



**Facultad de Medicina
Departamento de Medicina**

Tesis doctoral

**Activación y función cooperadora del
linfocito T en la inmunodeficiencia
variable común**

Jaime Pons de Ves

2011



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Facultad de Medicina
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28805 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfonos: 91 885 45 33 / 47 07 / 48 70
Fax: 91 885 47 07 / 45 26
dpto.medicina@uah.es

Juana María Ferrer Balaguer, Facultativa Especialista de Área del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Son Espases,

CERTIFICO QUE:

El trabajo de investigación presentado por D. Jaime Pons De Ves, realizado bajo mi dirección, y titulado "Activación y función cooperadora del linfocito T en la inmunodeficiencia variable común", reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para así conste, a los efectos oportunos, firmo la presente en Palma de Mallorca a 15 de abril de dos mil once.



*Agustín Albillos Martínez, Catedrático de Medicina y Director del
Departamento de Medicina*

INFORMA QUE:

En su opinión, el trabajo de investigación presentado por D. Jaime Pons de Ves titulado "Activación y función cooperadora del linfocito T en la inmunodeficiencia variable común" y, realizado bajo la dirección de la Dra. D^a. Juana María Ferrer Balaguer, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a cinco de septiembre de dos mil once.



**Facultad de Medicina
Departamento de Medicina**

Tesis doctoral

**Activación y función cooperadora del
linfocito T en la inmunodeficiencia
variable común**

**Tesis presentada por Jaime Pons de Ves
para optar al grado de Doctor**

Directora: Dra. Juana María Ferrer Balaguer

**El presente trabajo ha sido
realizado con ayuda de los
proyectos FIS 02/1005, FIS
05/0779 y FIS 08/0362.**

Agradecimientos

A la Dra. Joana Ferrer por la paciencia que ha tenido para la realización de este trabajo y por su apoyo y estímulo en los proyectos en los que hemos participado.

A la Dra. Nuria Matamoros por inculcarme su pasión por las inmunodeficiencias primarias.

A los Dres. Joan Milà, Rosa Julià, Julio Iglesias, Natalia Martínez y Ana Cambra por su apoyo y compañerismo durante todos los años compartidos en el Servicio de Inmunología.

Al Dr. Alvar Agustí por la confianza que siempre depositó en mí.

A los Dres. Xavier Busquets y José Antonio Bengoechea por sus aportaciones críticas y su colaboración en la Unidad de Investigación.

A todas las personas con las que he trabajado en el Servicio de Inmunología y en la Unidad de Investigación por compartir el día a día durante tantos años.

Al Dr. Melchor Álvarez de Mon por sus apasionadas y apasionantes clases de inmunología.

A la Fundación Barceló por patrocinar y organizar unos extraordinarios cursos de medicina e inmunología en Mallorca.

A mi familia. A Marga y Paquita por cuidar siempre de todos. A Damià y Gabriel por su espíritu crítico. A Jero por su apoyo incondicional y su infinita paciencia. A mis padres porque este trabajo también es fruto de su esfuerzo.

Índice

Summary	11
Abreviaturas	13
Introducción	17
I. Inmunodeficiencias Primarias	19
II. Inmunodeficiencia Variable Común	22
1. Manifestaciones clínicas.....	22
1.1. Infecciones.....	22
1.2. Procesos autoinmunitarios e inflamatorios.....	24
1.3. Neoplasias.....	25
2. Etiopatogenia.....	26
2.1. Célula presentadora de antígeno.....	28
2.2. Linfocito T.....	30
2.2.1. Mutaciones en ICOS.....	35
2.3. Linfocito B.....	36
2.3.1 Mutaciones en CD19, CD20 y CD81.....	38
2.3.2 Polimorfismos en TACI / TNFRSF13B, BAFF-R y MSH5.....	39
3. Diagnóstico.....	39
3.1. Diagnóstico diferencial.....	40
4. Tratamiento.....	43
Hipótesis	45
Material y métodos	49
I. Obtención de células mononucleadas y linfocitos T	51
II. Visualización de proteínas fosforiladas	52
III. Cultivos celulares	53
IV. Citometría de flujo	55

V. Cuantificación de citocinas.....	56
VI. Análisis estadístico.....	58
Resultados.....	61
I. Características de los pacientes con IVC.....	63
1. Datos demográficos, inmunoglobulinas y poblaciones linfocitarias...	63
2. Linfocitos B.....	66
3. Linfocitos T.....	69
3.1. Linfocitos T CD4.....	69
3.2. Linfocitos T CD8.....	70
II. Estudios funcionales en células mononucleadas.....	73
1. Patrón de fosforilación en tirosina.....	73
2. Proliferación celular.....	74
3. Producción de citocinas (IL-2 e IL-10).....	74
III. Estudios funcionales en linfocitos T.....	77
1. Patrón de fosforilación en tirosina.....	77
2. Proliferación celular.....	78
3. Producción de citocinas.....	79
4. Moléculas co-estimuladoras.....	83
4.1. Expresión de CD28.....	83
4.2. Expresión de CD40L / CD154.....	85
4.3 Expresión de CTLA-4 / CD152.....	89
Discusión.....	95
Conclusiones.....	107
Bibliografía.....	113
Publicaciones.....	131
Otras publicaciones relacionadas.....	141

