Porcentaje de células HVS CD4⁺ TNF- α positivas en dos individuos normales y 9 pacientes CVID ordenados de menor a mayor respuesta a la estimulación con anti-CD3. Las células fueron analizadas sin estimular (○) o estimuladas durante 9h en la presencia de anti-CD3 (●) o PMA+ION (■). Cuando más de un experimento fue repetido (normalmente tres veces), se representa la media \pm SD. La línea discontinua representa el límite inferior de respuesta al estímulo con anti-CD3 obtenido en las líneas control.

Seguidamente contrastamos los subgrupos creados en la Figura 1 (Altos (A) y Bajos (B) respondedores en la inducción de CD154 tras estimulación con anti-CD3) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas (Figura 13).

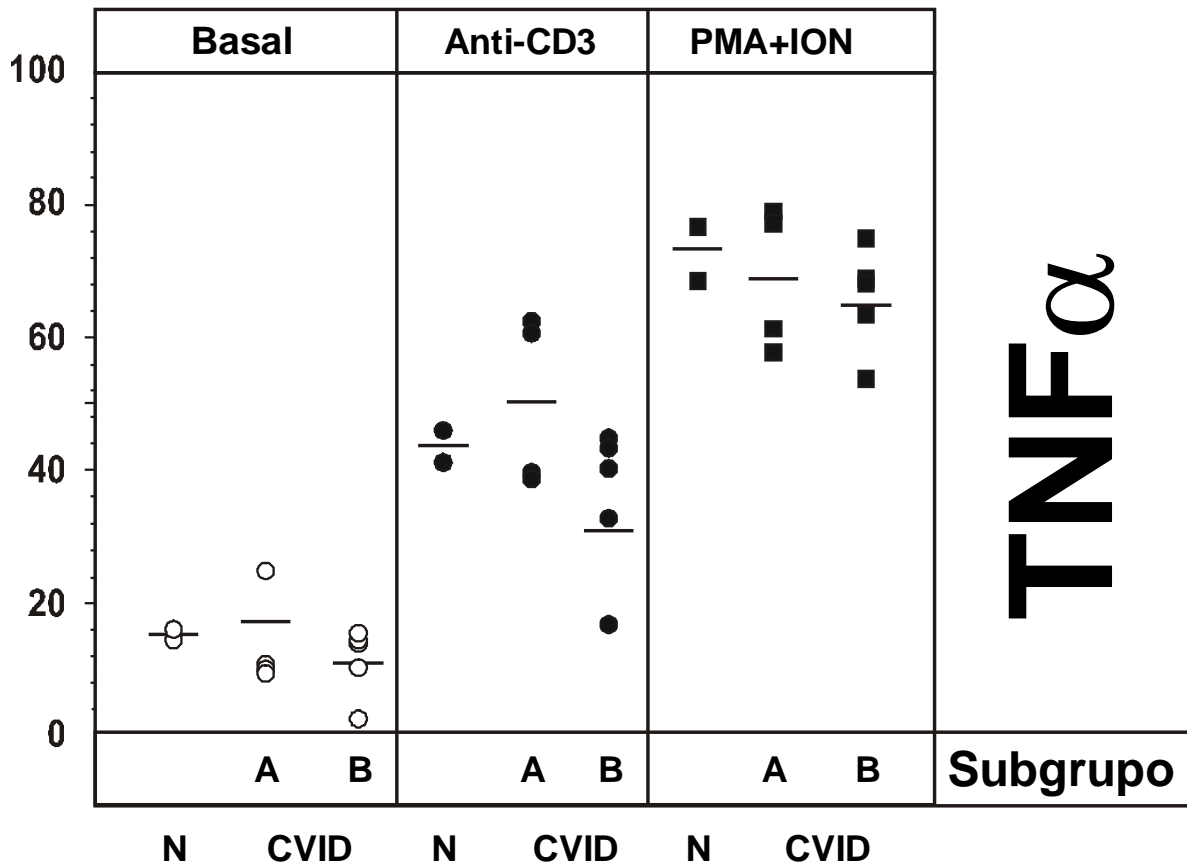


Figura 13.- Mismos datos que en la Figura 12, agrupados por el tipo de estímulo. Los pacientes fueron agrupados como Altos (A) o Bajos respondedores (B) de acuerdo con su respuesta en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3 (Fig. 2). La pequeña línea horizontal indica la media estadística del número de células positivas para cada grupo o subgrupo. **La significación estadística en todas las comparaciones realizadas entre grupos y subgrupos era mayor de 0.05.**

Por lo tanto, no encontramos diferencias significativas en la inducción de TNF- α cuando comparamos las líneas HVS CD4⁺ de los controles sanos y las de los pacientes con CVID, ni cuando se analizaron como grupo, ni en los subgrupos establecidos en la Figura 2.

A continuación realizamos el mismo estudio de inducción en las células HVS CD4⁺ para la citocina IFN- γ . Como puede observarse en la Figura 14, solamente uno de los pacientes (Número 1) se encontraba por debajo del límite inferior de respuesta al estímulo con anti-CD3. De nuevo no encontrábamos diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el de controles.

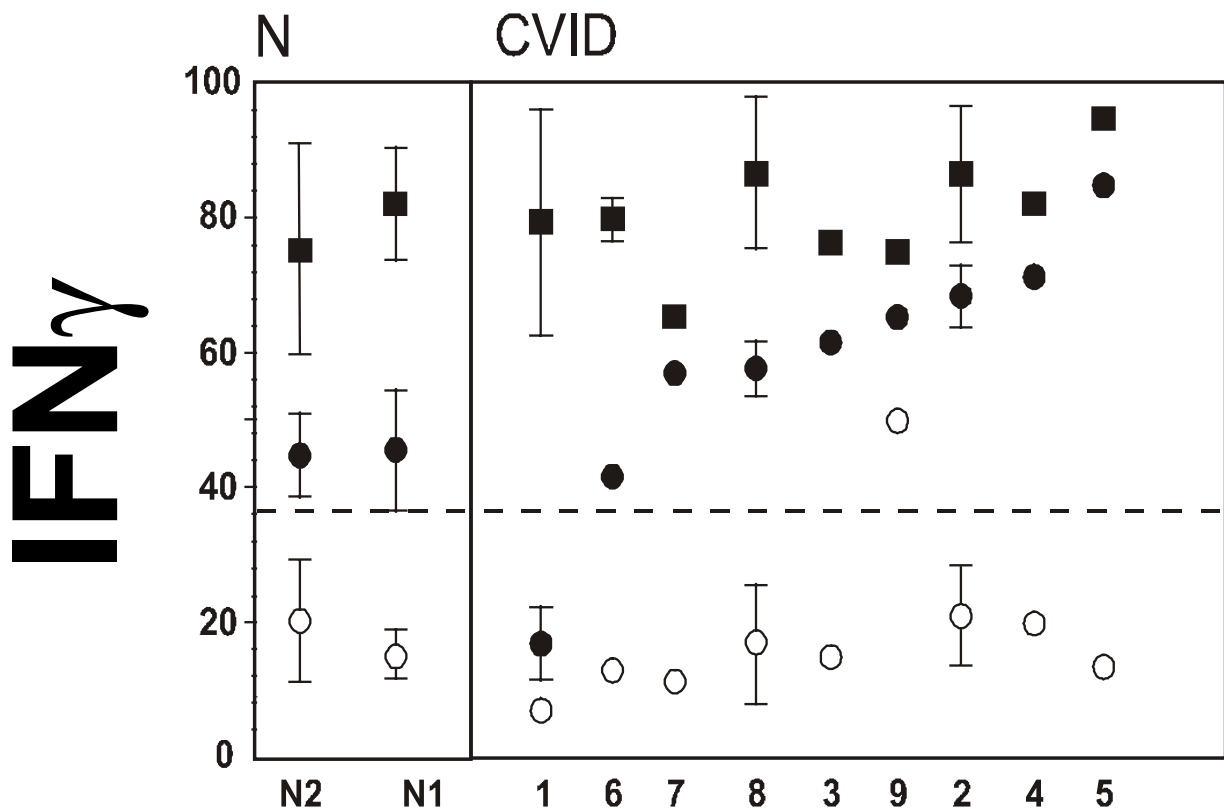


Figura 14.- Porcentaje de células HVS CD4⁺ IFN- γ positivas en dos individuos normales y 9 pacientes CVID ordenados de menor a mayor en respuesta a la estimulación con anti-CD3. Las células fueron analizadas sin estimular (○) o estimuladas durante 9h en la presencia de anti-CD3 (●) o PMA+ION (■). Cuando más de un experimento fue repetido (normalmente tres veces), se representa la media \pm SD. La línea discontinua representa el límite inferior de respuesta al estímulo con anti-CD3 obtenido en las líneas control.

Seguidamente contrastamos los subgrupos creados en la Figura 1 (Altos (A) y Bajos (B) respondedores en la inducción de CD154 tras estimulación con anti-CD3) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas (Figura 13).

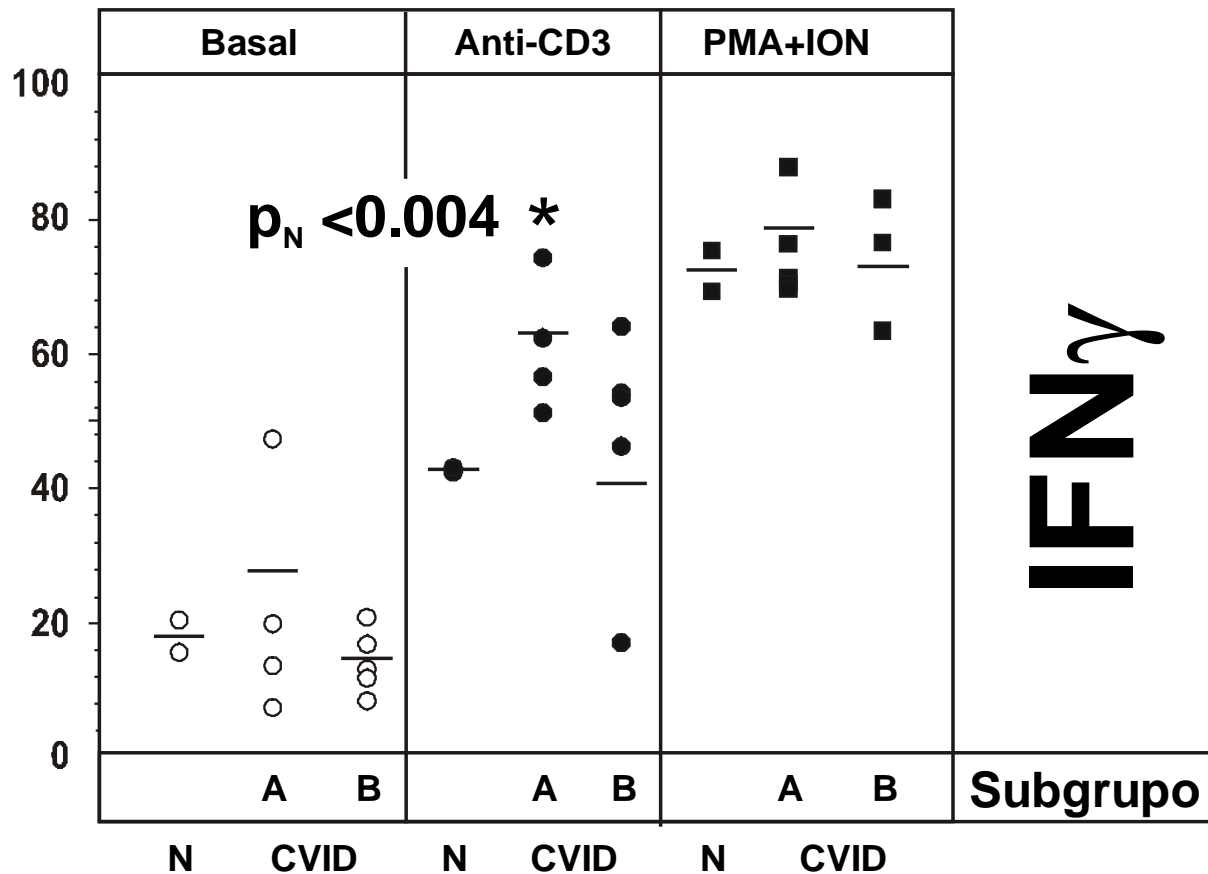


Figura 15.- Mismos datos que en la Figura 14, agrupados por el tipo de estímulo. Los pacientes fueron agrupados como Altos (A) o Bajos respondedores (B) de acuerdo con su respuesta en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3 (Fig. 2). La pequeña línea horizontal indica la media estadística del número de células positivas para cada grupo o subgrupo. **La significación estadística en todas las comparaciones realizadas entre grupos y subgrupos era mayor de 0.05 excepto donde se indica (A vs. N, $p_N = 0.004$).**

Por lo tanto, no encontramos diferencias significativas en la inducción de IFN- γ cuando comparamos las líneas HVS CD4⁺ de los controles sanos y las de los pacientes con CVID como grupo, pero, inesperadamente, el subgrupo de altos respondedores (A) mostró un inducción de IFN- γ vía CD3 estadísticamente significativa en comparación con los normales (Fig. 15).

Inducción de citocinas intracelulares en líneas HVS CD8⁺

Seguidamente realizamos el mismo estudio y aplicando el mismo criterio en 15 líneas HVS CD8⁺ de pacientes CVID y en sus respectivos controles pareados en sexo y edad. Además incluimos en el estudio 5 líneas HVS CD8⁺ de pacientes con ALX.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la inducción en ninguna de las líneas analizadas como grupo, tal y como puede observarse en la Figura 16.

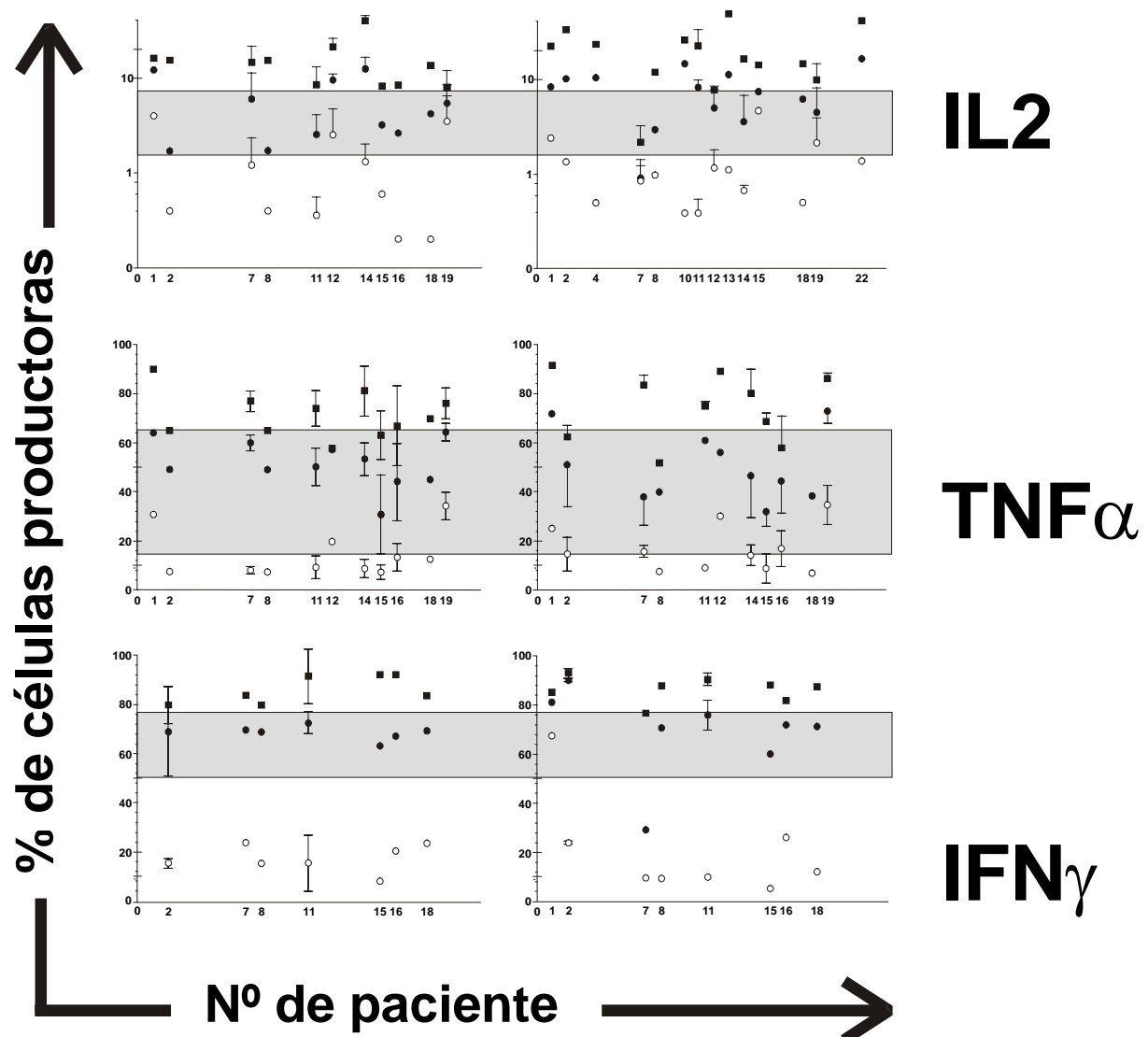


Figura 16.- Porcentaje de expresión de diversas citocinas (IL-2, TNF- α , IFN- γ) en 15 líneas de pacientes HVS CD8⁺ (Derecha) y sus respectivos controles (Izquierda). Las células fueron analizadas sin estimular (○) o estimuladas durante 9h en la presencia de anti-CD3 (●) o PMA+ION (■). Cuando más de un experimento fue repetido (normalmente tres veces), se representa la media \pm SD. La línea sombreada representa los límites superior e inferior de respuesta al estímulo con anti-CD3 obtenido en las líneas control.

Para saber si el defecto visto en la inducción de CD154 tras la estimulación con anti-CD3 en las líneas CVID HVS CD4⁺ era específico de linaje, agrupamos las líneas disponibles CVID HVS CD8⁺ de los pacientes definidos y agrupados como Altos (A) y Bajos (B) respondedores en la Figura 1. Además incluimos, también como control, 5 líneas de células T transformadas ALX HVS CD8⁺, puesto que a pesar de compartir el mismo cuadro clínico y tratamiento que la CVID, el origen genético de la enfermedad, mutaciones en el gen que codifica para la tirosín cinasa Btk, es específico de células B. Como puede verse en la Figura 13, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo o subgrupo establecido.

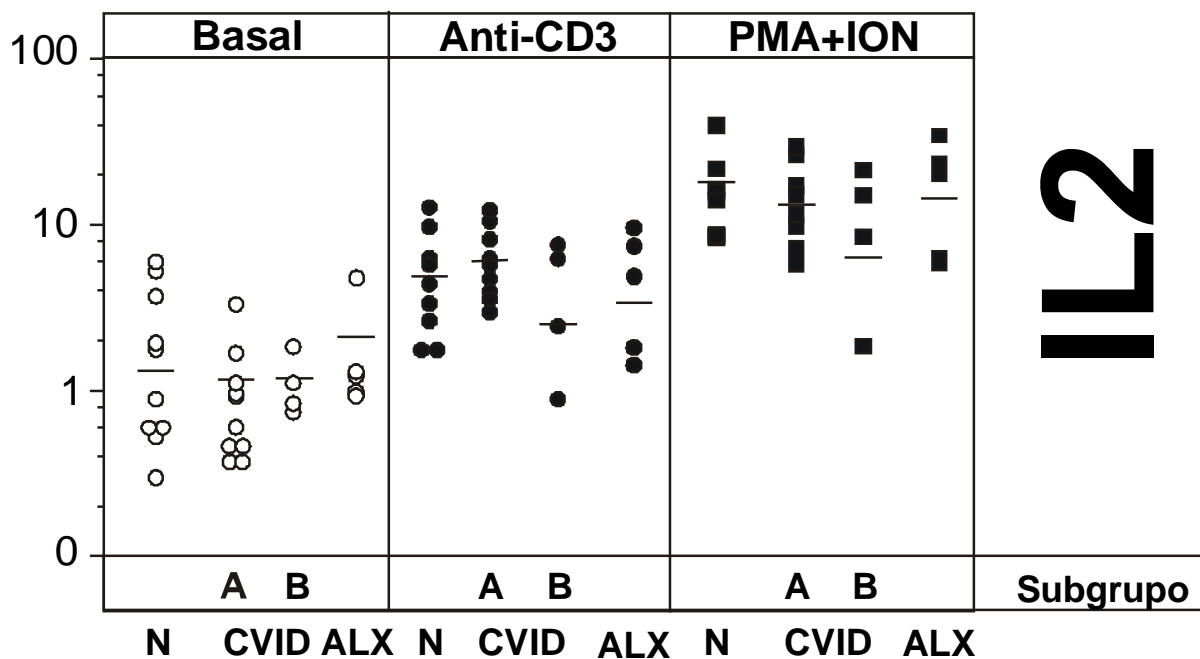


Figura 17 Mismos datos que en la Figura 14 y los obtenidos en las líneas de 5 pacientes con ALX, agrupados por el tipo de estímulo. Los pacientes fueron agrupados como Altos (A) o Bajos respondedores (B) de acuerdo con su respuesta en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3 (Fig. 2). La línea horizontal indica la media del número de células positivas para cada grupo o subgrupo. Las diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones entre los grupos y subgrupos dentro de cada estímulo era mayor que 0.05.

Por lo tanto no existen defectos de inducción de IL-2 en las líneas CVID HVS CD8⁺ comparadas con los controles, con los ALX, y ni siquiera en aquellas líneas cuyas células CD8⁺ transformadas del mismo paciente presentaban defectos de inducción de CD154 y de IL-2. El tratamiento con gammaglobulina intravenosa de estos pacientes no interfiere en los resultados descritos.

Con el mismo criterio que en el caso anterior, agrupamos los pacientes y evaluamos la inducción de TNF- α en las líneas HVS CD8⁺.

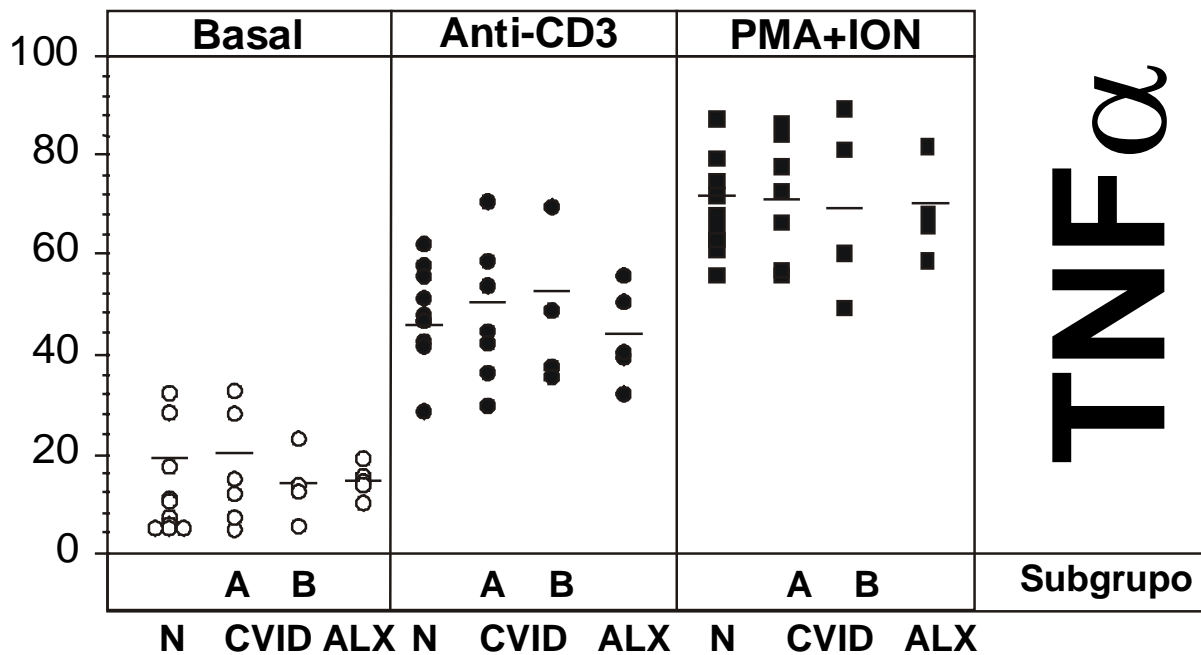


Figura 18.- Mismos datos que en la Figura 14 y los obtenidos en las líneas de 5 pacientes con ALX, agrupados por el tipo de estímulo. Los pacientes fueron agrupados como Altos (A) o Bajos respondedores (B) de acuerdo con su respuesta en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3 (Fig. 2). La línea horizontal indica la media del número de células positivas para cada grupo o subgrupo. Las diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones entre los grupos y subgrupos dentro de cada estímulo era mayor que 0.05.

Consecuentemente, no existen defectos de inducción de TNF- α en las líneas CVID HVS CD8⁺, ni como grupo ni entre los subgrupos creados, cuando se comparan con los controles o con los ALX.

Repetimos lo mismo para evaluar la inducción de IFN- γ en las líneas HVS CD8⁺.

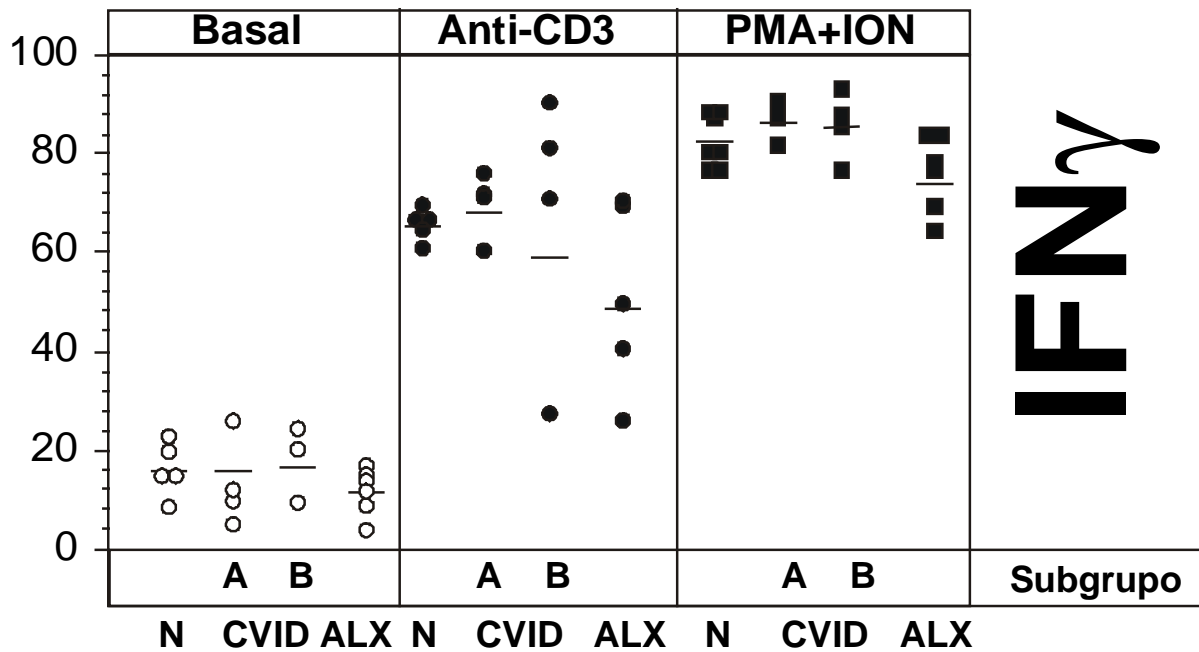


Figura 19.- Mismos datos que en la Figura 14 y los obtenidos en las líneas de 5 pacientes con ALX, agrupados por el tipo de estímulo. Los pacientes fueron agrupados como Altos (A) o Bajos respondedores (B) de acuerdo con su respuesta en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3 (Fig. 2). La línea horizontal indica la media del número de células positivas para cada grupo o subgrupo. Las diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones entre los grupos y subgrupos dentro de cada estímulo era mayor que 0.05.

Consecuentemente, no existen defectos de inducción de IFN- γ en las líneas CVID HVS CD8⁺, ni como grupo ni entre los subgrupos creados, cuando se comparan con los controles o con los ALX, ni siquiera en aquellas líneas cuyas células CD4⁺ transformadas del mismo paciente presentaban elevada inducción de IFN- γ .

Discusión

La Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) es un trastorno heterogéneo que afecta por igual a los dos sexos y que se caracteriza por el inicio de infecciones bacterianas recurrentes, habitualmente en la segunda o tercera décadas de la vida, debido a una marcada reducción de las concentraciones de inmunoglobulinas. Las alteraciones autoinmunitarias, incluidas la enfermedad de Addison, la tiroiditis y la AR, son frecuentes en estos pacientes y sus familiares. A veces hay diarrea, malabsorción e hiperplasia linfoide nodular del aparato gastrointestinal. A menudo se producen bronquiectasias. El carcinoma y el linfoma aparecen en el 10% de los pacientes.

Los mecanismos inmunitarios varían; por ejemplo, una actividad T supresora excesiva, un déficit de la actividad T cooperadora, defectos intrínsecos de la función de la célula B y autoanticuerpos frente a las células B o T. Como en la agammaglobulinemia ligada al X, es necesaria la inmunoglobulina durante toda la vida y deben usarse antibióticos para tratar cada infección.

1. ¿Por qué transformar células T de pacientes con CVID?

Como ya se ha dicho, el defecto primario de la CVID permanece oculto, a pesar de los esfuerzos realizados para su identificación. Varios trabajos previos sugieren que un subgrupo de pacientes incluidos bajo el paraguas clínico /inmunológico de la CVID tienen algún grado de disfunción en las células T [14-26], que puede reflejarse en una deprimida o inadecuada cooperación con las células B provocando un fracaso en su activación y por tanto, en la apropiada diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Además, algunos casos de pacientes clasificados como CVID han resultado ser una Hiper-IgM ligada al cromosoma X (2) o un síndrome linfoproliferativo (XLP) (27), que son defectos congénitos de células T. Por lo tanto, bajo el fenotipo CVID no solo puede haber otros defectos cuyo defecto primario está bien establecido, sino también esconder otras alteraciones de linfocitos T todavía no clarificadas.

Con la intención de investigar si tales defectos putativos eran intrínsecos a las células T, o por el contrario secundarios a una distribución de subpoblaciones T, a infecciones recurrentes o al tratamiento con inmunoglobulina intravenosa, hemos usado el *Herpesvirus*

saimiri (HVS) para la transformación de linfocitos T humanos de pacientes con CVID T. Este método ha sido también utilizado con éxito para analizar otras inmunodeficiencias congénitas [33-38].

2. Inmortalización de linfocitos T de CVID con HVS: el modelo vale

En este trabajo se han utilizado por primera vez líneas de linfocitos T transformadas con HVS para el estudio de la inmunodeficiencia común variable y se ha demostrado que las células transformadas preservan defectos intrínsecos específicos de linaje. De hecho, este modelo podría ser utilizado para estudios posteriores de otros síndromes, que por sus características clínicas han sido mal diagnosticados como CVID y definitivamente son defectos de células T, como en el caso del síndrome linfoproliferativo (Deficiencia de SAP) o el síndrome de Hiper-IgM (Deficiencia de CD40L). Del mismo modo, las células transformadas con HVS de enfermos con CVID podrían utilizarse para el estudio de los distintos eventos, fosforilación y desfosforilación de proteínas, que tienen lugar en las células tras distintos estímulos.

El *Herpesvirus saimiri* es un virus de la familia de los herpesvirus capaz de transformar linfocitos T con receptor TCR/CD3 del tipo $\alpha\beta$ (Biesinger et al., 1992) y $\gamma\delta$ (Yasukawa et al., 1995). Este virus, de forma análoga al EBV, infecta células T humanas, sin destruirlas, e induce en ellas modificaciones a nivel del control de su ciclo celular que suponen, en última instancia, la inmortalización de las células infectadas (Meinl y cols 1995). Las líneas T generadas se mantienen estables en su crecimiento durante largos periodos de tiempo (nuestro grupo continúa trabajando con células HVS inmortalizadas hace 6 años) y constituyen un muy buen modelo para el estudio de la fisiopatología del linfocito T. Con todo, el modelo HVS no deja de ser una aproximación de laboratorio a la célula T, de modo que la información que deriva del trabajo con líneas de este tipo ha de interpretarse siempre en el contexto del modelo, siendo cautos a la hora de las extrapolaciones al sistema *in vivo*.

Aunque el receptor del virus HVS no es conocido, se sabe que no es específico de células T, ya que el virus puede infectar, aunque no transformar otros tipos celulares. Sin embargo sí parece necesaria la presencia del complejo TCR/CD3 para que se inmortalicen los linfocitos, ya que sólo se inmortalizan los que poseen el receptor ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) y de hecho, tras la

exposición al HVS de precursores tímicos CD34⁺ se immortalizaron sólo células $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, aunque se observó una población de células T inmaduras, con expresión reducida del TCR, que no se immortalizó (Pacheco-Castro y cols 1996). Cómo hace el HVS para immortalizar las células T que infecta es un mecanismo que se desconoce, aunque los mejores candidatos inductores de la immortalización son las proteínas virales Stp C y Tip - las únicas proteínas virales producidas (Biesinger y cols 1995 y Fickenscher y cols 1996)-. La proteína Stp C interacciona con el protooncogén Ras, un importante regulador de la activación de la célula T, mientras que Tip se asocia con la proteína tirosina quinasa lck, fundamental en la activación de la célula T, a nivel del timo y en periferia. Ambas proteínas se encuentran, por tanto, asociadas a otras que participan directamente en la cascada de activación originada por el propio complejo TCR/CD3 (quizá sea esta la causa de la necesidad del complejo TCR/CD3 en la immortalización de células T). Por ello los análisis funcionales de las líneas HVS han tener en cuenta que quizá las etapas iniciales de muchos mecanismos señalizadores esenciales en la célula T se encuentren "alteradas". No obstante, los resultados obtenidos hasta ahora no sugieren que estas proteínas interfieran con el funcionamiento de la célula T mucho más allá de la "mera immortalización", y parece que los resultados de este tipo de estudios son comparables a los obtenidos con las mismas células antes de la transformación.

Desde el punto de vista fenotípico, las líneas HVS parecen comportarse como líneas de linfocitos T maduros y activados, y conservan los principales marcadores típicos de células T (ver Introducción).

Todos los estudios realizados anteriormente con linfocitos T immortalizados con HVS han demostrado que estas células preservan, en general, las características fenotípicas, funcionales y bioquímicas de las células originales (PBL). Este modelo se ha utilizado anteriormente para el estudio de múltiples inmunodeficiencias como la deficiencia de CD3 γ (Rodríguez-Gallego et al., 1996), deficiencia de MHC de clase II (Alvárez-Zapata et al., 1997), deficiencia de CD95 (Bröker et al., 1997), síndrome de Wiskott-Aldrich (Gallego et al., 1997), la ataxia telangiectasia (Rivero et al., 2000) o la inmunodeficiencia combinada severa asociada al cromosoma X (Stephan et al., 1996). En todos estos casos se han realizado estudios de los eventos inmediatos, tempranos y tardíos que se producen tras la activación del linfocito T (fosforilación de proteínas, movilización de calcio intracelular, síntesis de citocinas, inducción de marcadores de activación, proliferación celular, actividad citotóxica, etc.), y se ha visto que en general estos procesos eran similares en las células transformadas y

en las células no transformadas. Además del estudio de los procesos que intervienen en la activación del linfocito T, las líneas HVS se han utilizado para el estudio de apoptosis en linfocitos T (Kraft et al. 1998), observándose que la muerte por apoptosis vía CD95L es similar en las líneas transformadas con HVS y en las líneas parentales. Estos datos previos, nos permiten concluir que, las características funcionales observadas en las distintas líneas CVID son válidas y que debemos buscar una explicación a las discrepancias observadas entre nuestro modelo y los datos en PBL.

Por último, es importante mencionar que las líneas HVS tienden a la oligoclonalidad (Fickenscher y cols 1994), de modo que los estudios hechos con tipo de células han de tener en cuenta la edad de la línea, y en consecuencia el mayor o menor repertorio V β en ella representado.

3. ¿Ventaja selectiva de las subpoblación CD4?

Hasta la fecha la mayoría de los experimentos diseñados para el estudio funcional de los linfocitos T se han realizado directamente en linfocitos T aislados de sangre periférica o en líneas PHA, con la consiguiente limitación de la muestra. El hecho de haber generado por primera vez líneas estables de linfocitos T de enfermos con CVID nos ha permitido desarrollar, sin ninguna limitación de muestra, experimentos para el estudio de la función de estas células, a nivel de los procesos que llevan a la activación temprana de los linfocitos T (inducción de proteínas de activación o inducción de citocinas), necesarios para una correcta cooperación con los linfocitos B. Nuestros datos y los datos fenotípicos, funcionales y bioquímicos previos descritos en células y líneas de pacientes con CVID, nos dan la oportunidad de especular sobre posibles defectos congénitos o intrínsecos en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de estos enfermos.

Un primer e inesperado hallazgo fue la elevada proporción de líneas de células T CD4⁺ de pacientes CVID transformadas obtenidas, en comparación con los controles o con otras inmunodeficiencias congénitas con defectos de producción de inmunoglobulinas (AT, XLA, Tabla).

Como ya se ha dicho, no se conoce el receptor que utiliza el virus para infectar los linfocitos T, aunque debe ser exclusivo de estas células, ya que son las únicas que transforma este virus. También se desconoce el proceso por el cual el *Herpesvirus saimiri* induce la transformación de los linfocitos T. El hecho que, por primera vez, se hayan generado líneas celulares estables de linfocitos T de enfermos con CVID transformadas con *Herpesvirus saimiri* nos permite concluir que los posibles defectos congénitos o intrínsecos aún no establecidos como causantes de la enfermedad no son imprescindibles para la transformación de estas células por el virus.

El mecanismo para la transformación de los linajes de células T CD4⁺ vs. CD8⁺ T permanece desconocido [40]. Puesto que HVS requiere un complejo TCR/CD3 funcional y explota la interacción autocrina CD2/CD58, nuestros resultados sugieren que una significativa proporción de pacientes CVID tienen una alteración intrínseca en la señalización (o estado de activación) que afecta a la eficiencia de transformación, en uno de los dos linajes. Defectos de señalización tempranos (cualitativos) han sido descritos previamente en células T de pacientes con CVID por otros autores [19-22].

Alternativamente, nuestros resultados pueden ser explicados por diferencias CVID-específicas en la distribución de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺, algunos de los cuales pueden ser más susceptibles a la transformación inducida por HVS. Tales diferencias (cuantitativas) también han sido descritas previamente por otros autores [14,15, 17, 25].

La baja eficiencia de transformación del HVS (estimada en 0.5-1 en 10⁵ células [40]) puede cuestionar cuán representativas son nuestras líneas de células T de las subpoblaciones de linfocitos T primarios. Esta duda también surge para los linfocitos B de pacientes CVID transformados con el virus de Epstein-Barr (EBV), aunque la eficiencia de transformación del EBV es significativamente mayor (cerca de 1 in 10² [43]). En cualquier caso, tales líneas de células B CVID, preservan muchas características fenotípicas y funcionales de los linfocitos B frescos, sugiriendo la existencia de defectos intrínsecos y/o congénitos específicos de células B (8) en algunos pacientes CVID. Por lo tanto, la baja eficiencia de transformación del HVS no debería ser un obstáculo si los defectos específicos de la célula T son congénitos (10) o intrínsecos (13-26). Esto ha sido demostrado previamente en varias inmunodeficiencias congénitas, cuyas células HVS transformadas preservan las características de los linfocitos T

primarios (33-38). Colectivamente, nuestros datos negativos apoyan la idea de que la mayoría de linfocitos T de CVID no tienen defectos congénitos o intrínsecos en las funciones exploradas y por lo tanto, estos casos de CVID no se explicarían por una inmunodeficiencia específica de células T. En cualquier caso, una significativa fracción de los individuos estudiados mostraron defectos funcionales que parecen intrínsecos a pesar de la baja eficiencia de transformación.

Por lo tanto, es una característica específica de CVID que revela una ventaja de las células CD4⁺ (o una desventaja de las células CD8⁺) tras la exposición a HVS.

4 Un subgrupo de pacientes presentan defectos de inducción en CD154

En general, el análisis funcional de las líneas puras de linfocitos T transformadas de pacientes con CVID para la generación de moléculas de superficie relevantes (CD154) o solubles (IL-2, TNF- α , IFN- γ) para la cooperación con las células B, no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con los controles.

En cualquier caso, al ser la CVID una enfermedad tan heterogénea [2] puede incluir varios síndromes con una etiopatogenia diferente, como se ha descrito previamente [5-8, 12, 16-25]. Con un acercamiento similar, hemos identificado una subpoblación significativa de pacientes CVID (cerca del 50% y denominados B de bajos respondedores en la inducción de CD154 tras estímulo con anti-CD3) con una selectiva e intrínseca incapacidad por parte de las células T de generar tanto señales de cooperación de superficie (CD154, Fig. 1) y solubles (IL-2, Fig. 9), que pueden ser relevantes para la función de linfocitos B.

El defecto era selectivo porque no afectaba a otras moléculas de superficie analizadas (CD69, Fig. 7) o moléculas solubles (TNF- α , IFN- γ , Figs. 12 y 13) en las células CD4⁺ transformadas, y tampoco lo hacía a las mismas moléculas analizadas (CD154, IL-2) en las líneas CD8⁺ de los mismos pacientes (Figs. 5 y 15). Además, el defecto era intrínseco porque se encontró repetidamente en cultivos de larga duración de células puras transformadas, que pueden ser ahora utilizadas para una posterior caracterización de los defectos primarios en las líneas específicas, como por ejemplo, las células CD4⁺ del paciente número 1.

Algunos estudios previos han descrito una baja inducción de CD154 en PBL estimuladas de un significativo grupo de pacientes CVID [18], mientras otros han descrito defectos en la producción de IL-2 [41]. Ahora nosotros mostramos que realmente ambos defectos pueden estar intrínsecamente asociados en una amplia fracción de pacientes CVID (B en Fig. 5). Cuando se estimularon con anti-CD3, el subgrupo de pacientes recíproco CVID (por ejemplo A en la Fig. 15) producen significativamente elevadas cantidades de IFN- γ . Otros autores han descrito elevada síntesis de IFN- γ por células T primarias CVID [42].

Por lo tanto, es posible que una anomalía intrínseca en algunos pacientes CVID (subgrupo B) impidan una correcta cooperación con las células B, mientras que otros pacientes CVID (subgrupo A) tal cooperación esté disponible, pero en la dirección incorrecta (por ejemplo, Th1), desviando el sistema lejos de un perfil de secreción de citocinas Th2 necesario para la producción de anticuerpos.

Pueden existir un variable número de defectos subyacentes que sean los responsables de una incorrecta expresión de CD154. El defecto de inducción de esta molécula puede ser resultado de una incorrecta transcripción del gen o debido a inestabilidad del mensajero, que dependiendo de la extensión del defecto primario, puede afectar la expresión de una o más citocinas u otras moléculas de activación. La hipótesis de variables defectos en las células T está apoyado por los descubrimientos de que los linfocitos activados de la mayoría de pacientes CVID evaluados tienen deprimida la producción de una o más citocinas características de células T. Una mayor evidencia viene aportada por la disminuida producción de IL2 correlaciona significativamente con la expresión de CD154, que todos los pacientes con múltiples deficiencias de citocinas exhiben disminuida expresión de CD154 también, La asociación de IL-2 y CD154 expresión del gen sugiere que estos dos genes pueden compartir factores reguladores de la transcripción que pueden ser disfuncionales en un subgrupo de pacientes, predominantemente en la subpoblación CD4⁺

5 No existen defectos intrínsecos en las células HVS CD8⁺

En contraste con algunos trabajos anteriores que describían defectos funcionales en células CD8⁺ de pacientes CVID [20, 25, 26, 42], nuestros datos descartan un defecto intrínseco en el linaje CD8⁺ para la generación de factores de cooperación con las células B tanto de membrana (CD154, CD69) como solubles (IL-2, TNF- α , IFN- γ) (Figs. 5-7 y 17-19 4). En cualquier caso, no podemos excluir defectos secundarios o cuantitativos en células T primarias, como se explica más arriba.

Se requieren estudios posteriores para explorar los mecanismos implicados en la disfunciones intrínsecas descritas aquí, y su relevancia para la función de células B de pacientes CVID.

Conclusion es

1. El Herpesvirus saimiri es capaz de transformar linfocitos T CD4+ y CD8+ de enfermos con inmunodeficiencia común variable (CVID).
2. Las células de los enfermos CVID generan significativamente más líneas T CD4+ transformadas que las células de donantes sanos o de otras inmunodeficiencias primarias como la agammaglobulinemia ligada al X o la ataxia telangiectasia.
3. Analizados como grupo, no existen diferencias significativas en la inducción de moléculas de activación (CD154, CD69) ni en la inducción de citocinas (IL-2 TNF- α , IFN- γ) entre los pacientes y los controles, con ninguno de los estímulos utilizados.
4. Si bien como grupo no existen diferencias significativas entre las dos poblaciones, con ninguno de los estímulos utilizados, existe un subgrupo de pacientes CD4 positivos con un defecto intrínseco en la inducción de CD154 y de IL-2 tras estimulación con anti-CD3.
5. Destaca la variabilidad de expresión existente en los pacientes y la aparición de defectos individuales.
6. Las líneas transformadas pueden ayudar a caracterizar el defecto intrínseco descrito.

Perspectiv
as

Análisis funcionales

Recientemente se han publicado varios trabajos relacionados con la interacción T-B que profundizan en la cooperación molecular entre estas dos células.

Morimoto, S et al (*J. Immunol.* 2000. 164: 4097-4104) proponen un modelo en el que las interacciones de CD154/CD40, CD70/CD27, y CD134/CD134L regulan coordinadamente las respuestas B- T dependientes. CD134 es un miembro de la familia de TNFR que se expresa en células T activadas, y su ligando CD134L se encuentra principalmente en células B activadas. Cuando se bloquea con anti-CD134 PBMC estimuladas con PWM se inhibe la producción de IgG. Células CD134-transfectadas + PBMC estimuladas con PWM, produce un aumento de la producción de IgG de una manera dosis dependiente. Células CD134-transfectadas + células B estimuladas con SAC/IL2 no produce ni IgG ni proliferación. CD134-transfectadas + células B estimuladas con SAC/IL2 + anti CD40 o IL4 o IL10 aumenta producción de IgG pero no de la proliferación. Solo aparece un pequeño aumento de células plasmáticas, lo que significa que el aumento de producción de inmunoglobulinas es debido al aumento de la tasa de síntesis individual. Ellos proponen un modelo de la interacción T-B que sería el siguiente:

CD40/CD154 (Temprana). Estimula la expansión clonal de células B antígeno específicas y e induce el cambio de isotipo

CD27/CD70 (Intermedia) continúa la proliferación y puede ser importante en la inducción de la diferenciación a células plasmáticas después de la expansión clonal inducida por CD154/CD40.

CD134L/CD134 (Tardía) Aumenta la producción de células plasmáticas en la presencia de IL-4 o IL-10.

Brouet, J. C et al (*Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 2516-2520) miran la expresión de CD70 (ligando de CD27), miembro de la familia de TNFR, en células T activadas de 14 pacientes CVID en que la expresión de CD27⁺ en células B era baja y en 4 de ellos era baja (10-30%) y en 5 muy baja (<10%), pero no hay correlación con la población B de memoria.

Estamos en disposición de analizar la expresión e inducción de estas moléculas en las líneas HVS generadas

Análisis bioquímicos

Boncristiano, M. (*Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 2632-2638) describen un defecto en el reclutamiento de ZAP-70 en pacientes CVID que previamente habían descrito con defectos en la fosforilación total de células T. Sin embargo, no detectan mutaciones en ZAP-70 y no puede mirar ζ porque no tienen células. Lck parece la primera candidata pero no existen defectos. Otros factores como su asociación a CD4 o su localización en balsas lipídicas (rafts) no está afectada. Otro candidato es CD45, tirosín fosfatasa que regula Lck. La expresión es normal en estos pacientes pero no descartan un defecto en la actividad reguladora. Puede que la regulación de Lck sea correcta pero la generación de p23 ζ en células normales T requiere la acción combinada de Lck y otra PTK como Fyn. Como la generación de p21 ζ , precursor de p23 ζ , es funcional, esto sugiere que la regulación de la cascada de fosforilación en el ITAM de la cadena ζ debe conseguirse por el reclutamiento secuencial de otras PTK.

Estamos en disposición de seguir avanzando por esta línea (fosforilación total y específica de distintas proteínas implicadas en la activación de la célula T), puesto que no tenemos problemas de células.

Bibliograf ía

- Akari H, Mori K, Terao K, Otani I, Fukasawa M, Mukai R, Yoshikawa Y. In vitro immortalization of Old World monkey T lymphocytes with Herpesvirus saimiri: its susceptibility to infection with simian immunodeficiency viruses. *Virology*. 1996 Apr 15;218(2):382-8.
- Alvarez-Cuesta C, Molinos L, Cascante JA, Soler T, Perez-Oliva N. Cutaneous granulomas in a patient with common variable immunodeficiency. *Acta Derm Venereol*. 1999 Jul;79(4):334.
- Alvarez-Zapata D, de Miguel Olalla S, Fontan G, Ferreira A, Garcia-Rodriguez MC, Madero L, van den Elsen P, Regueiro JR. Phenotypical and functional characterization of Herpesvirus saimiri-immortalized human major histocompatibility complex class II-deficient T lymphocytes. *Tissue Antigens*. 1998 Mar;51(3):250-7.
- Ambrus M, Hernadi E, Bajtai G. Prevalence of HLA-A1 and HLA-B8 antigens in selective IgA deficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1977; 7: 311-314.
- Andon Saavedra C, Deben Ariznavarreta G, Batlle Fonrodona J, Ramirez Cereceda C, Saavedra A. Autoimmune hemolytic anemia in common variable immunodeficiency. *Sangre (Barc)*. 1996 Oct;41(5):404-5.
- Ardiles A, Rodriguez C, Villaman JJ. Unexplained remission of common variable immunodeficiency: analysis of a clinical case. *Rev Med Chil*. 1996 Jun;124(6):725-31.
- Ariatti C, Vivenza D, Capello D, Migliazza A, Parvis G, Fassone L, Buonaiuto D, Savinelli F, Rossi D, Saglio G, Gaidano G. Common-variable immunodeficiency-related lymphomas associate with mutations and rearrangements of BCL-6: pathogenetic and histogenetic implications. *Hum Pathol*. 2000 Jul;31(7):871-3.
- Ariga T, Okano M, Takahashi Y, Sakiyama Y, Matsumoto S. Analysis of B cell dysfunction in patients with common variable immunodeficiency by using recombinant interleukin 2. *Tohoku J Exp Med*. 1987 May;152(1):53-61.
- Ashman RF, Schaffer FM, Kemp JD, Yokoyama WM, Zhu ZB, Cooper MD, Volanakis JE. Genetic and immunologic analysis of a family containing five patients with common-variable immune deficiency or selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 1992 Nov;12(6):406-14.
- Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*. 2000; 121:506-14.
- Ashwell JD, Klausner RD. (1990). Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol*. 8: 139-167.
- Aukrust P, Aandahl EM, Skallehegg BS, Nordoy I, Hansson V, Tasken K, Froland SS, Muller F. Increased activation of protein kinase A type I contributes to the T cell deficiency in common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1178-85.
- Aukrust P, Berge RK, Muller F, Ueland PM, Svardal AM, Froland SS. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency--a marker of enhanced oxidative stress. *Eur J Clin Invest*. 1997 Sep;27(9):723-30.
- Aukrust P, Lien E, Kristoffersen AK, Muller F, Haug CJ, Espevik T, Froland SS. Persistent activation of the tumor necrosis factor system in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency--possible immunologic and clinical consequences. *Blood*. 1996 Jan 15;87(2):674-81.
- Aukrust P, Muller F, Froland SS. Elevated serum levels of interleukin-4 and interleukin-6 in patients with common variable immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4+ lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Mar;70(3):217-24.
- Aukrust P, Muller F, Froland SS. Enhanced generation of reactive oxygen species in monocytes from patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1994 Aug;97(2):232-8.
- Aukrust P, Muller F, Ueland T, Svardal AM, Berge RK, Froland SS. Decreased vitamin A levels in common variable immunodeficiency: vitamin A supplementation in vivo enhances immunoglobulin production and downregulates inflammatory responses. *Eur J Clin Invest*. 2000 Mar;30(3):252-9.

Aukrust P, Svoldal AM, Muller F, Lunden B, Berge RK, Froland SS. Decreased levels of total and reduced glutathione in CD4+ lymphocytes in common variable immunodeficiency are associated with activation of the tumor necrosis factor system: possible immunopathogenic role of oxidative stress. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1383-91.

Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, Fresser F, Wachter H, Grunicke H, Utermann G, Altman A, Baier G. (1996). Protein Kinase C isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1842-1850.

Baniyash M, Garcia-Morales P, Bonifacino JS, Salmeson LE, Klausner RD. (1988). Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T cell receptor: possible identification of two structural classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 263: 9874-9878.

Baniyash M, Hsu VW, Seldin MF, Klausner RD. (1989). The isolation and characterization of the murine T cell antigen receptor ζ chain gene. *J. Biol. Chem.* 264: 13252-13257.

Bauer M, Lucchiari-Hartz M, Fickenscher H, Eichmann K, McKeating J, Meyerhans A. Herpesvirus saimiri-transformed human CD4+ T-cell lines: an efficient target cell system for the analysis of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic CD8+ T-lymphocyte activity. *J Virol.* 1998 Feb;72(2):1627-31.

Baumert E, Wolff-Vorbeck G, Schlesier M, Peter HH. Immunophenotypical alterations in a subset of patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 1992 Oct;90(1):25-30.

Berend KR, Jung JU, Boyle TJ, DiMaio JM, Mungal SA, Desrosiers RC, Lyerly HK. Phenotypic and functional consequences of herpesvirus saimiri infection of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 1993 Oct;67(10):6317-21.

Berridge MJ. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325.

Biesinger B, Muller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzer E, Desrosiers RC, Fleckenstein B. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):3116-9.

Biesinger B, Tsygankov AY, Fickenscher H, Emmrich F, Fleckenstein B, Bolen JB, Broker BM. The product of the Herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4729-34.

Boncristiano M, Majolini MB, D'Elis MM, Pacini S, Valensin S, Ulivieri C, Amedei A, Falini B, Del Prete G, Telford JL, Baldari CT. Defective recruitment and activation of ZAP-70 in common variable immunodeficiency patients with T cell defects. *Eur J Immunol.* 2000 Sep;30(9):2632-8.

Borst J, Brouns GS, de Vries JE, Verschuren, MCM, Mason DY, van Dongen JJM. (1993). Antigen receptors on T and B lymphocytes parallels in organization and function. *Immunol. Rev.* 132: 49-84.

Branda RF, Moore AL, Hong R, McCormack JJ, Zon G, Cunningham-Rundles C. B-cell proliferation and differentiation in common variable immunodeficiency patients produced by an antisense oligomer to the rev gene of HIV-1. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 May;79(2):115-21.

Brenner MB, McLean J, Scheft H, Warnke RA, Jones N, Strominger JL. (1986). Characterization and expression of human α/β TCR by using a framework monoclonal antibody. *J. Immunol.* 138: 1502-1509.

Broker BM, Fickenscher H. Herpesvirus saimiri strategies for T cell stimulation and transformation. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 1999 Mar;187(3):127-36.

Broker BM, Kraft MS, Klauenberg U, Le Deist F, de Villartay JP, Fleckenstein B, Fleischer B, Meinel E. Activation induces apoptosis in Herpesvirus saimiri-transformed T cells independent of CD95 (Fas, APO-1). *Eur J Immunol.* 1997 Nov;27(11):2774-80.

Broker BM, Tsygankov AY, Fickenscher H, Chitav NA, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Bolen JB, Emmrich F, Schulze-Koops H. Engagement of the CD4 receptor inhibits the interleukin-2-dependent proliferation of human T cells transformed by Herpesvirus saimiri. *Eur J Immunol.* 1994 Apr;24(4):843-50.

- Broker BM, Tsygankov AY, Muller-Fleckenstein I, Guse AH, Chitav NA, Biesinger B, Fleckenstein B, Emrich F. Immortalization of human T cell clones by Herpesvirus saimiri. Signal transduction analysis reveals functional CD3, CD4, and IL-2 receptors. *J Immunol.* 1993 Aug 1;151(3):1184-92.
- Brouet JC, Chedeville A, Ferman JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol.* 2000 Sep;30(9):2516-20.
- Brugnoni D, Airo P, Lebovitz M, Malacarne F, Ugazio AG, Notarangelo LD, Plebani A, Cattaneo R. CD4+ cells from patients with Common Variable Immunodeficiency have a reduced ability of CD40 ligand membrane expression after in vitro stimulation. *Pediatr Allergy Immunol.* 1996 Nov;7(4):176-9.
- Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9: 722-727.
- Bruton OC, Apt L, Gitlin D, Janeway CA. Absence of serum gamma globulins. *Am J Dis Child* 1952; 84: 632-636.
- Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990 Aug;56(2):239-48.
- Caballero FM, Brown WR, Kohler PF, Hayward AR. B cell numbers and responses in patients with common variable immunodeficiency and nodular lymphoid hyperplasia of the bowel. *J Clin Lab Immunol.* 1984 Feb;13(2):59-63.
- Cambronero R, Sewell WA, North ME, Webster AD, Farrant J. Up-regulation of IL-12 in monocytes: A fundamental defect in common variable immunodeficiency. *J Immunol.* 2000 Jan 1;164(1):488-94.
- Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., Weiss, A. (1992). ZAP70: a 70 kD protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* 71: 649-662.
- Chan AC, van Oers NSC, Tran A, Turka L, Law CL, Ryan JC, Clark EA, Weiss A. (1994). Differential expression of ZAP70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* 152: 4758-4766.
- Chou CS, Medveczky MM, Geck P, Vercelli D, Medveczky PG. Expression of IL-2 and IL-4 in T lymphocytes transformed by herpesvirus saimiri. *Virology.* 1995 Apr 20;208(2):418-26.
- Chow LNM, Veillette A. (1995). The Src and Csk families of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Sem. Immunol.* 7: 207-226.
- Clayton LK, D'Adamio LD, Howard FD, Sieh RE, Koyasu S, Reinherz EL. (1991). CD3 η and CD3 ζ are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 5202-5206.
- Clevers, H., Alarcón, B., Wileman, T., Terhorst, C. (1988). The TCR/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 629-662.
- Conley ME, Cooper MD. Genetic basis of abnormal B cell development. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:399-406.
- Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL. Suppression of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is dependent on the NFAT-1 element. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996 Jan 20;12(2):143-8.
- Crabtree, G.R., Clipstone, N.A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 1045-1083.
- Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999 Jul;92(1):34-48.
- Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic studies of common variable immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr.* 1994 Dec;6(6):676-81.

- Farrant J, Spickett G, Matamoros N, Copas D, Hernandez M, North M, Chapel H, Webster AD. Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency*. 1994;5(2):159-69.
- Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, Noelle RJ, Aruffo A, Ochs HD. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Feb 1;91(3):1099-103.
- Ferrer JM, 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 Nov;102(2):286-9.
- Fickenscher H, Biesinger B, Knappe A, Wittmann S, Fleckenstein B. Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene *stpC*, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. *J Virol*. 1996 Sep;70(9):6012-9.
- Fickenscher H, Bokel C, Knappe A, Biesinger B, Meinel E, Fleischer B, Fleckenstein B, Broker BM. Functional phenotype of transformed human alpha and gamma delta T cells determined by different subgroup C strains of herpesvirus Saimiri. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2252-63.
- Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Lokaj J, Wolf HM, Mannhalter JW, Eibl MM. Activation of CVID patients' T cells with conventional antigens and superantigens. *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):15-6.
- Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E, Lokaj J, Litzman J, Wolf HM, Mannhalter JW, et al. A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4234-41.
- Fischer MB, Hauber I, Vogel E, Wolf HM, Mannhalter JW, Eibl MM. Defective interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in response to antigen in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Aug;92(2):340-52.
- Fischer MB, Hauber I, Wolf HM, Vogel E, Mannhalter JW, Eibl MM. Impaired TCR signal transduction, but normal antigen presentation, in a patient with common variable immunodeficiency. *Br J Haematol*. 1994 Nov;88(3):520-6.
- Fischer MB, Wolf HM, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Lokaj J, Litzman J, Mannhalter JW, Eibl MM. The costimulatory signal CD28 is fully functional but cannot correct the impaired antigen response in T cells of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1994 Feb;95(2):209-14.
- Fischer MB, Wolf HM, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Sasgary M, Eibl MM. Activation via the antigen receptor is impaired in T cells, but not in B cells from patients with common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol*. 1996 Jan;26(1):231-7.
- Fleischman A, Hershfield MS, Toutain S, Lederman HM, Sullivan KE, Fasano MB, Greene J, Winkelstein JA. Adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency in common variable immunodeficiency. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998 May;5(3):399-400.
- Fremont DH, Rees WA, Kozono H. (1996). T cells recognize a complex of a peptide fragment bound to an MHC molecule. *Curr Opin Immunol*. 8: 93-100.
- Fritsch A, Junker U, Vogelsang H, Jager L. On interleukins 4, 6 and 10 and their interrelationship with immunoglobulins G and M in common variable immunodeficiency. *Cell Biol Int*. 1994 Nov;18(11):1067-75.
- Fuchs D, Weiss G, Murr C, Wachter H. Interleukin-10 for common variable immunodeficiency. *Lancet*. 1993 Nov 27;342(8883):1363
- Funauchi M, Farrant J, Moreno C, Webster AD. Defects in antigen-driven lymphocyte responses in common variable immunodeficiency (CVID) are due to a reduction in the number of antigen-specific CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 1995 Jul;101(1):82-8.

- Gallego MD, Santamaria M, Pena J, Molina IJ. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):3089-97.
- Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today*. 1998 Oct;19(10):480-5.
- Gilmour KC, Cranston T, Jones A, Davies EG, Goldblatt D, Thrasher A, Kinnon C, Nichols KE, Gaspar HB. Diagnosis of X-linked lymphoproliferative disease by analysis of SLAM-associated protein expression. *Eur J Immunol*. 2000 Jun;30(6):1691-7.
- Gottesman SR, Haas D, Ladanyi M, Amorosi EL. Peripheral T cell lymphoma in a patient with common variable immunodeficiency disease: case report and literature review. *Leuk Lymphoma*. 1999 Feb;32(5-6):589-95.
- Grassmann R, Dengler C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, McGuire K, Dokhelar MC, Sodroski JG, Haseltine WA. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(9):3351-5.
- Grassmann R, Fleckenstein B. Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. *J Virol*. 1989 Apr;63(4):1818-21.
- Guo BC, Saxon A. B cell lines from a subset of patients with common variable immunodeficiency undergo enhanced apoptosis associated with an increased display of CD95 (Apo-1/fas), diminished CD38 expression, and decreased IgG and IgA production. *Cell Immunol*. 1995 Nov;166(1):83-92.
- Hammarström L, Smith CIE. HLA-A, B, C and DR antigens in immunoglobulin A deficiency. *Tissue antigens* 1983; 21: 75-79.
- Hara M, Kitani A, Harigai M, Suzuki K, Hirose T, Kawakami M, Kawagae M, Nakamura H. (1991). Discrete association of CD3 and CD4 molecules in T-cell stimulation acting through the autologous mixed lymphocyte reaction and the TCR/CD3-cell receptor complex in human. *Scand. J. Immunol*. 33: 141-149.
- Hauber I, Fischer MB, Eibl MM. Patients with common variable immunodeficiency (CVID) display aberrant IL-2 and IFN-gamma mRNA levels. *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):25-9.
- Hauber I, Fischer MB, Maris M, Eibl MM. Reduced IL-2 expression upon antigen stimulation is accompanied by deficient IL-9 gene expression in T cells of patients with CVID. *Scand J Immunol*. 1995 Mar;41(3):215-9.
- Hauke G, Hadam M, Epplen JT, Gahr M, Hollmann A, Peter HH. Predominant immunoglobulin gene rearrangements in two patients with immunodeficiency: restricted use of V gene segments and DNA hypermethylation. *Immunobiology*. 1989 Feb;178(4-5):449-61.
- Henderson EE, Tsygankov AY, Merlo JJ, Romano G, Guan M. Altered replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in T cell lines retrovirally transduced to express Herpesvirus saimiri proteins StpC and/or Tip. *Virology*. 1999 Nov 10;264(1):125-33.
- Herbst EW, Armbruster M, Rump JA, Buscher HP, Peter HH. Intestinal B cell defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1994 Feb;95(2):215-21.
- Hess S, Kurrle R, Lauffer L, Riethmuller G, Engelmann H. A cytotoxic CD40/p55 tumor necrosis factor receptor hybrid detects CD40 ligand on herpesvirus saimiri-transformed T cells. *Eur J Immunol*. 1995 Jan;25(1):80-6.
- Iglesias J, Matamoros N, Raga S, Ferrer JM, Mila J. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 1999; 117:138-46.
- Inoue Y, Kondo N, Motoyoshi F, Inoue R, Orii T. Abnormal responses of common variable immunodeficiency patients' B cells to *Staphylococcus aureus* Cowan I and interleukin-2. *Acta Paediatr*. 1993 Apr;82(4):404-7.
- Inoue Y, Kondo N, Motoyoshi F, Inoue R, Orii T. Interleukin-2 and interferon-gamma production by peripheral blood lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1994 May-Jun;4(3):122-5.

- Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263: 1136-1139.
- Jacinto E, Werlin G, Karin M. (1998). Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity* 8: 31-41.
- Jahreis A, Yousif Y, Rump JA, Drager R, Vogt A, Peter HH, Schlesier M. Two novel cationic staphylococcal proteins induce IL-2 secretion, proliferation and immunoglobulin synthesis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of both healthy controls and patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 1995 Jun;100(3):406-11.
- Johnson ML, Keeton LG, Zhu ZB, Volanakis JE, Cooper MD, Schroeder HW Jr. Age-related changes in serum immunoglobulins in patients with familial IgA deficiency and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 1997 Jun;108(3):477-83.
- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Samelson LE. (1990). Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* 144: 1591-1599.
- Jung JU, Lang SM, Jun T, Roberts TM, Veillette A, Desrosiers RC. Downregulation of Lck-mediated signal transduction by tip of herpesvirus saimiri. *J Virol.* 1995 Dec;69(12):7814-22.
- Junker U, v d Heyden-Rynsch B, Diener C, Vogelsang H, Jager L. In patients with common variable immunodeficiency, interleukin-6 and expression of its receptor on B-cells are normal. *Cell Biol Int.* 1993 Jun;17(6):609-14.
- Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, Futatani T, Nomura K, Yamamoto J, Yoshida T, Agematsu K, Komiyama A, Miyawaki T. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol.* 2000 Jun;120(3):512-7.
- Kaneko H, Ariyasu T, Inoue R, Fukao T, Kasahara K, Teramoto T, Matsui E, Hayakawa S, Kondo N. Expression of Pax5 gene in human haematopoietic cells and tissues: comparison with immunodeficient donors. *Clin Exp Immunol.* 1998 Feb;111(2):339-44.
- Katial RK, Lieberman MM, Muehlbauer SL, Lust JA, Hamilos DL. Gamma delta T lymphocytosis associated with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 1997 Jan;17(1):34-42.
- Kato Y, Kondo N, Yano M, Inoue R, Ozawa T, Orii T. Expression of VpreB gene in common variable immunodeficiency. *Exp Clin Immunogenet.* 1994;11(1):53-8.
- Klausner RD, Samelson, LE. (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 64: 875-878.
- Klein JL, Fickenscher H, Holliday JE, Biesinger B, Fleckenstein B. Herpesvirus saimiri immortalized gamma delta T cell line activated by IL-12. *J Immunol.* 1996 Apr 15;156(8):2754-60.
- Knappe A, Hiller C, Thureau M, Wittmann S, Hofmann H, Fleckenstein B, Fickenscher H. The superantigen-homologous viral immediate-early gene ie14/vsag in herpesvirus saimiri-transformed human T cells. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):9124-33.
- Kondo N, Inoue R, Yano M, Hayashi T, Miwa Y, Kasahara K, Yamasaki M, Utsumi M, Shinbara M, Orii T. Defective calcium-dependent signal transduction in B lymphocytes of a certain common variable immunodeficiency. *Exp Clin Immunogenet.* 1993;10(1):16-20.
- Kondo N, Motoyoshi F, Kasahara K, Inoue Y, Mori S, Orii T. Failure of c-myc gene expression in B cells of some patients with common variable immunodeficiencies. *Exp Clin Immunogenet.* 1992;9(2):109-16.

- Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med.* 1997 Oct 15;127(8 Pt 1):613-7.
- Medveczky MM, Geck P, Sullivan JL, Serbousek D, Djeu JY, Medveczky PG. IL-2 independent growth and cytotoxicity of herpesvirus saimiri-infected human CD8 cells and involvement of two open reading frame sequences of the virus. *Virology.* 1993 Oct;196(2):402-12.
- Meinl E, Hohlfeld R, Wekerle H, Fleckenstein B. Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri. *Immunol Today.* 1995 Feb;16(2):55-8.
- Meinl E, 't Hart BA, Bontrop RE, Hoch RM, Iglesias A, de Waal Malefyt R, Fickenscher H, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Wekerle H, et al. Activation of a myelin basic protein-specific human T cell clone by antigen-presenting cells from rhesus monkeys. *Int Immunol.* 1995 Sep;7(9):1489-95.
- Merlo JJ, Romano G, Gordon SS, Feshchenko EA, Peng G, Henderson EE, Tsygankov AY. Human T cells transduced by a retroviral vector to express Herpesvirus saimiri proteins TIP and STPC. *Anticancer Res.* 1998 Jul-Aug;18(4A):2389-96.
- Mittrucker HW, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Fleischer B. Herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes: normal functional phenotype and preserved T cell receptor signalling. *Int Immunol.* 1993;5:985-90.
- Mittrucker HW, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Fleischer B. CD2-mediated autocrine growth of herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1992 Sep 1;176(3):909-13.
- Moller G (ed). (1993). Positive T-cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.* 135: 5-242.
- Mori S, Kondo N, Motoyoshi F, Kaneko H, Inoue Y, Orii T. Diversity in DNA rearrangements and in RNA expressions of immunoglobulin gene on common variable immunodeficiency. *Eur J Immunogenet.* 1992 Oct;19(5):273-85.
- Mullighan CG, Fanning GC, Chapel HM, Welsh KI. TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. *J Immunol.* 1997 Dec 15;159(12):6236-41.
- Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol.* 2000 Feb;51(2):111-22.
- Munoz Bellido FJ, De La Calle A, Monteseirin FJ, Gonzalez J, Gimenez MJ, Conde J. Peripheral blood CD8- T-cell subsets in common variable immunodeficiency. *Allergy.* 1996 Aug;51(8):589-90.
- Nick S, Fickenscher H, Biesinger B, Born G, Jahn G, Fleckenstein B. Herpesvirus saimiri transformed human T cell lines: a permissive system for human immunodeficiency viruses. *Virology.* 1993 Jun;194(2):875-7.
- Noh DY, Shin SH, Rhee SG. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochem. Biophys. Acta* 1242: 99-113.
- Nonoyama S, Farrington M, Ishida H, Howard M, Ochs HD. Activated B cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin. *J Clin Invest.* 1993 Sep;92(3):1282-7.
- Nonoyama S, Farrington ML, Ochs HD. Effect of IL-2 on immunoglobulin production by anti-CD40-activated human B cells: synergistic effect with IL-10 and antagonistic effect with IL-4. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Sep;72(3):373-9.
- Noraz N, Saha K, Ottones F, Smith S, Taylor N. Constitutive activation of TCR signaling molecules in IL-2-independent Herpesvirus saimiri-transformed T cells. *J Immunol.* 1998 Mar 1;160(5):2042-5.
- Nordoy I, Muller F, Aukrust P, Froland SS. Adhesion molecules in common variable immunodeficiency (CVID)--a decrease in L-selectin-positive T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1998 Nov;114(2):258-63.

- North ME, Akbar A, Borthwick N, Webster AD, Farrant J. Anti-CD28 enhances defective mitogen responses by mononuclear cells from patients with common variable immunodeficiency. *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):17-8.
- North ME, Akbar AN, Borthwick N, Sagawa K, Funauchi M, Webster AD, Farrant J. Co-stimulation with anti-CD28 (Kolt-2) enhances DNA synthesis by defective T cells in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1994 Feb;95(2):204-8.
- North ME, Ivory K, Funauchi M, Webster AD, Lane AC, Farrant J. Intracellular cytokine production by human CD4+ and CD8+ T cells from normal and immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 1996 Sep;105(3):517-22.
- North ME, Spickett GP, Webster AD, Farrant J. Raised serum levels of CD8, CD25 and beta 2-microglobulin in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1991 Nov;86(2):252-5.
- North ME, Webster AD, Farrant J. Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN-gamma) in CD28+ ('cytotoxic') and CD28- ('suppressor') CD8+ subsets. *Clin Exp Immunol*. 1998 Jan;111(1):70-5.
- Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369: 497-502.
- Nossal GJV. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76: 229-239.
- Olerup O, Smith CI, Bjorkander J, Hammarstrom L. Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15;89(22):10653-7.
- Olerup O, Smith CIE, Hammarström L. Different amino acids at position 57 of HLA-DQ β chain associated with susceptibility and resistance to IgA deficiency. *Nature* 1990; 347: 289-290.
- Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansotegui IJ, Giovannetti A, Pierdominici M, Aiuti F, Pandolfi F. IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol*. 1997 Jul;46(1):86-90.
- Orloff DG, Ra C, Frank SJ, Klausner RD, Kinet JP. (1990). Family of disulphide-linked dimers containing ζ and η chains of the T-cell receptor and the γ chain of Fc receptors. *Nature* 347: 189-191.
- Pacheco-Castro A, Alvarez-Zapata D, Serrano-Torres P, Regueiro JR. Signaling through a CD3 gamma-deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 1998 Sep 15;161(6):3152-60.
- Pacheco-Castro A, Marquez C, Toribio ML, Ramiro AR, Trigueros C, Regueiro JR. Herpesvirus saimiri immortalization of alpha beta and gamma delta human T-lineage cells derived from CD34+ intrathymic precursors in vitro. *Int Immunol*. 1996 Nov;8(11):1797-805.
- Palanduz S, Palanduz A, Yalcin I, Somer A, Ones U, Ustek D, Ozturk S, Salman N, Guler N, Bilge H. In vitro chromosomal radiosensitivity in common variable immune deficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998 Feb;86(2):180-2.
- Pandolfi F, Paganelli R, Cafaro A, Oliva A, Giovannetti A, Scala E, Quinti I, Aiuti F. Abnormalities of lymphocyte subpopulations in CVI do not correlate with increased production of IL-6. *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):19-23.
- Pandolfi F, Paganelli R, Oliva A, Quinti I, Polidori V, Fanales-Belasio E, Guerra E, Aiuti F. Increased IL-6 gene expression and production in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1993 May;92(2):239-44.
- Pollicino T, Pernice F, Campo S et al. Severe outcome of hepatitis B virus (HBV) infection and lack of HBV e antigen-defective virus emergence in patients homozygous for HLA class I alleles. *J Gen Virol* 1996; 77: 1833-1836.

- Kondratenko I, Amlot PL, Webster AD, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group. *Clin Exp Immunol.* 1997 Apr;108(1):9-13.
- Kostyu DD, Dawson DV, Elias S et al. Deficit of HLA homozygotes in a Caucasian isolate. *Hum Immunol* 1993; 37: 135-142.
- Kraft MS, Henning G, Fickenscher H, Lengenfelder D, Tschopp J, Fleckenstein B, Meinel E. Herpesvirus saimiri transforms human T-cell clones to stable growth without inducing resistance to apoptosis. *J Virol.* 1998 Apr;72(4):3138-45.
- Krissansen, G.W., Owen, M.J., Verbi, W., Crumpton M.J. (1986). Primary structure of the T3 γ subunit of the T3/T cell antigen receptor complex deduced from cDNA sequences: evolution of the T3 γ and δ subunits. *EMBO J.* 5: 1799-1808.
- Lacey SF, Weinhold KJ, Chen CH, McDanal C, Oei C, Greenberg ML. Herpesvirus saimiri transformation of HIV type 1 suppressive CD8⁺ lymphocytes from an HIV type 1-infected asymptomatic individual. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 Apr 10;14(6):521-31.
- Lee H, Choi JK, Li M, Kaye K, Kieff E, Jung JU. Role of cellular tumor necrosis factor receptor-associated factors in NF- κ B activation and lymphocyte transformation by herpesvirus Saimiri STP. *J Virol.* 1999 May;73(5):3913-9.
- Levy Y, Gupta N, Le Deist F, Garcia C, Fischer A, Weill JC, Reynaud CA. Defect in IgV gene somatic hypermutation in common variable immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13135-40.
- Li H, Lebedeva MI, Llera AS, Fields BA, Brenner MB, Maurizza MB. (1998). Structure of the V δ domain of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* 391: 502-506.
- Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, Jung JU. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol.* 1997 Mar;71(3):1984-91.
- Loh, C., Shaw, K.T., Carew, J., Viola, J.P.B., Luo, C., Perrino, B.A., Rao, A. (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* 271: 10884-10891.
- Lund T, Medveczky MM, Medveczky PG. Herpesvirus saimiri Tip-484 membrane protein markedly increases p56lck activity in T cells. *J Virol.* 1997 Jan;71(1):378-82.
- Lund T, Medveczky MM, Neame PJ, Medveczky PG. A herpesvirus saimiri membrane protein required for interleukin-2 independence forms a stable complex with p56lck. *J Virol.* 1996 Jan;70(1):600-6.
- Lund TC, Prator PC, Medveczky MM, Medveczky PG. The Lck binding domain of herpesvirus saimiri tip-484 constitutively activates Lck and STAT3 in T cells. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1689-94.
- Mackewicz CE, Orque R, Jung J, Levy JA. Derivation of herpesvirus saimiri-transformed CD8⁺ T cell lines with noncytotoxic anti-HIV activity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Mar;82(3):274-81.
- Maggi E, Almerigogna F, Del Prete G, Romagnani S. Abnormal B cell helper activity by virus-infected human CD4⁺ T cells. *Semin Immunol.* 1993 Dec;5(6):449-55.
- Majolini MB, D'Elis MM, Boncristiano M, Galieni P, Del Prete G, Telford JL, Baldari CT. Uncoupling of T-cell antigen receptor and downstream protein tyrosine kinases in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Jul;84(1):98-102.
- Malissen BH, Schmitt-Verhulst AM. (1993). Transmembrane signalling through the T cell receptor-CD3 complex. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 324-333.
- Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, De St. Groth B, Davis MM. (1991). Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254: 1788-1791.

- Powis SH, Cooper MD, Trowsdale J, Zhu ZB, Volanakis JE. Major histocompatibility haplotypes associated with immunoglobulin-A deficiency and common variable immunodeficiency: analysis of the peptide transporter genes TAP1 and TAP2. *Tissue Antigens*. 1994 Apr;43(4):261-5.
- Pujol RM, Nadal C, Taberner R, Diaz C, Miralles J, Alomar A. Cutaneous granulomatous lesions in common variable immunodeficiency: complete resolution after intravenous immunoglobulins. *Dermatology*. 1999;198(2):156-8.
- Punnonen J, Kainulainen L, Ruuskanen O, Nikoskelainen J, Arvilommi H. IL-4 synergizes with IL-10 and anti-CD40 MoAbs to induce B-cell differentiation in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol*. 1997 Feb;45(2):203-12.
- Putney JW. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624.
- Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H, Schlossman SF. (1982). Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell* 30: 735-743.
- Report of a WHO Scientific Group. Primary Immunodeficiency Diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: Suplemento 1
- Rodriguez-Gallego C, Corell A, Pacheco A, Timon M, Regueiro JR, Allende LM, Madrono A, Arnaiz-Villena A. Herpes virus saimiri transformation of T cells in CD3 gamma immunodeficiency: phenotypic and functional characterization. *J Immunol Methods*. 1996 Nov 13;198(2):177-86.
- Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med*. 1995 Aug 17;333(7):431-40
- Rump JA, Jahreis A, Schlesier M, Drager R, Melchers I, Peter HH. Possible role of IL-2 deficiency for hypogammaglobulinaemia in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1992 Aug;89(2):204-10.
- Rosentein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. (1993). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354: 233-235.
- Rowen L, Koop BF, Hood L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 272: 1755-1762.
- Rump JA, Jahreis A, Schlesier M, Stecher S, Drager R, Struff WG, Peter HH. Effects of interleukin 2 therapy in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):37-42
- Rump JA, Jahreis A, Schlesier M, Stecher S, Peter HH. A double-blind, placebo-controlled, crossover therapy study with natural human IL-2 (nhuIL-2) in combination with regular intravenous gammaglobulin (IVIg) infusions in 10 patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 1997 Nov;110(2):167-73.
- Rump JA, Jakschiess D, Walker U, Schlesier M, von Wussow P, Peter HH. Common variable immunodeficiency (CVID) and MxA-protein expression in blood leucocytes. *Clin Exp Immunol*. 1995 Jul;101(1):89-93.
- Saadawi AM, L'Faqihi F, Diab BY, Sol MA, Enault G, Coppin H, Cantagrel A, Biesinger B, Fleckenstein B, Thomsen M. Dominant clones in immortalized T-cell lines from rheumatoid arthritis synovial membranes. *Tissue Antigens*. 1997 May;49(5):431-7.
- Saha K, Bentsman G, Chess L, Volsky DJ. Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. *J Virol*. 1998 Jan;72(1):876-81.
- Saha K, Caruso M, Volsky DJ. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of herpesvirus saimiri-immortalized human CD4-positive T lymphoblastoid cells: evidence of enhanced HIV-1 replication and cytopathic effects caused by endogenous interferon-gamma. *Virology*. 1997 Apr 28;231(1):1-9.
- Saha K, McKinley G, Volsky DJ. Improvement of Herpesvirus saimiri T cell immortalization procedure to generate multiple CD4+ T-cell clones from peripheral blood lymphocytes of AIDS patients. *J Immunol Methods*. 1997 Aug 7;206(1-2):21-3.

- Saha K, Sova P, Chao W, Chess L, Volsky DJ. Generation of CD4+ and CD8+ T-cell clones from PBLs of HIV-1 infected subjects using herpesvirus saimiri. *Nat Med.* 1996 Nov;2(11):1272-5.
- Saha K, Ware R, Yellin MJ, Chess L, Lowy I. Herpesvirus saimiri-transformed human CD4+ T cells can provide polyclonal B cell help via the CD40 ligand as well as the TNF-alpha pathway and through release of lymphokines. *J Immunol.* 1996 Nov 1;157(9):3876-85.
- Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, Good RA. Three distinct stages of B-cell defects in common varied immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(19):6008-12.
- Skarsvag S, Hansen KE, Holst A et al. Distribution of HLA class II alleles among scandinavian patients with systemic lupus erythematosus (SLE): an increased risk of SLE among non (DRB1*03, DQA1*05011 DQB1*0201) class II homozygotes? *Tissue Antigens* 1992; 40: 128-133.
- Samelson LE, Phillips AS, Luong ET, Klausner RD. (1990). Association of the fyn protein tyrosine kinase with the T cell antigen receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 4358-4362.
- Sanal O, Ersoy F, Yel L, Tezcan I, Metin A, Ozyurek H, Gariboglu S, Fikrig S, Berkel AI, Rijkers GT, Zegers BJ. Impaired IgG antibody production to pneumococcal polysaccharides in patients with ataxia-telangiectasia. *J Clin Immunol.* 1999 Sep;19(5):326-34.
- Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F. (1991). Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur. J. Immunol.* 21: 2317-2325.
- Sarosi GA, Thomas PM, Egerton M, Phillips AF, Kim KW, Bonvini E, Samelson LE. (1992). Characterization of the T cell antigen receptor-p60fyn protein tyrosine kinase association by chemical cross-linking. *Int. Immunol.* 4: 1211-1217.
- Saxon A, Keld B, Braun J, Dotson A, Sidell N. Long-term administration of 13-cis retinoic acid in common variable immunodeficiency: circulating interleukin-6 levels, B-cell surface molecule display, and in vitro and in vivo B-cell antibody production. *Immunology.* 1993 Nov;80(3):477-87.
- Saxon A, Keld B, Diaz-Sanchez D, Guo BC, Sidell N. B cells from a distinct subset of patients with common variable immunodeficiency (CVID) have increased CD95 (Apo-1/fas), diminished CD38 expression, and undergo enhanced apoptosis. *Clin Exp Immunol.* 1995 Oct;102(1):17-25.
- Schaffer FM, Palermos J, Zhu ZB et al. Individuals with IgA deficiency and common variable immunodeficiency share polymorphisms of major histocompatibility complex class III genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8015-8019.
- Schroeder HW Jr, Zhu ZB, March RE, Campbell RD, Berney SM, Nedospasov SA, Turetskaya RL, Atkinson TP, Go RC, Cooper MD, Volanakis JE. Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA-DR3, -B8, -A1 haplotypes. *Mol Med.* 1998 Feb;4(2):72-86.
- Schwartz R, Porat YB, Handzel Z, Sthoeger Z, Garty BZ, Confino-Cohen R, Levy J, Zan-Bar I. Identification of a subset of common variable immunodeficiency patients with impaired B-cell protein tyrosine phosphorylation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 Nov;6(6):856-60.
- Scott LJ, Bryant A, Webster AD, Farrant J. Failure in IgA secretion by surface IgA-positive B cells in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 1994 Jan;95(1):10-3.
- Sewell WA, North ME, Cambrono R, Webster AD, Farrant J. In vivo modulation of cytokine synthesis by intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol.* 1999 Jun;116(3):509-15.
- Shaw AS, Chalupny J, Whitney JA, Hammond C, Amrein KE, Kavathas P, Sefton BM, Rose JK. (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediated-binding to the amino-terminal domain of the p56^{lck} tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1853-1862.
- Slyper AH, Pietryga D. Conversion of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency in an adolescent female with 18q deletion syndrome. *Eur J Pediatr.* 1997 Feb;156(2):155-6

Spickett GP, Farrant J, North ME, Zhang JG, Morgan L, Webster AD. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol Today*. 1997 Jul;18(7):325-8

Spickett GP, Matamoros N, Farrant J. Lymphocyte surface phenotype in common variable immunodeficiency. *Dis Markers*. 1992 Mar-Apr;10(2):67-80.

Spickett GP, Webster AD, Farrant J. Cellular abnormalities in common variable immunodeficiency. *Immunodef Rev*. 1990;2(3):199-219.

Spickett GP, Zhang JG, Green T, Shrimankar J. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency: effect on immunoglobulin replacement therapy and response to steroids and splenectomy. *J Clin Pathol*. 1996;49:431-4.

Stagg A, Knight SC, Webster AD, Farrant J. Failure of primary and secondary T cell responses in common variable immunodeficiency. *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):13-4.

Stagg AJ, Funauchi M, Knight SC, Webster AD, Farrant J. Failure in antigen responses by T cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 1994 Apr;96(1):48-53.

Strannegard O, Bjorkander J, Hellstrand K, Pacsa A, Hermodsson S, Hanson LA. Interferon and beta 2-microglobulin in patients with common variable immunodeficiency or selective IgA deficiency. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1987;84(3):217-22.

Swaak AJ, van den Brink HG. Common variable immunodeficiency in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1996 Jun;5(3):242-6.

Szamel M, Resch K. (1995). T-cell antigen receptor induced signal transduction pathways. Activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur. J. Biochem*. 228: 1-15.

Thon V, Eggenbauer H, Wolf HM, Fischer MB, Litzman J, Lokaj J, Eibl MM. Antigen presentation by common variable immunodeficiency (CVID) B cells and monocytes is unimpaired. *Clin Exp Immunol*. 1997 Apr;108(1):1-8.

Thon V, Wolf HM, Sasgary M, Litzman J, Samstag A, Hauber I, Lokaj J, Eibl MM. Defective integration of activating signals derived from the T cell receptor (TCR) and costimulatory molecules in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Exp Immunol*. 1997 Nov;110(2):174-81.

Troidl B, Simmer B, Fickenscher H, Muller-Fleckenstein I, Emmrich F, Fleckenstein B, Gebhart E. Karyotypic characterization of human T-cell lines immortalized by Herpesvirus saimiri. *Int J Cancer*. 1994 Feb 1;56(3):433-8.

Trowbridge IS, Thomas ML. (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol*. 12: 85-116.

Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; 72: 279-290.

Tsygankov AY, Romano G. Mechanisms of cell transformation by Herpesvirus saimiri. *Anticancer Res*. 1999 Mar-Apr;19(2A):973-83.

Tunnacliffe A, Buluwela L, Rabbits TH. (1987). Physical linkage of three CD3 genes on human chromosome 11. *EMBO J*. 6: 2953-2957.

Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of the tyrosine kinase p56^{lck} with the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60: 755-765.

van der Ven AJ, Boers GH. Oxidative stress in immunodeficiency. *Eur J Clin Invest*. 1997 Sep;27(9):731-2.

van Lier R, Bouwer M, Groot E, Kramer I, Aarden L, Verhoeven A. (1991). T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signaling pathways. *Eur. J. Immunol*. 21: 1775-1778.

- van Oers NS, Killeen N, Weiss A. (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1053-1062.
- Vella C, Fickenscher H, Atkins C, Penny M, Daniels R. Herpesvirus saimiri-immortalized human T-cells support long-term, high titred replication of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Gen Virol.* 1997 Jun;78 (Pt 6):1405-9.
- Vella C, Gregory J, Bristow R, Troop M, Easterbrook P, Zheng N, Daniels R. Isolation of HIV type 1 from long-term nonprogressors in Herpesvirus saimiri-immortalized T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999;15(12):1145-7.
- Vella C, Zheng NN, Vella G, Atkins C, Bristow RG, Fickenscher H, Daniels RS. Enhanced replication of M-tropic HIV-1 strains in Herpesvirus saimiri immortalised T-cells which express CCR5. *J Virol Methods.* 1999;79(1):51-63.
- Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the Src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; 361: 226-233.
- Viallard JF, Pellegrin JL, Moreau JF. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med.* 1998 May 1;128(9):781-2; discussion 782-3.
- Volanakis JE, Zhu ZB, Schaffer FM, Macon KJ, Palermos J, Barger BO, Go R, Campbell RD, Schroeder HW Jr, Cooper MD. Major histocompatibility complex class III genes and susceptibility to immunoglobulin A deficiency and common variable immunodeficiency. *J Clin Invest.* 1992 Jun;89(6):1914-22.
- von Boehmer H, Kisielow P, Lishi H, Scott B, Borgulya P, Teh HS. (1989). The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the $\alpha\beta$ receptor for antigen. *Immunol. Rev.* 109: 143-151.
- Vorechovsky I, Blennow E, Nordenskjold M, Webster AD, Hammarstrom L. A putative susceptibility locus on chromosome 18 is not a major contributor to human selective IgA deficiency: evidence from meiotic mapping of 83 multiple-case families. *J Immunol.* 1999 Aug 15;163(4):2236-42.
- Vorechovsky I, Cullen M, Carrington M, Hammarstrom L, Webster AD. 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 Apr 15;164(8):4408-16.
- Vorechovsky I, Litzman J, Lokaj J, Sobotkova R. Family studies in common variable immunodeficiency. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1991;35(1):17-26.
- Vorechovsky I, Scott D, Haeney MR, Webster DA. Chromosomal radiosensitivity in common variable immune deficiency. *Mutat Res.* 1993 Dec;290(2):255-64.
- Vorechovsky I, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L. Genetic Linkage of IgA Deficiency to the Major Histocompatibility Complex: Evidence for Allele Segregation Distortion, Parent-of-Origin Penetrance Differences, and the Role of Anti-IgA Antibodies in Disease Predisposition. *Am J Hum Genet.* 1999 Apr;64(4):1096-1109.
- Vorechovsky I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster AD, Bjorkander J, Smith CI, Hammarstrom L. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Nov;77(2):185-92.
- Vukmanovic S, Vuckovic S, Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Abinun M. An unusual T-cell surface phenotype in vivo correlates with the failure to proliferate and produce IL-2 in vitro in a patient with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992 Dec;65(3):261-70.
- Vyas GN, Perkins HA, Yang YM, Basantani GK. Healthy blood donors with selective absence of immunoglobulin A: prevention of anaphylactic transfusion reactions caused by antibodies to Ig A. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 838-842.
- Yang Y, Wilson JM. (1996). CD40 ligand dependent T cell activation: requirement of B7/CD28 signaling through CD40. *Science* 278: 1862-1864.
- Washington K, Stenzel TT, Buckley RH, Gottfried MR. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia. *Am J Surg Pathol.* 1996 Oct;20(10):1240-52.

Wegener AMK, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F, Malissen B. (1992). The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68: 83-95.

Weber F, Meinel E, Drexler K, Czlonkowska A, Huber S, Fickenscher H, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Wekerle H, Hohlfeld R. Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11049-53.

Weiss A, Littman DR. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263-274.

Wiese N, Tsygankov AY, Klauenberg U, Bolen JB, Fleischer B, Broker BM. Selective activation of T cell kinase p56lck by Herpesvirus saimiri protein tip. *J Biol Chem*. 1996 Jan 12;271(2):847-52.

Wright JJ, Wagner DK, Blaese RM, Hagengruber C, Waldmann TA, Fleisher TA. Characterization of common variable immunodeficiency: identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features. *Blood*. 1990 Nov 15;76(10):2046-51.

Yao Z, Maraskovsky E, Spriggs MK, Cohen JI, Armitage RJ, Alderson MR. Herpesvirus saimiri open reading frame 14, a protein encoded by T lymphotropic herpesvirus, binds to MHC class II molecules and stimulates T cell proliferation. *J Immunol*. 1996 May 1;156(9):3260-6.

Yasukawa M, Inoue Y, Kimura N, Fujita S. immortalization of human T cells expressing T-cell receptor gamma delta by herpesvirus saimiri. *J Virol*. 1995 Dec;69(12):8114-7.

Yoon DW, Lee H, Seol W, DeMaria M, Rosenzweig M, Jung JU. Tap: a novel cellular protein that interacts with tip of herpesvirus saimiri and induces lymphocyte aggregation. *Immunity*. 1997 May;6(5):571-82.

Zauber NP, Schrader Z. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med*. 1998 May 1;128(9):782-3

Zenone T. Re: IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Jun;83(3):318.

Zhang JG, Morgan L, Spickett GP. L-selectin in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a comparative study with normal individuals. *Clin Exp Immunol*. 1996 May;104(2):275-9.

Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998 Mar;86(3):298-304.

Ziegler EM, Seung LM, Soltani K, Medenica MM. Cutaneous granulomas with two clinical presentations in a patient with common variable immunodeficiency. *J Am Acad Dermatol*. 1997 Sep;37(3 Pt 1):499-500.

Zielen S, Bauscher P, Hofmann D, Meuer SC. Interleukin 10 and immune restoration in common variable immunodeficiency. *Lancet*. 1993 Sep 18;342(8873):750-1.

Zielen S, Dengler TJ, Bauscher P, Meuer SC. Defective CD2 T cell pathway activation in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 1994 May;96(2):253-9.

Zielen S, Sehrt P, Rahmig J, Hofmann D, Briere F, Meuer SC. Reconstitution of immunoglobulin production in patients with variable immunodeficiency syndrome (CVI) by the CD40 system and IL-10.

Zuccaro G, Della Bella S, Polizzi B, Vanoli M, Scorza R. Common variable immunodeficiency following Epstein-Barr virus infection. *J Clin Lab Immunol*. 1997;49(1):41-5.

Zullo A, Romiti A, Rinaldi V, Vecchione A, Tomao S, Aiuti F, Frati L, Luzi G. Gastric pathology in patients with common variable immunodeficiency. *Gut*. 1999 Jul;45(1):77-81.

Anexos

INMORTALIZACION CON *HERPESVIRUS SAIMIRI* DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMUN VARIABLE

Juan A. García Cabanillas¹, M^a Cruz García Rodríguez², Rosario Cambroner², Gumersindo Fontán², Alberto Pacheco¹, A. Ferreira² y José R. Regueiro¹

¹Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid,

²Servicio de Inmunología. Hospital "La Paz". Madrid

El término Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) describe un síndrome, todavía incompletamente definido, caracterizado por una producción defectuosa de anticuerpos. Se han postulado defectos primarios en el complejo principal de histocompatibilidad, en células B y en células T. La reciente descripción de la HiperIgM ligada al X como un defecto de CD154 (CD40L), que es una molécula de linfocitos T, ha reavivado el papel de estos últimos en la IDCV. En el presente trabajo immortalizamos linfocitos T de 38 pacientes con IDCV y sus respectivos controles sanos utilizando *Herpesvirus saimiri*. Se obtuvieron 14 líneas CD4+, 97 líneas CD8+ y 2 líneas TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8-. El número de líneas CD4+ obtenido en pacientes con IDCV (en ausencia de PHA) resultó ser significativamente superior al de sus controles (47% vs 8%, $p < 0.01$), lo cual puede ser debido a una mayor activación *in vivo*, quizá por las repetidas infecciones que padecen. Se demostró, asimismo, que el análisis de la inducción de CD154 (CD40L) en las células immortalizadas es posible, y que los 4 pacientes analizados (dos CD8+ y dos CD4+) no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles. Por lo tanto, concluimos que la inmortalización de linfocitos T pacientes con IDCV utilizando *H. saimiri*, puede ser un modelo útil para preservar o descartar los defectos funcionales de dicho linaje.

Palabras clave: CD154. *Herpesvirus saimiri*. Inmortalización. Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV). Linfocitos T.

Correspondencia y separatas:

José R. Regueiro
Inmunología. Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid
Tel: +34 394 16 42 Fax: +34 394 16 41
Correo-E: regueiro@eucmax.sim.ucm.es

HERPESVIRUS SAIMIRI-IMMORTALIZED T CELLS FROM PATIENTS WITH COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY

The term Common Variable Immunodeficiency (CVID) is used to describe an incompletely defined syndrome characterized by defective antibody formation. Intrinsic MHC, B and T cells defects have been reported. The recent description of X-linked hyper IgM syndrome as a T cell (CD154) defect, has rekindled the discussion about the role of these cells in CVID. We have immortalized T cells from 38 CVID patients and his respective healthy controls using *Herpesvirus saimiri*. We have obtained 14 CD4+ cell lines, 97 CD8+ cell lines and 2 TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8- cell lines. The number of CVID CD4+ T cell lines obtained was significantly higher than that of normal controls (47% vs 8%, $p < 0.01$) possibly due to the higher activation *in vivo* of the former, caused by recurrent infections. Likewise, we have demonstrated that it is possible to induce CD154 on these cells, although we did not find significant differences between the analyzed CVID cells (two CD8+ and two CD4+ cell lines) and normals. Therefore, we conclude that *H. saimiri* immortalization of CVID T cells may be useful as a model to preserve or rule out functional T cell defects.

Key words: CD154. Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Herpesvirus saimiri*. Immortalization. T cells.

Abreviaturas: FCS (Fetal Calf Serum): Suero de ternera fetal. HTLV-I (Human T Lymphocyte Virus type I): Virus de los linfocitos T humanos tipo I. HVS: *Herpesvirus saimiri*. IDCV: Inmunodeficiencia Común Variable. MHC: Complejo principal de Histocompatibilidad. PHA: fitohe-maglutinina. PMA: éster de forbol. TCR (T cell receptor): Receptor de la célula T.

INTRODUCCION

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) es una hipogammaglobulinemia heterogénea, generalmente G y A, pero a menudo también M, de etiología desconocida, (Figura 1). La primera manifestación clínica, en la mayoría de los casos, son las infecciones sinopulmonares recurrentes (otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonías), provocadas por bacterias piógenas y con una presentación de tipo crónica más que aguda o diseminada¹. A diferencia de los pacientes con enfermedad de Bruton (Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X o deficiencia de btk), existe una alta incidencia de infecciones y/o alteraciones gastrointestinales, granulomas y autoinmunidad².

Se han postulado defectos primarios en células T, en células B y en el MHC^{3,4}. Lo más probable es que la IDCV agrupe varios síndromes. El reciente hallazgo de que otra inmunodeficiencia clásicamente atribuida a los linfocitos B como la hiper-IgM ligada al X, haya resultado ser debida a mutaciones en CD40L (CD154)⁵, que es una molécula de los linfocitos T, ha reavivado la polémica del papel de las células T en la IDCV⁶. Diferentes estudios han descrito defectos en la distribución de subpoblaciones y en la función^{7,8} de los linfocitos T en al menos una fracción de los pacientes con IDCV. Varias subpoblaciones (CD4+, CD8+)⁹ y moléculas de membrana (CD2, CD3, TCR, CD40L...)¹⁰, se han visto implicadas en los defectos funcionales y también algunas citocinas (IL2, IL4, IFN γ , TNF α)^{11,12} (Fig. 1). En algunos casos, sin embargo, el defecto se achacaba a los monocitos¹³. Es probable que entre los pacientes con IDCV con defectos en los linfocitos T de sangre periférica, haya dos grupos: pacientes con defectos primarios y estables de los linfocitos T y pacientes con defectos secundarios. Desgraciadamente, cada paciente es probablemente único, la disponibilidad de sangre es limitada (lo que impide hacer estudios bioquímicos) y los estudios comparativos son por ello muy difíciles.

Hasta ahora los estudios celulares que implicaban el trabajo con células T humanas se llevaban a cabo utilizando linfocitos primarios, o líneas celulares de linfocitos T dependientes de IL-2 y a menudo, también de reestimulaciones semanales con células alogénicas. Este sistema es, sin embargo, limitado, ya que la vida media de estas líneas celulares no es muy larga y el número de células que se obtiene siempre es finito. La inmortalización de linfocitos T con el retrovirus HTLV-1 eliminaba estos problemas¹⁴, pero tenía en cambio, un gran inconveniente: tras una primera fase IL-2-dependiente, los linfocitos T se hacen independientes de esta citocina y pierden el receptor clonotípico, haciéndolos inútiles para el análisis funcional específico. Otro problema añadido es que el HTLV-1 sólo es capaz de inmortalizar linfocitos T CD4. Sin embargo, reciente-

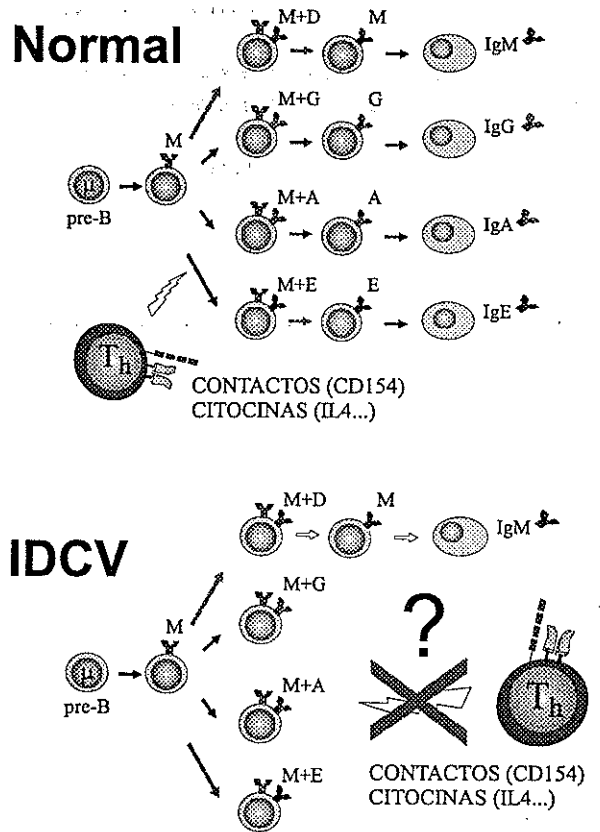


Figura 1. Maduración normal (arriba) y deficiente (IDCV, abajo) del linfocito B. Para que se produzca la diferenciación de una célula B madura hasta célula plasmática secretora de anticuerpos y para que se produzca el cambio de isotipo es necesaria la cooperación con una célula T mediante contactos celulares y/o factores solubles. La mayoría de pacientes con IDCV tienen células B maduras. Sin embargo, la mayoría presentan hipogammaglobulinemia, por lo que es posible que exista un defecto en la cooperación T-B, que les impida diferenciarse hasta célula plasmática o cambiar de isotipo.

mente se ha descrito la posibilidad de inmortalizar linfocitos T CD4 y CD8 usando *Herpesvirus saimiri* (HVS)¹⁵. Las líneas celulares así generadas son también dependientes de IL-2 pero, a diferencia de las no inmortalizadas, crecen indefinidamente, lo que supone una evidente ventaja con respecto a las líneas de crecimiento limitado. Además, conservan el TCR y su capacidad funcional^{16,17}. En particular, se ha descrito que las líneas celulares HVS son policlonales¹⁸ y preservan, cuando existen, los defectos originales intrínsecos o congénitos de los linfocitos T^{19,20,21}, permitiendo su posterior caracterización bioquímica.

En el presente trabajo nos hemos propuesto generar y caracterizar líneas inmortalizadas de linfocitos T de enfermos con IDCV, para preservar como modelos *in vitro*, o descartar, los posibles defectos funcionales de dicho linaje.

MATERIALES Y METODOS

Sujetos de estudio. Un total de 38 pacientes, 17 mujeres y 21 hombres (rango de edades = 11-62, media = 31,2 ± 14) diagnosticados con IDCV y 38 donantes sanos de edades similares fueron incluidos en el estudio. Se incluyó en el grupo a todos aquellos pacientes de acuerdo con el criterio diagnóstico del grupo de expertos en inmunodeficiencias primarias de la Organización Mundial de la Salud ²².

Inmortalización de linfocitos T. La inmortalización de linfocitos T con HVS, se llevó a cabo según el procedimiento habitual ⁷ (Figura 2). Brevemente, las células fueron purificadas (día 0) de sangre periférica en un gradiente de Ficoll (Lymphoprep, Nyegaard, Noruega), con el consentimiento debidamente informado de los donantes sanos o de los pacientes, y aprovechando las extracciones programadas a las que de todos modos deben someterse. Las células aisladas se resuspendieron en una mezcla (pro-

porción 1:1) de dos medios de cultivo, medio CG (Serotec, Oxford, UK) y medio RPMI (Biowhittaker), suplementado con 10% de FCS, 1% de glutamina (Biowhittaker), 1% antibiótico, y 1% de PHA (Difco), se ajustaron a una concentración de 2x10⁶ células/ml, y se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos con fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA). A día 0 los linfocitos fueron estimulados con 40 UI/ml de IL2 humana recombinante (rIL2, donada por Hoffman LaRoche), con o sin 1% de PHA para estimular la inmortalización de linfocitos CD8+ o CD4+, respectivamente, y expuestos una única vez al sobrenadante de HVS, obtenido como se indica más abajo, en una proporción 1:1, ajustando el cultivo a una concentración celular de 1x10⁶ células/ml en placas de 24 pocillos. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 3-4 días. A partir de entonces los cultivos se cambiaron 2 veces por semana añadiendo 40 U.I./ml. de rIL-2, pero no PHA. La concentración celular del cultivo se mantuvo sobre 1-2x10⁶ células/ml, duplicándose cuando era necesario. En todos los casos se cultivaron en paralelo, como control, células sin infectar. Criterios de inmortalización: 1) tiempo de doblaje del cultivo, 2) morfología linfoblástica de las células T infectadas y 3) muerte de las células no infectadas.

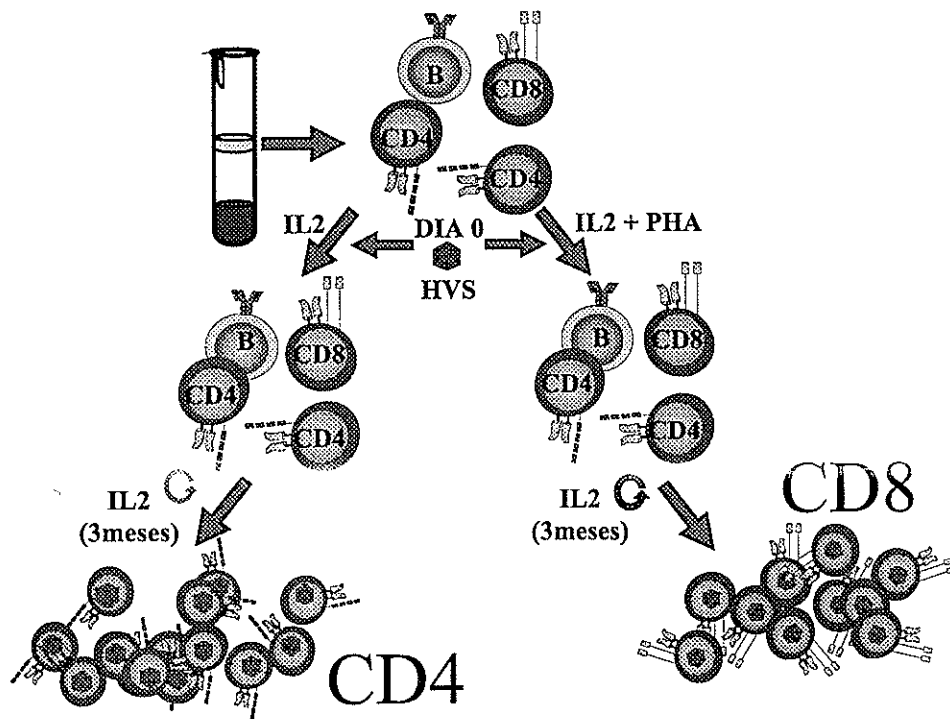


Figura 2. Inmortalización con Herpesvirus saimiri. Tras aislar los linfocitos de sangre periférica, se pone en contacto el virus con las células, una única vez, en ausencia o presencia de PHA y con IL2 para estimular la inmortalización de células CD4 o CD8, respectivamente. (Ver Materiales y métodos).

Tabla 1. Líneas inmortalizadas con HVS

PHA	IDCV	CONTROLES
-	29	30
+	36	37
Total	65	67

Generación de sobrenadante infeccioso. Para generar el sobrenadante de HVS se infectaron células OMK confluentes (fibroblastos de riñón de mono, susceptibles de ser lisados por el HVS) -crecidas previamente en medio MEM (Gibco BRL) con 20% FCS, 1% Gln y 1% antibiótico- con un medio que ya contenía el virus (amablemente cedido por B. Fleckenstein, Erlangen, Alemania), manteniéndose el cultivo de estas células -medio BME (Eagle) (Gibco), suplementado con 20% FCS, 1% Gln y 1% antibiótico-, hasta que se observó que la monocapa confluyente estaba completamente lisada. El sobrenadante del cultivo, rico en partículas virales, fue utilizado como fuente de HVS en sucesivas infecciones, tanto de linfocitos T como de células OMK, en el caso de que fuera necesario generar más sobrenadante. El sobrenadante se conservó a 4°C un máximo de 6 meses.

Inmunofluorescencia y citometría de flujo. El procedimiento de marcaje con monoclonales fue el habitual. Las células se lavaron dos veces con PBS con 1% de FCS,

se resuspendieron a una concentración de 10⁶ células/ml y se dispensaron 100 ml de esta suspensión en cada uno de los pocillos de una placa de 96 (Costar) con fondo en V. A continuación se centrifugó 8 minutos a 1.200 rpm y 4°C, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células, se añadieron las cantidades correspondientes de cada anticuerpo monoclonal marcando directamente (CD3/Leu 4, Becton Dickinson, M. View, CA, CD4/CD8 Caltag, San Francisco, CA) y se incubó la placa durante 30 minutos, en oscuridad y a 4°C, tras los cuales se centrifugó y se lavó con PBS con 1% de FCS. Las células que resultaron ser CD4-CD8- se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-TCRγδ (Caltag).

La cuantificación del marcaje de superficie se realizó por citometría de flujo en un citómetro EPICS ELITE (Coulter, Hialeah, FL). Las células se seleccionaron por criterios de tamaño/complejidad para eliminar las no viables, analizándose al menos 10.000 células por muestra. Los resultados se representaron en histogramas cuyas abscisas representan intensidad de fluorescencia en una escala logarítmica, y las ordenadas representan el número de células en unidades arbitrarias. Las células que presentaban intensidades de fluorescencia por encima del límite superior de la distribución del control negativo (un anticuerpo irrelevante) se consideraron como positivas.

Inducción de CD154 (CD40L). Para realizar los análisis de inducción de CD154 de las células transformadas con HVS, éstas se mantuvieron previamente en medio sin rIL2 durante 7 días para llevarlas al estado de reposo.

Tabla 2. Análisis fenotípico de las líneas HVS obtenidas ^a

PHA	Fenotipo	IDCV		Controles		p
		n	%	n	%	
-	CD4	10	47.1	2	7.7	0.01
	CD8	10	47.1	23	88.5	0.01
	γδ	1	4.8	1	3.8	NS ^b
+	CD4	2	6	0	0	NS ^b
	CD8	31	94	33	100	NS ^b
	γδ	0	0	0	0	-
Total		54		59		

a Todas las líneas analizadas eran CD3+. b No significativo

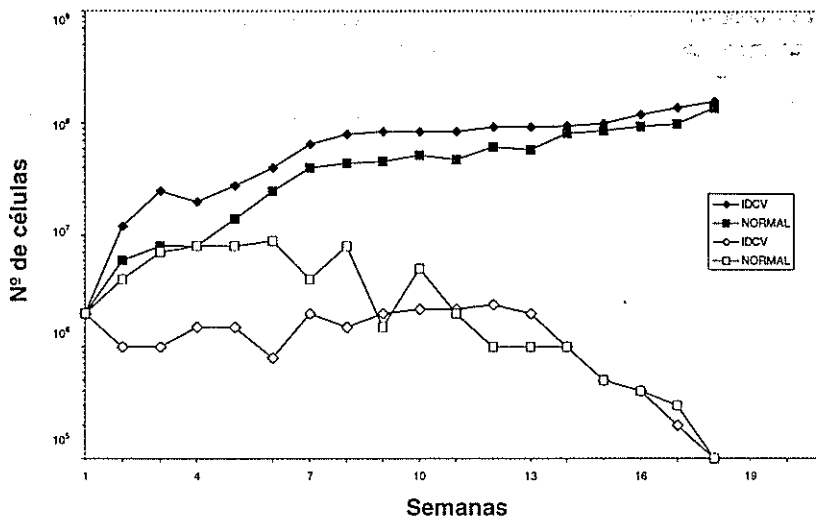


Figura 3. Curva de crecimiento de las líneas de un individuo IDCV (RAL) y su control (CTRL) en presencia o ausencia de sobrenadante HVS. La gráfica representa el número total de células (en escala logarítmica); extrapolando la tasa de crecimiento cuando las variaciones del cultivo lo requerían (congelación o utilización de células en experimentos), frente al número de semanas desde la infección.

Posteriormente se resuspendieron en medio CG-RPMI sin rIL2 a una concentración de 500.000 células/ml, se añadieron 200 ml de la suspensión celular en placas de 96 pocillos en fondo en U en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CD3 (IOT3b, Immunotech, Marsella, Francia) inmovilizado o de 10 ng/ml del éster de forbol, PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) + 750 ng/ml de ionomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y se incubaron durante 6 h a 37°C. Tras la activación, se lavaron las células dos veces con PBS (centrifugación a 1.200 rpm, 4°C, 8 min) y se realizó la tinción con el anticuerpo anti-CD154 (CD40L Pharmingen, San Diego, CA) analizándose posteriormente por citometría de flujo como se indica en el apartado anterior. Como parámetro de inducción se utilizó la intensidad de fluorescencia media (mean fluorescence intensity: MFI) del histograma completo. Para inmovilizar el anti-CD3 se añadieron 50 ml por pocillo de IOT3b (1 mg/ml) disuelto en Tris 50 mM pH8 a partir de una solución madre a 0,2 mg/ml y se incubó toda una noche a 4°C, lavando posteriormente con PBS estéril.

RESULTADOS

Obtención y análisis fenotípico de las líneas HVS.

Se han obtenido 65 líneas de linfocitos T de pacientes con IDCV transformadas con HVS y 67 líneas de linfocitos T transformados con HVS de sus respectivos controles sanos (Tabla 1). En todos los casos, las células sin infectar dejaron de crecer a los 2-3 meses (Figura 3).

De las 65 líneas generadas de linfocitos T de pacientes con IDCV transformadas con HVS, se han analizado fenotípicamente, hasta el momento, 54 líneas. 12 eran CD4+, 41 eran CD8+ (ambas probablemente TCRαβ) y 1

era TCR γδ+CD4-CD8- (Tabla 2). La comparación porcentual de las líneas de cada fenotipo obtenidas en IDCV vs controles sanos reveló que existían diferencias significativas en el número de líneas CD4 (47.1% vs 7.7%, respectivamente, p<0.01) obtenidas en ausencia de PHA.

Análisis funcional. Se analizó la expresión basal de CD154, y su inducción tras activación con anti-CD3 o PMA + ionóforo, en 4 líneas de pacientes, dos CD8+ (MCC y LGM) y dos CD4+ (MCC y MAI), y como control- en 2 líneas de sanos, una CD8+ y otra CD4+. Los resultados (Tabla 3 y Figura 4) indican, por un lado, que las líneas CD4+ presentan una mayor expresión basal de CD154 (70-90%) que los CD8+ (25-40%), sin que existan diferencias entre los pacientes analizados hasta ahora y los controles. Por otro lado, con los estímulos citados no se encontraron diferencias significativas en la inducción de CD154 entre enfermos y controles.

DISCUSION

Los resultados demuestran que una única exposición al HVS induce la expansión (probablemente policlonal)¹⁸ de linfocitos T (tanto CD4+ o CD8+, como TCRγδ+CD4-CD8-) de pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable, durante tiempo indefinido.

Es destacable el hecho de obtener (en ausencia de PHA) un número, significativamente superior al de sus controles, de líneas CD4+ de pacientes con IDCV (47% vs 6%, <0.01). Para que el virus pueda infectar las células T, es necesario que éstas se encuentren en estado de activación; de ahí la necesidad de la estimulación inicial simple (con IL2) o doble (con IL2+PHA). El cuadro de infeccio-

nes sinopulmonares piogénicas recurrentes que padecen estos enfermos, es posible que provoque un estado de preactivación en estas células que favorezca su infección, hecho que viene apoyado por la descripción de la disminución de subpoblaciones, en sangre periférica, de linfocitos T con fenotipo CD4+CD45RA+^{23,24}.

El análisis de la expresión y de la inducción de CD154 demuestra la utilidad del modelo como estudio funcional de los procesos de activación tempranos en la célula T para caracterizar posibles defectos que pudieran afectar *in vivo* a la cooperación con las células B. Aunque los niveles de expresión basal de CD154 en las líneas generadas son mayores, debido al estado de activación de estas células, que los valores habituales de sangre periférica, tras la estimulación tanto con anti-CD3 como con PMA + Ionóforo, son claramente apreciables diferencias de expresión, sobre todo en el linaje CD8+, que no es analizable *in vivo*. Si bien se han descrito defectos en la expresión de CD154 en pacientes con IDCV 6, nuestros resulta-

dos preliminares no apoyan dichos datos, aunque no podemos descartar que existan pacientes dentro de nuestra población con defectos de expresión/inducción de esta molécula (como MAI, *Tabla 3*).

Por lo tanto, la posibilidad de inmortalizar los linfocitos T CD4 y CD8 de pacientes con IDCV utilizando *H. saimiri*, nos permite preservar, donde existan, los defectos funcionales de dicho linaje como modelos *in vitro* y analizar fenotípica, funcional y bioquímicamente las líneas inmortalizadas con objeto de diferenciar y caracterizar a los pacientes con defectos primarios de los linfocitos T, aportando nueva luz a la clasificación existente².

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración en este trabajo a Sonia de Miguel Olalla y a Gema Sánchez Martín. También agradecer al profesor de Estadística de la Facultad de Medicina, Luis Prieto, por su asesoramiento. El presente trabajo fue

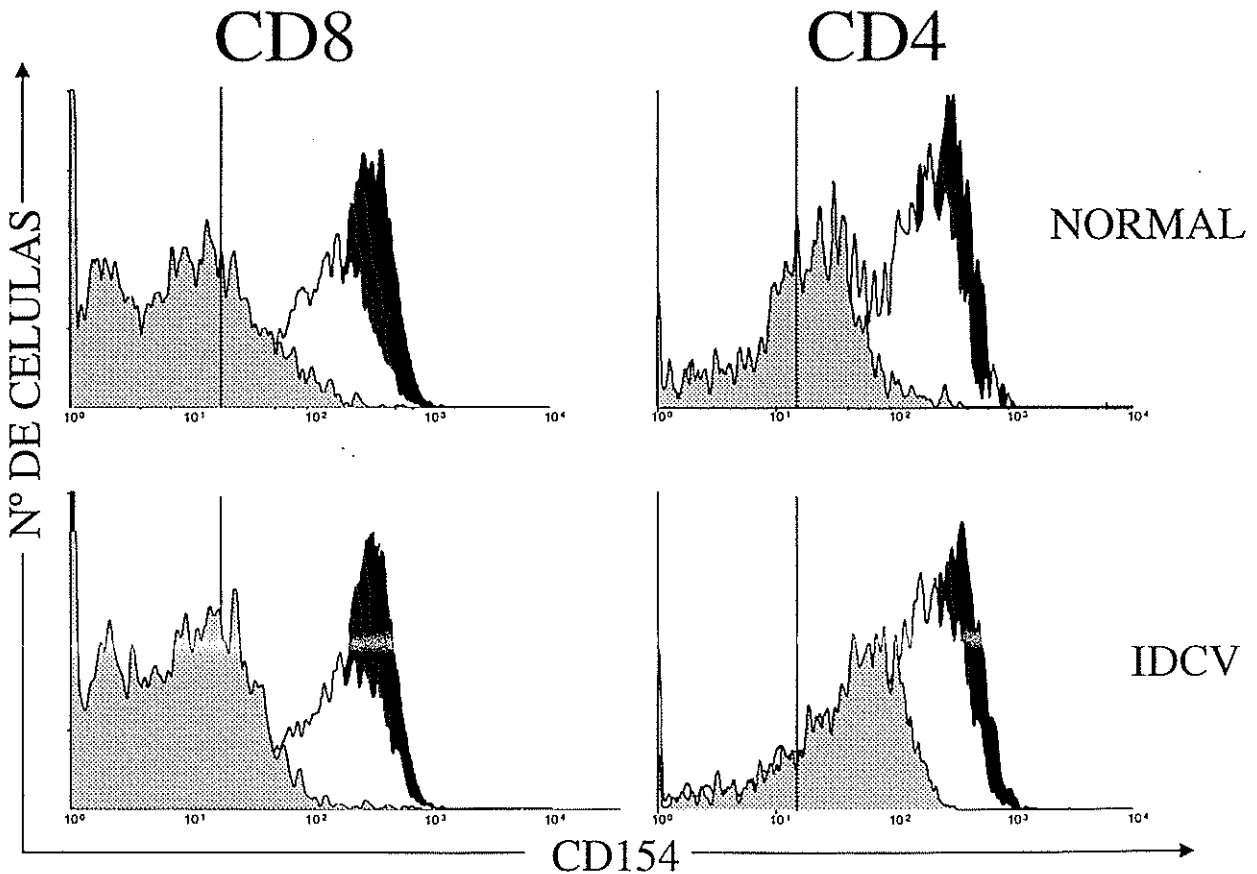


Figura 4. Expresión e inducción de CD154 (CD40L) en líneas HVS. El histograma gris representa la expresión basal, el histograma blanco la expresión tras estimular con anti-CD3 y el histograma negro tras estimular con PMA+ION. La barra vertical representa el límite superior de la distribución de intensidades de fluorescencia del control negativo.

Tabla 3. Expresión e inducción de CD154 en líneas HVS

FENOTIPO	CELULAS	ESTIMULO							
		Sin estímulo		Anti-CD3			PMA+ION		
		MFI	%	MFI	Indice ^a	%	MFI	Indice ^a	%
CD4	CONTROL ^b	3.7	76	7.8	2.1	92	6.4	1.7	93
CD4	IDCV (MCC) ^b	2.1	90	12.4	6.0	90	10.0	4.8	93
CD4	IDCV (MAI)	7.8	72	9.7	1.2	94	6.3	0.8	91
CD8	CONTROL ^b	3.1	38	9.8	3.2	62	19.2	6.2	66
CD8	IDCV (MCC) ^b	2.2	24	6.0	2.7	42	13.1	6.0	45
CD8	IDCV (LGM)	2.2	36	13.3	6.0	87	17.6	8.0	94

a Índice de MFI relativa a la basal. b Véanse histogramas representativos en la Fig. 3

financiado en parte por el Fondo de Investigación Sanitaria (96/0860), la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 96/119) y el Ministerio de Educación y Cultura (PR112/96-856582/96), utilizando instalaciones del CAI de Técnicas Inmunológicas de la U.C.M. Agradecer también a Hoffmann-LaRoche su donación continuada de rIL2.

REFERENCIAS

- Spickett GP, Webster ADB., and Farrant J. Cellular abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. *Immunodef Rev* 1990; 2: 199-219.
- Spickett G et al. Common Variable Immunodeficiency: How many diseases? *Immunol. Today* 1997; 18: 325-328.
- Regueiro JR, Rodríguez-Gallego C, Arnaiz-Villena A. Human T-lymphocyte activation deficiencies. Medical Intelligence Unit. R.G. Landes Company: Pub, Austin, Texas (1994).
- Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E, Lokaj J, Litzman J, Wjolf HM, Mannhalter JW, Eibl MM. A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1994; 84: 4234-241.
- DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, et al. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper IgM. *Nature* 1993; 361: 541-543.
- Farrington M et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1994; 91: 1099-1103.
- Spickett GP, Matamoros N, Farrant J. Lymphocyte surface phenotype in common variable immunodeficiency. *Dis Markers* 1992; 10 (2): 67-80.
- Farrant J, Spickett G, Matamoros N, Copas D, Hernandez M, North M, Chapel H, Webster AD. Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency* 1994; 5 (2): 159-169.
- Funauchi M, Farrant J, Moreno C, Webster AD. Defects in antigen-driven lymphocyte responses in common variable immunodeficiency (CVID) are due to a reduction in the number of antigen-specific CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 82-88
- Stagg AJ, Funauchi M, Knight SC, Webster AD, Farrant J. Failure in antigen responses by T cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 48-53.
- Aukrust P, Lien E, Kristoffersen AK, Muller F, Haug CJ, Espevik T, Froland SS Persistent activation of the tumor necrosis factor system in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency. Possible immunologic and clinical consequences. *Blood* 1996; 87: 674-681.
- Vumanovic S, Vucovic S, Stosic-Gruicic S, Ramic M. An unusual T-cell surface phenotype *in vivo* correlates with the failure to proliferate and produce IL-2 *in*

- in vitro* in a patient with common variable immunodeficiency. Clin Immunol Immunopath 1992; 65: 261-70.
- 13 Fiedler W, Sykora KW, Weite K et al. T-cell activation defect in common variable immunodeficiency: restoration by phorbol myristate acetate (PMA) or allogenic macrophages. Clin Immunol Immunopathol 1987; 44: 206-218.
 - 14 Yssel H, Malefyt R, Dodon M, Blanchard D, Gazzolo L, de Vries J, Spits H. HTLV-I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells. J Immunol 1989; 142: 2279-2283.
 - 15 Biesinger B, Müller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzer E, Desrosiers R, Fleckenstein B. Stable growth transformation of human T lymphocytes by *Herpesvirus saimiri*. PNAS 1992; 89: 3116-119.
 - 16 Meinel E, Hohlfeld R, Wekerle H, Fleckenstein B. Immortalization of human T-cells by *Herpesvirus saimiri*. Immunol Today 1995; 16: 55-58.
 - 17 Fickensher H, Fleckenstein B. Generation of human T-cell lines using lymphotropic herpesviruses. In Adolph A, ed., Methods in Molecular Genetics 4, p. 345. Academic Press. San Diego.
 - 18 Pacheco Castro A, Márquez C, Toribio ML, Ramiro A, Trigueros C, Regueiro JR. Herpesvirus saimiri immortalization of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ human T-lineage cells derived from CD34+ intrathymic precursors "in vitro". Int Immunol 1996; 8: 1797-1805.
 - 19 Rodríguez-Gallego C, Corell A, Pacheco-Castro A, Timón M., Regueiro JR, Allende L, Madroño A, Arnaiz-Villena A. *Herpesvirus saimiri* transformation of T cells in CD3 γ immunodeficiency: phenotypic and functional characterization. J Immunol Meth. 1996; 198: 177-186.
 - 20 Alvarez-Zapata D, de Miguel Olalla S, Fontán G, García Rodríguez MC, Madero L, van den Elsen P and Regueiro JR. Phenotypical and functional characterization of *Herpesvirus saimiri*-immortalized human MHC class II-deficient T lymphocytes. Tissue Antigens 1998; 51: 250-257
 - 21 Gallego MD, Santamaría M, Peña J, Molina JJ. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. Blood. En prensa (1997).
 - 22 Report of a WHO Scientific Group. Primary Immunodeficiencies Diseases. Clin. Exp. Immunol, 1997; 109, Suppl. 1: 1-28.
 - 23 Wright J, Wagner DK, Blaese RM, Hagenhuber C, Waldmann TA and Fleischer TA. Characterization of common variable immunodeficiency identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features. Blood 1990; 76: 2046-2051.
 - 24 Lebranchu Y, Thibault G, Degenne D and Bardos P. Abnormalities in CD4+ T lymphocytes subsets in patients with common variable immunodeficiency. Clin Immunol Immunopathol. 1991; 61: 83-92.

Fisiopatogenia y bases moleculares de las inmunodeficiencias primarias

Juan Antonio García Cabanillas, Alberto Pacheco, José Ramón Regueiro

INTRODUCCION

Las inmunodeficiencias humanas son una categoría heterogénea de enfermedades, que engloba los defectos del sistema inmunitario. Las inmunodeficiencias se clasifican en primarias o congénitas (ID) cuando la causa es una mutación en un gen del sistema inmunitario, o en secundarias o adquiridas cuando es una causa externa al propio sistema inmunitario el que provoca la deficiencia (1). Las inmunodeficiencias primarias son muy poco frecuentes, de herencia autosómica recesiva (AR) o ligada al cromosoma X (LX) y se agrupan de acuerdo con el tipo celular que se encuentra más afectado, en su número y/o en su función; en alguna de estas deficiencias se conoce el gen causante de la enfermedad, aunque hay otras sin localización genética en la actualidad. Como consecuencia de los defectos se producen infecciones repetidas causadas por protozoos, bacterias, hongos o virus; el tipo de infección observada puede ayudar a definir el componente del sistema inmunitario afectado (cuadro I). Las inmunodeficiencias secundarias pueden ser debidas a la administración de fármacos inmunosupresores, radioterapia, malnutrición, enfermedades del metabolismo, uremia, deficiencias vitamínicas, enfermedades malignas, infecciones (virus de Epstein-Barr), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), situaciones de estrés (cirugía, politraumatismos) y alteraciones mentales o psicofuncionales (depresión, esquizofrenia, etc.).

DEFICIENCIAS DE ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS (cuadro II)

1. Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA, deficiencia de Btk).

Inmunodeficiencia caracterizada por la ausencia o profunda disminución de los niveles de inmunoglobulinas en el suero y del número de linfocitos B circulantes (2, 3). La enfermedad tiene una frecuencia de 1:50.000 a 1:100.000 habitantes. El defecto génico último, localizado en la porción media del brazo largo del cromosoma X (Xq21.3-22), radica en un gen que codifica para una proteína tirosinasa ubicua denominada Btk (Bruton's agammaglobulinaemia tyrosine kinase) (4, 5). La carencia de esta proteína, necesaria para la expansión de las células B en un punto crítico de su maduración, afecta el desarrollo del linaje B de tal forma que aún existiendo células pro-B, hay muy pocas células pre-B (con cadena μ intracitoplasmática)

ca) y éstas son incapaces de diferenciarse hacia células B maduras, lo que en definitiva implica la ausencia de gammaglobulinas por la falta de células productoras de anticuerpos. El desarrollo de los linfocitos T, los monocitos y los granulocitos no se encuentra afectado. Al presentar el defecto genético un carácter recesivo y estar ligado al cromosoma X, las mujeres portadoras no presentan síntomas clínicos. Los varones permanecen asintomáticos hasta los 5-10 meses (mientras se mantiene el aporte de inmunoglobulinas maternas). Los primeros síntomas consisten en infecciones bacterianas repetidas, otitis, bronquitis, neumonía, meningitis, conjuntivitis y ocasionalmente dermatitis y malabsorción. Pueden desarrollar infecciones víricas, como varicela y paperas, e incluso poliomielitis y encefalitis progresiva. Existe una forma de agammaglobulinemia que se hereda de forma autosómica recesiva en la que cerca de la mitad de los pacientes tienen mutaciones en el gen de la cadena pesada μ o en el gen $\lambda 5/14.1$ y no en el gen de la Btk (ver cuadro II) (6).

2. Hiper-IgM autosómica recesiva

(Ver 7 Hiper-IgM ligada al cromosoma X)

3. Deficiencia de IgA (IgAD)

Es la inmunodeficiencia primaria más frecuente en la población caucasoide (7) (1:700 frente a 1:18.500 en la población japonesa) (8) y se caracteriza por la baja concentración de IgA en suero (<5 mg/dL). No se conoce la causa primaria de la deficiencia de IgA, aunque se cree que puede estar relacionada con la incapacidad de los linfocitos B positivos para IgA de diferenciarse a células plasmáticas. Los valores de IgG, IgM, IgD e IgE son normales o incluso altos, al igual que el número de linfocitos B circulantes. Algunos pacientes desarrollan también una deficiencia selectiva de IgG2 (9). Clínicamente, es posible que los pacientes permanezcan asintomáticos o padezcan infecciones sinopulmonares recurrentes, tanto víricas como bacterianas, colitis y enteritis. El hecho de que se hallen asintomáticos puede ser debido al incremento compensador de IgM en mucosas. Aunque en algunas familias se ha demostrado herencia autosómica recesiva o dominante, la mayoría de los casos son de aparición esporádica. Determinados haplotipos de genes del MHC se asocian con frecuencia a la inmunodeficiencia común variable (CVID) y a la deficiencia de IgA por lo que ambas inmunodeficiencias pueden reflejar distintos aspectos de un mismo mecanismo patogénico (10). Los pacientes no deben ser tratados con inyecciones de gammaglobulina, ya que estos productos tienen una proporción muy baja de IgA y, además, pueden producir sensibilización frente a la IgA o bien shock anafiláctico en pacientes previamente sensibilizados frente a la IgA materna.

CUADRO I
INFECCIONES ASOCIADAS A INMUNODEFICIENCIAS

Defecto	Patógenos más asociados	Bacterias	Protozoos	Virus *	Hongos
<i>Inmunidad innata</i>					
Fagocitos	Bacterias y hongos (más que virus y protozoos)	<i>Staphylococcus</i> <i>Proteus</i> <i>Klebsiella</i> <i>Serratia</i> <i>Nocardia</i> <i>Mycobacterium</i> *	X	X	<i>Cándida</i> <i>Aspergillus</i>
Complemento	Bacterias piógenas y hongos (más que virus y protozoos)	<i>Neisseria</i> <i>Haemophilus</i>	X	X	<i>Aspergillus</i>
Linfocitos NK	Herpesvirus	X	X	Herpes	X
<i>Inmunidad específica</i>					
Linfocitos B	Bacterias piógenas y protozoos extracelulares	<i>Staphylococcus</i> <i>Haemophilus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Giardia</i> <i>Cryptosporidium</i>	Enterovirus (polio, echo)	X
Linfocitos T o Combinadas	Patógenos intracelulares	<i>Mycobacterium</i> * <i>Listeria</i> * <i>Streptococcus</i>	<i>Toxoplasma</i>	Citomegalovirus Vacuna Herpes Parodititis	<i>Cándida</i> <i>Aspergillus</i> <i>Pneumocystis</i>

* Intracelular.

4. Inmunodeficiencia común variable (CVID)

Esta inmunodeficiencia, de etiología desconocida, engloba un grupo heterogéneo de enfermedades cuya característica común es la incapacidad de producir anticuerpos por parte de las células B. Es la inmunodeficiencia primaria más frecuente después de la IgAD con una incidencia estimada entre 1:10.000 y 1:50.000. Se han publicado varios estudios sobre la identificación del defecto(s) inmunológico. Sin embargo, no se ha podido establecer un patrón lo suficientemente consistente para realizar una clasificación adecuada (11). La inmunidad mediada por células T se encuentra afectada en aproximadamente el 30% de los pacientes, por lo que se ha postulado que el defecto primario puede residir en los linfocitos T (12). Afecta por igual a hombres y mujeres y aunque puede manifestarse a cualquier edad, hay una mayor incidencia en la segunda y tercera década de vida (13). Al igual que en todas las inmunodeficiencias primarias que afectan la inmunidad humoral, la presentación clínica de la CVID son infecciones sinopulmonares recurrentes por bacterias piógenas. Son frecuentes las citopenias autoinmunes, alteraciones gastrointestinales (enfermedad inflamatoria intestinal, anemia perniciosa), enfermedades autoinmunes (SLE, enfermedad de Graves) y existe mayor incidencia de procesos tumorales (linfomas no Hodgkin). Como era de esperar en un grupo tan heterogéneo de enfermedades, se han descrito varios patrones de heredabilidad (auto-

sómica recesiva, autosómica dominante, ligada al cromosoma X). En cualquier caso, los casos esporádicos sin un patrón de herencia claro son los más frecuentes. En múltiples familias de varios miembros con diagnósticos de CVID e IgAD se heredan a menudo alelos del MHC característicos (14).

5. Deficiencia de subclases de IgG

Se han caracterizado deficiencias selectivas de los distintos isotipos de IgG (1, 2, 3, 4). En la mayoría de los casos se desconoce la base molecular. En raras ocasiones, los genes de las cadenas pesadas están afectados. Clínicamente, los pacientes sufren infecciones del tracto respiratorio e infecciones sinopulmonares piógenas de repetición. Algunos individuos desarrollan enfermedades autoinmunes, como el SLE. Estas deficiencias de subclases se asocian con otras inmunodeficiencias (la deficiencia de IgG2-IgG4 se asocia con la deficiencia de IgA o con la ataxia-telangiectasia).

6. Deficiencia de la cadena κ .

Se han descrito dos familias en las que las cadenas ligeras de sus inmunoglobulinas son únicamente del tipo λ . La formación de anticuerpos es variable; los linfocitos B circulantes son normales excepto por no tener cadenas ligeras κ debido a mutaciones puntuales en el gen que codifica para éstas (cromosoma 2p11) (15).

CUADRO II
DEFICIENCIAS DE ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS

<i>Enfermedad (incidencia)</i>	<i>Igs (suero)</i>	<i>Células B circulantes</i>	<i>Defecto primario</i>	<i>Diagnóstico inmunológico</i>	<i>Disfunciones o consecuencias inmunológicas/clínicas</i>	<i>Herencia Cromosoma</i>	<i>Tratamiento</i>
Agammaglobulinemia ligada al X (1:50.000-1:100.000)	Ausencia de los cinco isotipos de Igs	Ausencia de células B maduras	Mutaciones en el gen <i>Btk</i>	Citometría Niveles de Igs	Inadecuada formación de Ac Infecciones piogénicas	LX Xq21.3-3-22	GGI
HiperIgM autosómica (<200)	IgM e IgD elevada o normal. Disminución de IgG, IgA e IgE	Sólo IgM e IgD positivas	Desconocido ¿CD40?	Citometría Niveles de Igs	Neutropenia, anemia hemolítica Infecciones bacterianas recurrentes	?	GGI
Deficiencia de IgA (1:700)	Ausencia en suero y secreciones de IgA	Normal o disminuido	Desconocido	Niveles de IgA	Procesos atópicos, tumorales autoinmunes e infecciones bacterianas recurrentes	Variable	Sintomático
Inmunodeficiencia común variable (IDCV) (1:10.000-1:50.000)	Ausencia o disminución de Igs	Normal o disminuido	Desconocido	Niveles de Igs	Carencia de producción de Ac específicos Infecciones bacterianas	Variable	GGI
Deficiencia de subclases de IgG	Ausencia de las distintas subclases de IgG	Normal o inmaduras	Desconocido	Niveles de IgG	Infecciones bacterianas recurrentes	AR 14q32.3	GGI
Deficiencia de la cadena κ	Ig (κ) disminuida	Normal o disminuidas las κ positivas	Mutaciones puntuales (2p11)	Niveles de IgG	Infecciones bacterianas recurrentes	AR 2p11	GGI
Agammaglobulinemia autosómica recesiva	Ausencia de los cinco isotipos de Igs	Ausencia de células B maduras	Mutación en el gen μ (o λ5.14)	Niveles de IgG	Inadecuada formación de Ac Infecciones piogénicas	AR 14	GGI

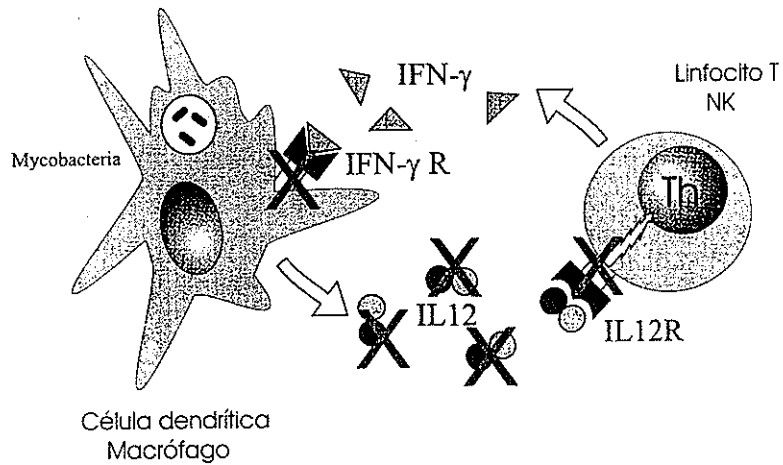
CUADRO III
DEFICIENCIAS DE LINFOCITOS T Y COMBINADAS

Enfermedad (incidencia)	Igs (suero)	Células B circulantes	Células T circulantes	Defecto primario	Diagnóstico inmunológico	Disfunciones o consecuencias inmunológicas/clínicas	Herencia Cromosoma	Tratamiento
Moléculas HLA (células presentadoras de antígeno)								
Deficiencia de HLA I (SCID) (1)	Normal	Normal	CD8 disminuida, CD4 ⁺ /CD8 ⁺ aumentadas	TAP2	Citometría	Ausencia de la expresión de HLA I Disminución de la actividad NK. Infecciones bacterianas y, a veces, víricas recurrentes.	AR 6p21.3	Trasplante de medula ósea
Deficiencia de HLA II (SCID) (50)	Normal o disminuidas	Normal	CD4 disminuidas	RFX5 RFAP CIITA	Citometría	Ausencia de la expresión de HLA II Respuesta humoral y celular disminuida Infecciones recurrentes	AR 1q21 13 16p13.1-2	Trasplante de medula ósea
Activación/Diferenciación								
Deficiencias de CD3 (3)	Normal	Normal	Disminuidas	CD3 γ CD3 ϵ	Citometría	Baja expresión del complejo TCR/CD3 y de la función de linfocitos T Infecciones recurrentes	AR 11	Antibióticos
Deficiencia de ZAP 70 (SCID) (10)	Normal	Normal	CD8 disminuida, CD4 normal	ZAP70	Citometría Respuesta a mitógenos	Ausencia de células T CD8 ⁺ , mal funcionamiento de las CD4 ⁺ Infecciones recurrentes de origen vírico, bacteriano y fúngico	AR 2q12	Trasplante de medula ósea
Deficiencia de IL2-R γ (SCID ligada al X) (1/600.000)	Disminuidas	Normal o aumentadas	Disminuidas	Cadena γ del receptor de la IL-2, 4, 7, 9 y 15	Citometría Respuesta a mitógenos	Función disminuida de linfocitos T y NK Infecciones recurrentes	LX Xq13.1-13.3	Trasplante de medula ósea
Deficiencia de IL2-R α (CD25)	Normal	Normal	Disminuidas	Cadena α del receptor de la IL-2 (CD25)	Citometría	Inflamación Infiltración linfoide		Trasplante de medula ósea
Deficiencia de Jak3 (SCID) (1)	Disminuidas	Normal o aumentadas	Disminuidas	Jak3	Citometría	Función disminuida de linfocitos T y NK Infecciones recurrentes	AR 19p13.1	Trasplante de medula ósea
Hiper IgM ligada al cromosoma X (200)	IgM e IgD elevadas. Otras disminuidas	Sólo IgM e IgD positivas	Normales	CD154 (CD40L)	Citometría Niveles de Igs	Neutropenia, anemia hemolítica Infecciones bacterianas recurrentes	LX Xq26-27	GGI
Deficiencia de CD95 (3)	Aumentadas Policlonales	Aumentadas	Aumentadas la población TcR $\alpha\beta$ CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD95	Citometría Apoptosis	Ausencia de la expresión de la proteína CD95, disminución de la apoptosis, linfoproliferación, neutropenia Anemia hemolítica, trombocitopenia	¿?	

Viene de la página anterior.

Síndrome de DiGeorge (1/70.000)	Disminuida o normal	Normal	Ausentes	Delección en 22q11	Citometría Respuesta a mitógenos	Ausencia de timo, malformaciones congénitas Infecciones recurrentes, hipoparatiroidismo, retraso en el crecimiento	AR AD LX	Trasplante de timo fetal
Síndrome de Wiskott-Aldrich (SCID) (1/250.000)	IgM disminuida IgA e IgE aumentada IgG normal	Normal o disminuida	Disminuidos Reducción progresiva de CD4	WASP	Igs Citometría Hemograma	Defectos en la función de células B Trombocitopenia, eccema cutáneo e infecciones piogénicas recurrentes	LX Xp11.22-11.3	Trasplante de medula ósea
Disgenesia reticular (SCID)	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Desconocido	Citometría Mitógenos Igs	Ausencia del linaje linfoide y mieloide, ausencia de función celular y humoral Infecciones recurrentes víricas, bacterianas y fúngicas	AR	Trasplante de medula ósea
Síndrome linfoproliferativo ligado al X (1-2/millón)	Disminuidas		CD8 aumentada, CD4 disminuida	SAP (CD150 ó SLAM-assoc. protein)		Infección letal por EBV Linfomas Baja producción de INF-γ	LX Xq26	GGI Esteroides
Metabolismo del ADN								
Deficiencia de PNP (SCID) (50)	Normal o disminuidas	Normal	Número muy bajo	PNP	Citometría Mitógenos Determinación enzimática	Disminución de la respuesta a mitógenos Infecciones recurrentes Ausencia de la actividad enzimática de la PNP, baja concentración de ácido úrico en sangre y orina.	AR 14q13.1	Trasplante de medula ósea Terapia génica
Deficiencia de ADA (SCID)	Disminuidas	Disminución progresiva	Disminución progresiva	ADA	Citometría Mitógenos Determinación enzimática	Función de linfocitos T y B disminuida. Infecciones de todo tipo, ausencia de la enzima ADA	AR 20q13-ter	Trasplante de medula ósea ADA purificada Terapia génica
Deficiencia de RAG1/2, (SCID) (2)	Disminuidas (IgG, IgA)	Ausencia	Número muy bajo	RAG1, RAG2	Citometría		AR 11p12-13	Trasplante de medula ósea
Síndrome de Omenn	Disminuidas IgE aumentada	Disminuido	Oligoclonal	RAG1, RAG2 parcial	Citometría Mitógenos Igs	Timo hipoplásico Eosinofilia	AR 11	Trasplante de medula ósea
Ataxia-telangiectasia (SCID) (1/40.000)	IgG2 disminuida	Normal	Reducida población CD4*	ATM	Citometría Respuesta a mitógenos	Función celular y humoral defectuosa. Defecto celular en la reparación del ADN Concentración elevada de alfafetoproteína	AR 11q23.1	Trasplante de timo fetal
Síndrome de Nijmegen (deficiencia de ribrina)	Normal	Disminuida	Disminuida	NBS1	PCR	Función celular defectuosa. Defecto celular en la reparación del ADN Microcefalia	AR	

INNATAS



ADAPTATIVAS

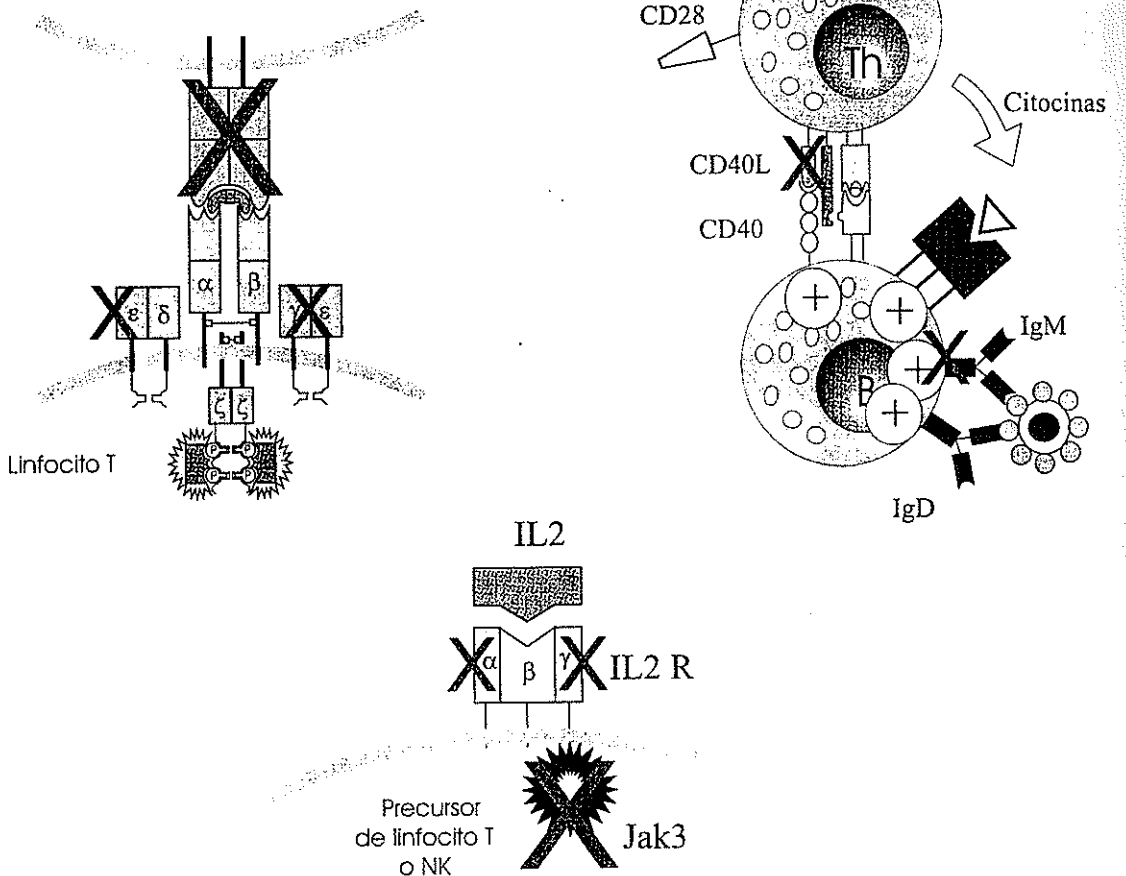


Figura 1.— Las inmunodeficiencias primarias pueden afectar tanto a la inmunidad innata (deficiencia del receptor de IFN γ , deficiencia de la IL12 o de su receptor (ver cuadro IV), como a la adaptativa (deficiencias de CD3 o de HLA, deficiencia de ZAP 70, Hiper-IgM ligadas a X (deficiencia de CD40L), deficiencia de μ , deficiencia de la cadena γ del receptor de IL2, deficiencia de Jak3 (ver cuadro III). Las moléculas afectadas se indican con un aspa.

INMUNODEFICIENCIAS DE LINFOCITOS T Y COMBINADAS (T-B) (cuadro III)

1. Deficiencia de HLA de clase I

Durante el proceso normal de presentación de antígenos intracelulares a las células T CD8, las células presentadoras degradan el antígeno en el citoplasma y los fragmentos resultantes son transportados hasta el retículo endoplásmico. En este transporte interviene el heterodímero TAP (proteína transportadora asociada al procesamiento de antígeno), formado por dos subunidades TAP1/TAP2. Mutaciones en el gen que codifica para la proteína TAP2 originan la ausencia de este complejo transportador y, como consecuencia, la falta de las moléculas HLA de clase I en la superficie celular (16). El número de células CD8 se halla disminuido (como consecuencia de la falta de selección tímica), aunque su actividad citotóxica es normal; por el contrario, la población de células NK se encuentra en niveles normales, pero es afuncional.

2. Deficiencia de HLA de clase II

Inmunodeficiencia autosómica recesiva debida a un defecto en la expresión de las moléculas HLA de clase II (DP, DQ, DR) en las células presentadoras de antígeno, y por tanto, una disminución de las respuestas celular y humoral. Esta inmunodeficiencia combinada, de alta mortalidad, está causada por un defecto en la presentación de antígeno a los linfocitos CD4+, cuyo número se encuentra drásticamente reducido como consecuencia de la ausencia de selección tímica. Se han localizado tres defectos genéticos causantes de esta enfermedad y ambos afectan a proteínas reguladoras de la transcripción de los genes HLA de clase II: RFX5 (factor regulador X5), en el cromosoma 1 (1q21), RFXAP (proteína asociada al factor regulador X), en el cromosoma 13 y CIITA (transactivador de clase II), en el cromosoma 16 (16p13.1-2), las cuales en condiciones normales se unen a secuencias de ADN conservadas localizadas en la región promotora de estos genes (17).

3. Deficiencias de CD3

Son inmunodeficiencias caracterizadas por una disminución en el número de linfocitos T asociado a un defecto de expresión y de función del receptor de la célula T (complejo TcR/CD3). Se han descrito mutaciones en los genes que codifican para las cadenas CD3 γ y CD3 ϵ en el cromosoma 11 (figura 1). Las consecuencias clínicas de las deficiencias de CD3 son muy variables. Se han descrito 3 pacientes con defecto de CD3 γ (18, 19), uno de ellos presentó síntomas característicos de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y murió a temprana edad, mientras que los otros pacientes se mantienen sanos en la actualidad. En el caso de la deficiencia (parcial) de CD3 ϵ , el único individuo afecto descrito hasta la actualidad muestra síntomas leves de infecciones respiratorias (20).

4. Deficiencia de ZAP-70

Inmunodeficiencia caracterizada por infecciones recurrentes de origen vírico, bacteriano o fúngico. Se han descrito menos de 10 casos. El defecto se encuentra en el gen que codifica para la proteína tirosincinasa asociada a la cadena zeta (ζ) del complejo TcR/CD3 y denominada ZAP-70 (cromosoma 2). Estos pacientes carecen de linfocitos T CD8+. El número de células T CD4+ se encuentra dentro de los valores normales, aunque las células no son funcionales. Este hecho sugiere que ZAP-70 está relacionada con la selección tímica de las células CD8, y que también cumple una función importante en la transducción de señal del linfocito T CD4+ (21, 22).

5. Deficiencias de IL-2R γ

Es la SCID más frecuente (50-60% del total) se hereda ligada al cromosoma X (Xq13.1-13.3) y el defecto último se debe a mutaciones del gen de la cadena γ del receptor de la IL2, cadena que forma parte también de los receptores para otras citocinas (al menos los de IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15) (figura 1). La falta de esta cadena conlleva la ausencia del receptor de alta afinidad para IL2 (formado en condiciones normales por las cadenas α , β y γ) lo que da lugar a una alteración de las funciones ejercidas normalmente por dicha citocina: proliferación y expansión clonal de células T CD4, maduración de linfocitos CD8, maduración tímica de linfocitos T, activación de células NK y proliferación de células B, entre otras (23).

Recientemente ha sido descrita una nueva inmunodeficiencia como consecuencia de una mutación en el gen que codifica para la cadena α del receptor de IL2 (CD25). Se caracteriza por disminución de células T en sangre periférica, proliferación anormal pero desarrollo normal de células B y un infiltrado linfocítico de tejidos (pulmón, hígado, riñón, intestino, hueso) acompañado de atrofia tisular e inflamación (24).

6. Deficiencia de Jak-3

Asociada con la cadena γ del receptor de la IL2 se encuentra una proteína tirosincinasa denominada Jak-3, involucrada en la transmisión de la señal de activación mediada por dicho receptor. Recientemente se han descrito individuos con mutaciones en el gen que codifica para la citada proteincinasa, cuyas manifestaciones clínicas son similares a las de los pacientes con deficiencias de IL-2R (25).

7. Hiper-IgM ligada al cromosoma X

Es una enfermedad que se caracteriza por valores medios o altos de IgM e IgD, asociados con una deficiencia de IgA, IgG e IgE. El 70% de los casos se heredan ligados al cromosoma X y los restantes de forma autosómica recesiva. En la forma ligada al X el defecto genético está localizado en el gen que codifica la molécula de superficie CD154 (CD40L) (26). CD154 es una proteína codificada en el cromosoma X (Xq26)

que se encuentra en los linfocitos T CD4+ activados, los monocitos, los mastocitos, los eosinófilos y los basófilos. Actúa como ligando de otra molécula de superficie del linfocito B, que es la CD40 (figura 1). Esta interacción, junto con citocinas liberadas desde la célula T activada, es esencial para que se produzca el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y, por tanto, para que la célula B productora de IgM pase a producir IgG o IgA. En la mayoría de los casos no hay expresión de CD154 en los linfocitos T de estos pacientes. En otros se expresa una proteína truncada (mutante no funcional) y estos pacientes presentan una clínica menos severa.

8. Deficiencia de CD95 (*déficit de Apo1/Fas*)

Inmunodeficiencia caracterizada por alteraciones fenotípicas o funcionales de la proteína CD95, originada por la existencia de mutaciones puntuales en el gen que codifica para dicha proteína. La ausencia o disfunción de CD95 impide la muerte celular programada (apoptosis), desarrollada normalmente en el timo y en sangre periférica, lo que origina en estos enfermos linfocitosis, aumento de células dobles negativas (TcR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-) en sangre periférica (de hasta el 70 %) y una supervivencia anormalmente prolongada de células B (27).

9. Aplasia congénita del timo (*Síndrome de Di George*).

Malformación congénita de los órganos derivados de la tercera y cuarta bolsa faríngeas, lo que implica una ausencia o hipoplasia de las glándulas paratiroides y del timo. Los niños afectados también presentan anomalías congénitas cardíacas. Otras características clínicas son la presencia de rasgos faciales típicos, alteraciones funcionales y defectos renales. Se presenta invariablemente una hipocalcemia neonatal y tétanos por la aplasia de las glándulas paratiroides. La magnitud de las malformaciones es variable. Casi todos los pacientes (80-90%) presentan deleciones en el cromosoma 22 (22q11-ter) (28). La ausencia de timo provoca la ausencia, o una gran reducción, tanto en el número como en la función de los linfocitos T. Los pacientes que sobreviven el período neonatal desarrollan infecciones recurrentes o crónicas, tanto bacterianas como víricas. A medida que estos niños crecen, la función linfocítica T mejora o permanece estable con el tiempo. Entre los niños que sobreviven, son comunes los problemas leves de aprendizaje, voz hipernasal, y alteraciones en el lenguaje expresivo, aunque hay pocos datos al respecto.

10. Síndrome de Wiskott-Aldrich (*deficiencia de WASP*)

Es una enfermedad ligada al cromosoma X, caracterizada por trombopenia, eccema e infecciones piógenas recurrentes. Con respecto a las características inmunológicas, se producen anormalidades tanto en la inmunidad humoral como en la celular. El timo y los nódulos linfáticos tienen una estructura anormal, con una pobre formación de folículos y poca diferenciación corticomedular. Hay una reducción progresiva

tanto del número de linfocitos T (principalmente en los CD4+) como de la respuesta proliferativa a mitógenos. Recientemente se ha identificado el gen causante de la enfermedad, el WASP. El producto proteico codificado por el gen tiene 501 aminoácidos, es rico en prolinas y se desconoce actualmente su función, aunque parece desempeñar un importante papel en la activación linfocitaria y de plaquetas. La proteína podría actuar como factor transcripcional, o bien como ligando de otras proteínas que intervienen en la transducción de señales en el interior celular. En muchos pacientes se observan defectos de glicosilación, de expresión y de función de ciertas moléculas de membrana de los linfocitos T, entre las que destaca CD43. También se observan defectos en la morfología de los linfocitos T por lo que es posible que este gen sea capaz de regular la arquitectura celular interaccionando con otras proteínas (29).

11. *Disgenesia reticular*

Es una de las SCID más graves, de herencia autosómica recesiva, caracterizada por la total ausencia de neutrófilos, linfocitos (T, B y NK), monocitos y plaquetas, por lo que el defecto genético parece encontrarse en el proceso de diferenciación de los linajes linfoide y mieloide a partir de las células progenitoras pluripotenciales de la médula ósea (30).

12. Síndrome linfoproliferativo ligado al X (XLP) (*Síndrome de Duncan*)

Esta enfermedad vuelve a los individuos excepcionalmente susceptibles a la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) que puede cursar como 1) mononucleosis infecciosa letal, 2) mononucleosis infecciosa asociada a linfoma, 3) mononucleosis infecciosa asociada a inmunodeficiencia o como 4) linfoma. Muy recientemente se ha publicado un trabajo en el que se identifica a la proteína SAP (SLAM-associated protein), específica de células T, como el producto del gen alterado en el XLP. SAP se asocia intracelularmente a SLAM (*Signalling Lymphocyte Activation Molecule* o CDw150), que es una proteína de superficie que interviene en la cooperación T/B. Por tanto, una defectuosa transducción de la señal inducida por la interacción SLAM/SAP puede ser la responsable de la deficiente respuesta por parte de los linfocitos T para eliminar células B infectadas por el virus de Epstein-Barr (31).

13. Síndrome de Omenn

Es una rara enfermedad autosómica recesiva, caracterizada por inmunodeficiencia y eosinofilia. Los pacientes desarrollan desde los primeros meses de vida eritrodermia difusa, alopecia, paquidermia, diarrea incoercible, retraso en el crecimiento e infecciones graves. El timo se encuentra hipoplásico y sin diferenciación linfoide. Es característica la infiltración de linfocitos T en la piel, desarrollando reacciones autoinmunes dirigidas contra antígenos epiteliales. La población de linfocitos T es oligoclonal, con subpoblaciones

predominantes (CD4+, CD8+, CD4-CD8), según los individuos, y con marcadores de activación celular (CD25, DR). El número de linfocitos B está muy disminuido. La respuesta proliferativa es normal o se encuentra ligeramente disminuida, pero no es adecuada a los antígenos. Los niveles de todas las inmunoglobulinas se encuentran disminuidos, salvo los de IgE, que se encuentran muy elevados.

La identificación de mutaciones específicas en los genes RAG de estos pacientes explica el defecto en la maduración tanto de los linfocitos B como T y que el defecto en la activación de estos últimos es secundario a un defecto parcial en el proceso de recombinación V (D) J (32).

14. Deficiencia de purina-nucleósido-fosforilasa (PNP)

Esta inmunodeficiencia se caracteriza por un defecto tanto en la función como en el número de linfocitos T causado por una mutación genética en la purina-nucleósido-fosforilasa (PNP), una enzima del catabolismo del ADN codificada en el cromosoma 14. Esta enzima, presente en todas las células de mamíferos cataliza la fosforilación de guanosinas, deoxiguanosinas e inosinas. Su deficiencia se traduce en un aumento intracelular en la concentración de guanosinas, deoxiguanosinas, guanosina trifosfato (GTP) y deoxiguanosina trifosfato (dGTP). El dGTP inhibe la ribonucleósido-trifosfato reductasa, una enzima que participa en la síntesis del ADN. Los precursores de los linfocitos T con estos metabolitos acumulados son más vulnerables a la destrucción que otras células. Por lo tanto, los pacientes con deficiencia de PNP tienen un número muy bajo de células T, y la respuesta proliferativa a mitógenos está muy disminuida (33).

15. Deficiencia de adenosin-desaminasa (ADA)

Inmunodeficiencia combinada severa originada por mutaciones en los genes que codifican para la adenosin-desaminasa. La inmunodeficiencia se produce por una acumulación de metabolitos que son tóxicos para los linfocitos T y B (34). La ADA, que se presenta en todas las células de mamíferos, cataliza la desaminación de adenosina y deoxiadenosina. La deficiencia de ADA provoca un aumento de las concentraciones intracelulares de adenosina, deoxiadenosina, adenosina trifosfato (ATP), deoxiadenosil-trifosfato (dATP) y S-adenosil homocisteína. La dATP inhibe la ribonucleósido-difosfato-reductasa, una enzima implicada en la síntesis de ADN. La adenosina inhibe la adenosil-homocisteína-hidrolasa, una enzima que participa en la metilación del ADN dependiente de S-adenosilmetionina. La acumulación de estos metabolitos en los precursores de los linfocitos T y B, les hace ser más vulnerables que otras células. La ADA es relativamente abundante en el tejido linfóide y está presente en grandes concentraciones en el timo. El gen que codifica para la ADA ha sido localizado en el cromosoma 20 q13-ter y co-

difica una cadena polipeptídica única de 363 aminoácidos. En casi todos los casos de deficiencia de ADA, el mRNA se encuentra en cantidades normales o aumentadas. Se hereda de forma autosómica recesiva. La deficiencia de ADA ha sido tratada satisfactoriamente con trasplante de médula ósea o con transfusiones intravenosas de ADA conjugada a polietilenglicol. Recientemente, vectores de retrovirus que contienen el cADN para el ADA han sido transfectados en células de médula ósea, lográndose corregir la inmunodeficiencia. La deficiencia de ADA fue la primera enfermedad en la que se ensayó en células este último tratamiento (35).

16. Deficiencia de RAG1 o RAG2

Es una SCID, de herencia autosómica recesiva, caracterizada por la ausencia de linfocitos B. El defecto genético se debe a mutaciones en los genes de activación de la recombinación (RAG1 y RAG2). Estos genes son esenciales para el reordenamiento de los segmentos V, D y J de los genes de las inmunoglobulinas, y del receptor para antígeno de la célula T (TcR). Los individuos afectados presentan infecciones piógenas, debido a la ausencia de células B y a la disminución (variable según los enfermos) de las células T. Los linfocitos NK no están alterados (36).

17. Ataxia-telangiectasia (deficiencia de ATM)

La ataxia-telangiectasia es un trastorno neuroinmunológico progresivo, de herencia autosómica recesiva, causado por mutaciones en el gen ATM (AT mutated) situado en el cromosoma 11, que codifica una proteína que interviene en la transducción de señales, regulación del ciclo celular, reparación del ADN y procesos de recombinación somática. Los síntomas, que aparecen a partir de los 2 años, consisten en ataxia cerebelar progresiva, telangiectasia en ojos y orejas e infecciones sinopulmonares recurrentes. La incidencia es de 1:40.000. Los linfocitos sufren frecuentemente roturas, inversiones y translocaciones en los complejos de genes del TcR y de las inmunoglobulinas de los cromosomas 7 y 14 respectivamente, mientras que en los fibroblastos ocurre al azar. Por esto, y aunque no existe un patrón inmunológico único, por regla general, los individuos afectados presentan deficiencias en la función de los linfocitos T y el 40% de los pacientes desarrollan defectos en la inmunidad humoral, como deficiencias IgA o deficiencias de los isotipos IgG2-IgG4. Asimismo, el 95% de los pacientes tienen una concentración elevada de alfa2-macroglobulina, que es síntoma de un defecto de formación y maduración de órganos. El defecto génico (más de 150 mutaciones identificadas; todas únicas) afecta a una proteína que interviene en la reparación del ADN, ya que las células de estos enfermos presentan una gran susceptibilidad a las mutaciones provocadas por radiaciones ionizantes. Por esto, el 40% de los pacientes desarrolla tumores (37).

18. Síndrome de Nijmegen (deficiencia de nibrina)

Los pacientes con este síndrome (42 casos registrados) tienen, al igual que en la AT, una inestabilidad cromosómica caracterizada por inmunodeficiencia, sensibilidad a las radiaciones y aumento en el riesgo de padecer cáncer, pero un fenotipo neurológico diferente (microcefalia con progresiva discapacidad intelectual). Recientemente ha sido identificado el defecto primario en el gen denominado NBS1 que codifica para una proteína llamada nibrina. Aunque su función no está del todo esclarecida, se sabe que participa en la reparación de roturas del ADN de doble hebra y en la recombinación (38).

INMUNODEFICIENCIAS DE FAGOCITOS (cuadro IV)

Los fagocitos intervienen fundamentalmente en la defensa contra bacterias y hongos e incluyen polimorfonucleares y células de la serie monocito/macrófago, incluidas las células dendríticas. Por ello, en estas ID son frecuentes las infecciones por bacterias y hongos. La capacidad microbicida de los fagocitos depende esencialmente de una adecuada capacidad de extravasación (neutrófilos) desde la circulación hacia focos de daño tisular, de una adecuada respuesta o producción de citocinas activadoras (IFN- γ), de la producción de metabolitos tóxicos del oxígeno y de la liberación del contenido de sus gránulos (mieloperoxidasa, elastasa, colagenasa ...).

1. Deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD) o deficiencia de CD18

Es una rara enfermedad autosómica recesiva (hasta la fecha se han descrito menos de 100 pacientes) caracterizada por infecciones bacterianas y fúngicas, desde las primeras semanas de vida. La enfermedad suele ser fatal en el primer año de vida, y los individuos que sobreviven sufren infecciones recurrentes necróticas cutáneas y de tejido subcutáneo, cicatrización defectuosa (retraso en la caída del cordón umbilical), sinusitis, vaginitis, traqueobronquitis, septicemia, neumonía y periodontitis y/o gingivitis severas. La causa de la enfermedad es un defecto genético autosómico (cromosoma 21) en la molécula CD18, que forma la cadena β (95 kd) de una serie de moléculas de superficie (CD11a/CD18, CD11b/CD18 o CR3 y CD11c/CD18 o CR4) de la familia de las β integrinas; estas proteínas están encargadas de la unión de las células al endotelio y de la fagocitosis de partículas recubiertas de complemento (figura 2). Por ello, en estos pacientes, la mayoría de las funciones de adhesión y la fagocitosis de bacterias dependiente de C3b están disminuidas (39).

2. Enfermedad granulomatosa crónica (CGD)

Es una rara enfermedad (1:10⁵ de nacimientos) de herencia autosómica recesiva o ligada al cromosoma

X, originada por un defecto genético que provoca la incorrecta producción del anión superóxido (O₂⁻), principal mecanismo microbicida de los fagocitos. Los pacientes sufren desde los 2 años infecciones por microorganismos habitualmente no patógenos (catalasa positivos) y hongos como *Candida*. Son frecuentes la linfadenopatía, la hepatosplenomegalia, la neumonía y la formación de granulomas tisulares. El defecto primario reside en una enzima, la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH)-oxidasa, que cataliza la generación de O₂⁻. Esta enzima está compuesta por cuatro subunidades y se han descrito mutaciones en los genes que codifican para todas ellas: p91 phox (codificado en el cromosoma X y responsable de casi el 70% de los casos), p22 phox, p47 phox (casi el 30% de los casos) y p67 phox (en los cromosomas 16, 7 y 1, respectivamente). Como consecuencia de este defecto, los fagocitos son incapaces de destruir las bacterias en su interior. Debido al defecto enzimático, los leucocitos de estos pacientes son incapaces de reducir el azul de tetrazolio (NBT) y presentan valores disminuidos de quimioluminiscencia, lo que ayuda al diagnóstico (40).

3. Deficiencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) (figura 2)

Es una IDP ligada al cromosoma X, cuyas características clínicas son muy similares a las de la enfermedad granulomatosa crónica. Se han descrito unos 200 individuos afectados. El defecto primario se debe a mutaciones en el gen de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, localizado en el cromosoma X (Xq28) lo que causa una deficiente generación de NADPH, molécula necesaria para la reducción de la oxidasa de los fagocitos. Las únicas diferencias con la enfermedad granulomatosa crónica consisten en que las manifestaciones clínicas ocurren más tarde, y que en la deficiencia de G6PD los individuos afectados suelen desarrollar anemia hemolítica (41).

4. Deficiencia de mieloperoxidasa (figura 2)

Es la deficiencia enzimática más frecuente del sistema fagocítico (1:2.000 a 1:4.000) y se hereda de forma autosómica recesiva. El gen de esta proteína (una de las enzimas más abundantes de los leucocitos polimorfonucleares) se localiza en el cromosoma 17 (17q22-23). La deficiencia puede ser parcial o completa, siendo la susceptibilidad a los procesos infecciosos, principalmente infecciones por *Candida*, variable. La actividad bactericida es normal (producción adecuada de anión superóxido y H₂O₂), pero existe retraso en la lisis intracelular de microorganismos, proceso para el que esta enzima es fundamental (42).

5. Deficiencia del receptor de IFN- γ (CD119)

El IFN- γ , citocina producida por linfocitos NK y Th1, es el principal responsable de la activación de macrófagos infectados por bacterias intracelulares. Recientemente se han descrito distintas inmunodeficiencias

CUADRO IV
DEFECTOS CONGENITOS DEL NUMERO y/o FUNCION DE CELULAS FAGOCITICAS

Enfermedad (incidencia)	Células afectadas	Defecto primario	Diagnóstico inmunológico	Disfunciones o consecuencias inmunológicas/clínicas	Herencia Cromosoma	Tratamiento
Deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD) (< 100)	N+M+L+NK	CD18	Citolisis Citometría Adherencia	Ausencia de la proteína CD18, inadecuada extravasación, quimiotaxis, agregación celular, fagocitosis, citolisis T y NK	AR 21q22.3	Antibióticos Transfusiones Trasplante de medula ósea
Enfermedad granulomatosa crónica (CGD) (1:10 ⁶)		p91 phox		Hipergammaglobulinemia, granulomas, ausencia de función oxidativa Infecciones por patógenos catalasa positivos	XL Xp21.1	Antibióticos IFN γ Transfusiones
Enfermedad granulomatosa crónica (CGD autosómica recesiva)	N+M	p22 phox p47 phox p67 phox	NBT Quimioluminiscencia		16q24 7q11.23 1q25	
Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (200)	N+M	Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa	NBT Quimioluminiscencia Niveles enzimáticos	Ausencia de función oxidativa Granulomas Anemia hemolítica	XL	Antibióticos Transfusiones
Deficiencia de mieloperoxidasa (1:2.000 a 1:4.000)	N	Mieloperoxidasa	NBT Quimioluminiscencia Niveles enzimáticos	Ausencia de función oxidativa Infecciones por <i>Candida</i>	AR	Antibióticos
Deficiencia de IFN γ R1	N+M+L+NK	Cadena α o CD119 del IFN γ R	Citometría	Alteración de la capacidad bactericida, ausencia de IFN γ R, susceptibilidad a infecciones micobacterianas (BCG), incapacidad de formar granulomas Clínica similar a la lepra	AR 6q16.21	Antibióticos
Deficiencia parcial de IFN γ R1	N+M+L+NK	Cadena α o CD119 del IFN γ R	Citometría	Alteración de la capacidad bactericida, ausencia de IFN γ R, susceptibilidad a infecciones micobacterianas, capacidad residual de formar granulomas Clínica similar a la tuberculosis	AR	Antibióticos
Deficiencia de IFN γ R2 (de la cadena β)	N+M+L+NK	Cadena β del IFN γ R	Citometría	Clínica, inmunología e histopatología similar a la deficiencia de IFN γ R1	AR	Antibióticos
Deficiencia de IL12 (p40)	N+M+L+NK	Subunidad p40 de la IL12	Citometría ELISA	Baja producción de IFN γ , susceptibilidad a infecciones micobacterianas, capacidad variable de formar granulomas, clínica menos severa que en la deficiencia de IFN γ R1	γ AR? γ LX?	IFN γ IL12 Antibióticos
Deficiencia de IL12R β 1	N+M+L+NK	Cadena β del IL12R	Citometría	Baja producción de IFN γ , susceptibilidad a infecciones micobacterianas, capacidad variable de formar granulomas, clínica menos severa que en la deficiencia de IFN γ R1	AR 19	IFN γ Antibióticos
Síndrome de Chediak-Higashi (< 100)	N+M+NK	Lyst	NBT Quimioluminiscencia Citolisis	Alteración de la capacidad bactericida/citolítica Alteraciones en las plaquetas Infecciones por <i>S. aureus</i>	AR 1q4.3	Antibióticos
Deficiencia de células NK	NK	Desconocido	Citometría	Ausencia de poblaciones NK; infecciones víricas (herpes, citomegalovirus, varicela)		Antivíricos GGI

N: Neutrófilos; M: Monocitos/macrófagos; L: Linfocitos; NK: Células natural killer.

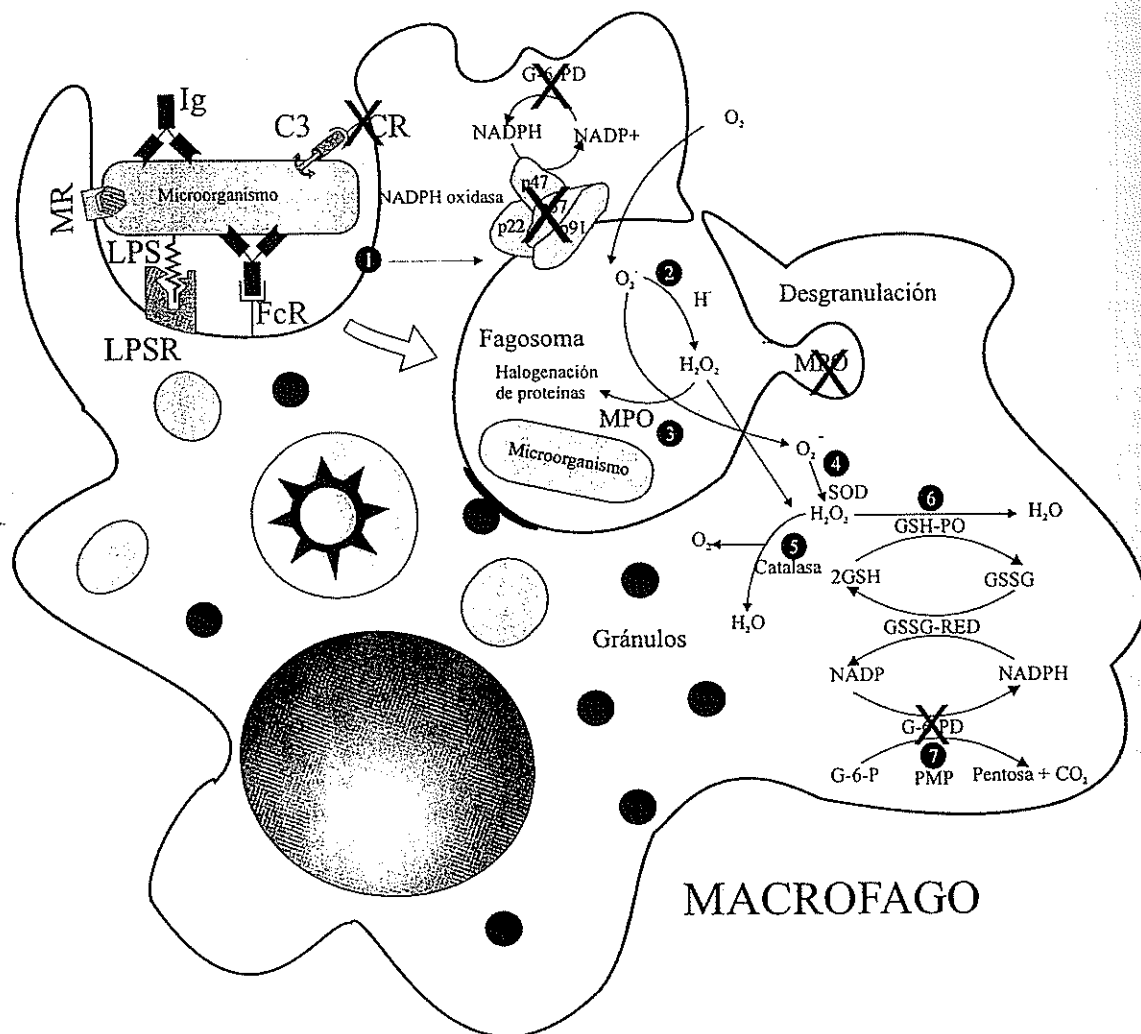


Figura 2.— Representación esquemática de la activación del macrófago.

El contacto de los patógenos opsonizados con los receptores de la superficie del macrófago (FcR, CR, LPSR, MR) inicia la fagocitosis, la activación de la NADPH oxidasa y la desgranulación. En el interior del fagosoma, los derivados del oxígeno interaccionan con las enzimas de los gránulos para la destrucción efectiva de los microorganismos ingeridos. CR = Receptor para complemento; LPSR = Receptor de lipopolisacárido; MR = Receptor de manosa. En la deficiencia de CD18 faltan algunos CR. Algunas de las reacciones que tienen lugar en el quemador respiratorio. (1) La señal recibida por un receptor de la membrana plasmática es transmitida a la NADPH oxidasa, que convierte el oxígeno molecular (O_2) en radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) con la ayuda del NADPH que procede de la ruta de las pentosas (PMP). La generación de NADPH está alterada en la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD). Cuando existen mutaciones en los genes que codifican para cualquiera de las cuatro subunidades que forman esta enzima sobreviene la enfermedad granulomatosa crónica (ver cuadro IV). (2) El radical superóxido se reduce espontáneamente en el interior del fagosoma a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (3) La mieloperoxidasa (MPO) descargada en el fagosoma desde los gránulos, utiliza el H_2O_2 junto con iones haluro como sustratos y cataliza la halogenación de las proteínas bacterianas, con la consiguiente eliminación de los patógenos. Mutaciones en el gen que codifica para la mieloperoxidasa provoca un defecto en la capacidad bactericida (ver cuadro IV). (4) El superóxido que escapa del fagosoma es reducido hasta peróxido en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). (5) El peróxido es reducido a O_2 y H_2O en una reacción catalizada por la catalasa. Cierta cantidad del O_2 puede ser reutilizada y convertida de nuevo en superóxido. (6) El peróxido oxida al glutatión (GSH) en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GSH-PO). El glutatión oxidado (GSSG) es reducido con la ayuda del NADPH y la enzima glutatión reductasa (GSSG-RED). (7) El NADPH proviene de la ruta de las pentosas en la que la glucosa es degradada en moléculas simples. La ruta es estimulada por la disponibilidad del $NADP^+$ generado durante el quemador respiratorio en la reacción catalizada por las enzimas NADPH oxidasa y la glutatión reductasa.

CUADRO V
DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO

Deficiencia	Función inmune alterada	Sintomatología	Herencia	Cromosoma	Tratamiento		
<i>Deficiencias de la vía clásica</i>							
C1q	Pobre eliminación de inmunocomplejos y bacterias piógenas	Síndrome similar al LES, enfermedad reumatoide, infecciones	AR	1	Antibióticos		
C1r			AR	12			
C4		AR	6				
C2		Síndrome similar al LES, vasculitis, poliomiositis	AR	6			
C3		Infecciones piogénicas recurrentes	AR	19			
<i>Deficiencias de la vía alternativa</i>							
Factor B	Pobre eliminación de <i>Neisseria</i>	Infección por <i>Neisseria</i>	AR	6	Antibióticos		
Factor D			AR	?			
<i>Deficiencias de la vía lítica</i>							
C5	Pobre eliminación de <i>Neisseria</i> e inmunocomplejos	Infección por <i>Neisseria</i> , LES	AR	9	Antibióticos		
C6			AR	5			
C7		Infección por <i>Neisseria</i> , LES vasculitis	AR	5			
C8 α^2		Infección por <i>Neisseria</i> , LES	AR	1			
C8 β			AR	1			
C9		Infección por <i>Neisseria</i>	AR	5			
<i>Deficiencias de regulación</i>							
Inhibidor C1		Activación excesiva del complemento	Angioedema hereditario	AR		11	Administración de la proteína purificada Antifibrinolíticos Andrógenos
C4bp			Angioedema, Síndrome de Behçet	?		1	
CD55 (DAF)	Hemoglobinuria paroxística nocturna		?	1			
CD59			?	11			
Factor I	Infecciones piogénicas recurrentes		AR	4			
Factor H			AR	1			
Properdina	Infección por <i>Neisseria</i>		LX	X			

1. La deficiencia de C1r en la mayor parte de los casos está asociada a la deficiencia de C1s. El gen para C1s también está situado el cromosoma 12 p ter.
2. La deficiencia de C8 α está siempre asociada a la deficiencia de C8 γ . El gen que codifica para C8 γ se sitúa en el cromosoma 9 y es normal a no ser que C8 γ se una covalentemente a C8 α .

debido a la existencia de mutaciones en los genes que codifican para el receptor de IFN- γ (ver cuadro IV, figura 2). La deficiencia de este receptor provoca alteraciones en la funcionalidad de los fagocitos (imposibilidad de formación adecuada de granulomas, disminución de la función antimicobacteriana). Los individuos que padecen esta deficiencia presentan, por tanto, una gran susceptibilidad a infecciones graves por micobacterias (43).

6. Deficiencia de IL12 o de su receptor (figura 1)

La IL12, citocina producida por macrófagos y células dendríticas, regula la producción de IFN- γ . Últimamente comienzan a describirse nuevas inmunodeficiencias tanto en la producción de esta citocina como en la expresión de su receptor, lo que se traduce, al igual que en la deficiencia del receptor de IFN- γ , en infecciones por microorganismos intracelulares. Sin embargo el tratamiento terapéutico con IFN en estos pacientes elimina satisfactoriamente el patógeno (43).

7. Síndrome de Chediak-Higashi (deficiencia de Lyst) (CHS)

Es una rara enfermedad autosómica recesiva multisistémica, caracterizada por infecciones piógenas recurrentes, albinismo parcial, infiltración de linfocitos no neoplásicos en varios órganos y anomalías del SNC. Sólo se han descrito alrededor de 100 casos. Los leucocitos y las plaquetas de estos pacientes contienen gránulos citoplasmáticos gigantes como consecuencia de la existencia de mutaciones en el gen que codifica para la proteína Lyst, involucrada en el transporte lisosómico. Esto afecta a la capacidad de degranulación de los neutrófilos y de los monocitos (causa una disminución de la respuesta a infecciones), a los melanocitos (causa albinismo), a las células del SNC y a las plaquetas (alteran el proceso de curación de heridas). La función de los linfocitos NK se encuentra disminuida, mientras que la formación de aniones es normal (a diferencia de la enfermedad granulomatosa crónica). Los linfocitos T y B, en cambio, son normales. La tasa de muerte intracelular de microorganismos está muy reducida (citotoxicidad de neutrófilos) (44).

8. Deficiencias de linfocitos NK

Aunque hay casos aislados de deficiencias muy selectivas de linfocitos NK, por lo general las deficiencias de estas células se asocian a deficiencias de fagocitos (como en el síndrome de Chediak-Higashi o en la deficiencia de adhesión leucocitaria) o de linfocitos T (en algunas SCID). En la única deficiencia selectiva de NK descrita el paciente sufría infecciones repetidas por virus del grupo herpes (varicela, citomegalovirus y herpes simple) lo que refuerza la idea de que los linfocitos NK protegen de los patógenos intracelulares y complementan a los linfocitos citotóxicos (45).

DEFICIENCIAS DEL COMPLEMENTO (cuadro V)

Las deficiencias del complemento conllevan, en líneas generales, una mayor susceptibilidad a determinadas infecciones bacterianas (principalmente por neumococo, *H. influenzae* y meningococo) y a procesos reumáticos. Se han descrito deficiencias del complemento causadas por casi todos los componentes y factores de la regulación, así como de los receptores del sistema del complemento. Las deficiencias de los componentes de la vía clásica (C1q, C1r, C1s, C4, C2 y C3) están asociados con enfermedades provocadas por la dificultad de producir la opsonización de bacterias piógenas (infecciones bacterianas como meningitis, infecciones sinopulmonares) o la eliminación de inmunocomplejos (más del 50 % de los pacientes con deficiencias de C2 y C4 tienen LES). Los defectos de los componentes de la vía alternativa (Factor B y D) producen una gran susceptibilidad a las infecciones por *Neisseria*. Los defectos de la vía lítica (C5, 6, 7, 8, 9) se asocian a enfermedades por inmunocomplejos y también por *Neisseria*. Las proteínas reguladoras controlan el sistema del complemento, evitando su activación espontánea y manteniendo el nivel de todos los componentes que lo forman. Cuando hay una deficiencia de alguna de ellas se puede producir un consumo continuo de ciertos componentes (las deficiencias del Factor H o I conllevan un agotamiento del C3). Estas deficiencias se parecen clínicamente a las deficiencias de la vía clásica o lítica. En otros casos (deficiencia de C1 inhibidor, C4bp, CD55, CD59) se produce una activación masiva del complemento, dañando los tejidos más expuestos a los antígenos (la piel y las mucosas en los dos primeros casos) o simplemente más sensibles (como los eritrocitos en las restantes deficiencias, que carecen de otras moléculas protectoras). Por último, se han descrito deficiencias en los receptores de sistema del complemento, como CR3 y CR4; en estas deficiencias el defecto de expresión de los receptores es el resultado de una mutación en el gen que codifica para la cadena β de una serie de moléculas de adhesión que pertenecen a la familia de las integrinas. La enfermedad causada es la deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD); este trastorno se debe probablemente a la combinación de una disminución de la fagocitosis de bacterias dependiente de C3b y una disminución de la capacidad de adherencia de los neutrófilos a los endotelios de los tejidos infectados (46).

Agradecimientos

Queremos agradecer a Manuela Beltrán Vicente y Noelia Sánchez Sánchez su colaboración en la elaboración de los cuadros.

REFERENCIAS

1. Report of a WHO Scientific Group. Primary Immunodeficiency Diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: Suplemento 1.
2. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9: 722-727.
3. Bruton OC, Apt L, Gitlin D, Janeway CA. Absence of serum gamma globulins. *Am J Dis Child* 1952; 84: 632-636.
4. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the Src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; 361: 226-233.
5. Tsukadza S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; 72: 279-290.
6. Conley ME. Autosomal recessive agammaglobulinemia. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM ed. Primary immunodeficiency diseases. New York: Oxford University Press 1999; 285-291.
7. Vyas GN, Perkins HA, Yang YM, Basantani GK. Healthy blood donors with selective absence of immunoglobulin A: prevention of anaphylactic transfusion reactions caused by antibodies to Ig A. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 838-842.
8. Kanoh T, Mizumoto T, Yasuda N, et al. Selective IgA deficiency in Japanese blood donors. Frequency and statistical analysis. *Vox Sang* 1986; 50: 81-86.
9. Hammarström L, Persson MAA, Smith CIE. Immunoglobulin subclass distribution of human anti-carbohydrate antibodies: aberrant pattern in IgA deficient donors. *Immunology* 1985; 54: 821-826.
10. Olerup O, Smith CIE, Björkander J, Hammarström L. Shared HLA class II associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10653-10657.
11. Spickett GP, Farrant J, North ME, Zhang J, Morgan L, Webster ADB. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol. Today* 1997; 18: 325-328.
12. Spickett GP, Webster ADB, Farrant J. Cellular abnormalities in common variable immunodeficiency. *Immunodef Rev* 1990; 2: 199-219.
13. Hermaszewski RA, Webster ADB. Primary hypogammaglobulinemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med* 1993; 86: 31-42.
14. Vorechovsky I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster ADB, Björkander J, Smith CIE, Hammarström L. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 1995; 77: 185-192.
15. Stavnezer-Nordgren J, Kekish O, Zegers BJ. Molecular defects in a human immunoglobulin kappa chain deficiency. *Science* 1985; 230: 458-461.
16. De la Salle H, Hanau D, Fricker D, et al. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 1994; 265: 237-241.
17. Mach B, Steimle V, Martínez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 301-331.
18. Arnaiz-Villena A, Timón M, Corell A, Pérez Aciego P, Martín-Villa JM, Regueiro JR. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-g subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 1992; 327: 529-533.
19. van Tol MJD, Sanal Ö, Langlois van den Bergh R, et al. CD3g chain deficiency leads to a cellular immunodeficiency with mild clinical presentation. *The Immunologist* 1997 suppl. 1: 41.
20. Soudais C, Villartay JP, Deist FL, Fischer A, Lisowska-Groszpiere B. Independent mutations of the human CD- ϵ gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat Genet* 1993; 77-81.
21. Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, Parslow TG. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP 70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994; 264: 1596-1599.
22. Elder ME, Hope TJ, Parslow TG, Umetsu DT, Wara DW, Cowan MJ. Severe combined immunodeficiency with absence of peripheral blood CD8+ T cells due to ZAP-70 deficiency. *Cell Immunol* 1995; 165: 110-117.
23. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor γ chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Ann Rev Immunol* 1995; 14: 179-205.
24. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the α chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3168-3171.
25. Macchi P, Villa A, Giliani S, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 1995; 377: 65-68.
26. Di Santo JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fisher A, de Saint Basile G. Brief report: CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361: 541-543.
27. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-946.
28. Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 924-933.
29. Villa A, Notarangelo L, Macchi P, et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in WASP gene. *Nat Genet* 1995; 9: 414-417.
30. de Waal OM, Seynhaeve V. Reticular dysgenesis. *Lancet* 1959; 2: 1123-1125.
31. Sayos J, Wu C, Morra M, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signal induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; 395: 462-469.
32. Villa A, Santagata S, Bozzi F, et al. Partial V(D)J recombination activity leads to Ommen syndrome. *Cell* 1998; 93: 885-896.
33. Market ML, Finkel BD, McLaughlin TM, et al. Mutations in the purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Hum Mutat* 1997; 9: 118-121.
34. Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972; 2: 1067-1069.
35. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995; 270: 470-475.
36. Schwarz K, Gaus GH, Ludwig L, et al. RAG mutations in human B-cell negative SCID. *Science* 1996; 274: 97-99.
37. Gatti RA, Berkel I, Boder E, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988; 336: 577-580.
38. Varon R, Vissinga C, Platzer M, et al. Nibrin, a novel DNA double-stranded break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998; 93: 467-476.

39. Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson DC, Springer TA. Heterogeneous mutations of the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1 and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* 1987; 50: 193-201.
40. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991; 77: 673.
41. Roos D, Curnutte. Chronic granulomatous disease. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM eds. Primary immunodeficiency diseases. New York: Oxford University Press 1999, 356-374.
42. Naussef W, Brigham S, Cogley M. Hereditary myeloperoxidase deficiency due to a missense mutation of arginine 569 to tryptophan. *J Bio Chem* 1994; 269: 1212-1216.
43. Ottenhoff THM, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunology Today* 1998; 19: 491-494.
44. Barbosa MDFS, Barrat FJ, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996; 382: 262-265.
45. Whiteside TL, Herberman RB. Role of natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 2: 125-133.
46. Sullivan KE, Winkelstein JA. Genetically determined deficiencies of the complement system. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, eds. Primary immunodeficiency diseases. New York: Oxford University Press 1999; 397-416.