Summary

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is an heterogeneous syndrome characterized by hypogammaglobulinaemia and recurrent infections. Although early works pointed to a primary B lymphocyte defect as a cause of the disease, a failure in T lymphocyte cooperation has also been suggested. We studied T cell properties in order to elucidate whether alterations in T cells could be responsible for a deficient T/B cooperation in CVID patients. We evaluated, in T lymphocytes from CVID patients and healthy controls, the distribution of naïve and memory cells, the proliferative response, the expression of co-stimulatory molecules (CD28, CD40L/CD154 and CTLA-4/CD152), the production of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) and the tyrosine phosphorylation pattern. Peripheral blood mononucleated cells and purified T cells were stimulated with optimal doses of anti-CD3 or suboptimal doses of anti-CD3 and anti-CD28. The distribution of naïve and memory T lymphocytes was similar between CVID patients and controls. After stimulation, the proliferative response and the expression of co-stimulatory molecules (CD28, CD40L/CD154 and CTLA-4/CD152) were similar in both groups. Except for higher production of IL-4 after stimulation with anti-CD3, CVID patients T cells produced similar amounts of cytokines compared to controls. Neither alterations in the distribution of T lymphocytes nor imbalance between co-stimulatory molecules expression and cytokine production by T cells explain a deficient cooperation between T and B cells in our group of CVID patients.

Abreviaturas

AID: deaminasa inducida por activación; *activated induced deaminase*.

AP1: proteína activadora 1; *activator protein 1*.

APRIL: ligando inductor de proliferación; *a proliferation inducing ligand*.

BAFF: factor activador de células B; *B cell-activating factor*.

BAFF-R (TNFRSF13c): receptor del factor activador de células B (receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 13c); *B cell-activating factor receptor (tumor necrosis factor receptor superfamily 13c)*.

BCMA: antígeno de maduración de células B; *B-cell maturation antigen*.

BCR: receptor del linfocito B; *B cell receptor*.

cpm: cuentas por minuto.

CSR: cambio de clase de inmunoglobulina; *class-switch recombination*.

CTLA4: antígeno de linfocito T citotóxico 4; *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*.

ESID: sociedad europea de inmunodeficiencias primarias; *european society for immunodeficiencies*.

FITC: isotiocianato de fluoresceína; *fluorescein isothiocyanate*.

Fyn: proto-oncogen tirosina cinasa Fyn; *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*.

IDPs: Inmunodeficiencias Primarias.

ICOS: molécula co-estimuladora inducible; *inducible T-cell co-stimulator*.

IFN- γ : interferon gamma.

IL: interleucina.

ITAM: motivos de activación basados en residuos de tirosina; *immune receptor tyrosine-based activation motifs*.

ITK: cinasa de células T inducida por IL-2; *IL-2 inducible T cell kinase*.

IUIS: unión internacional de sociedades de inmunología; *international union of immunological societies*.

IVC: inmunodeficiencia variable común.

LAT: proteína unidora de la activación de células T; *linker of activation of T cells*.

Lck: cinasa específica de células linfoides; *lymphocyte specific protein tyrosine kinase*.

mfi: intensidad media de fluorescencia; *mean fluorescence intensity*.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; *major histocompatibility complex*.

Msh5: *mutS homolog 5*.

MyD88: gen primario de la respuesta de la diferenciación mieloide 88; *myeloide differentiation primary response gene 88*.

NF-AT: factor nuclear de células T activadas; *nuclear factor of activated T cells*.

NF- κ B: factor nuclear- κ B; *nuclear factor- κ B*.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; *pathogen associated molecular patterns*.

PE: ficoeritrina; *phycoerythrin*.

PerCp: proteína clorofila peridinina; *peridinin chlorophyll protein*.

PLC γ 1: fosfolipasa C γ 1; *phospholipase C γ 1*.

PMA: forbol miristato acetato; *phorbol myristate acetate*.

SLP76: proteína leucocitaria que contiene dos dominios de homología con SRC; *SRC-homology-2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*.

TACI/ TNFRSF13B: activador transmembrana y modulador de calcio que interacciona con el ligando de ciclofilina / receptor de la superfamilia del

factor de necrosis tumoral 13B; *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor / tumor necrosis factor receptor superfamily 13b*.

TCR; receptor del linfocito T; *T cell receptor*.

Th: T cooperadora; *T helper*.

TLR: receptores tipo “toll like”; *toll-like receptors*.

TRAFs: familia de factores asociados al receptor del TNF; *tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor family*.

Zap-70: cadena zeta asociada a la proteína cinasa de 70 kDa; *ζ chain associated protein kinase of 70 kDa*.

Introducción

I. Inmunodeficiencias Primarias

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo de enfermedades causadas por alteraciones de componentes del sistema inmunitario. Clínicamente se caracterizan por una inusual susceptibilidad del organismo a padecer infecciones de repetición, aunque también son frecuentes las enfermedades autoinmunitarias y/o autoinflamatorias, la patología alérgica y las neoplasias.

En 1970 la Organización Mundial de la Salud estableció una clasificación de IDPs (1;2) que periódicamente ha sido actualizada por la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) (3;4). El rápido avance en el conocimiento del funcionamiento del sistema inmunitario ha permitido identificar el defecto molecular subyacente en algunas inmunodeficiencias primarias e incluir en la clasificación nuevas entidades clínicas. Por otro lado la identificación de mutaciones de genes en IDPs ha ayudado a comprender algunos aspectos del funcionamiento del sistema inmunitario. Las IDPs pueden afectar a componentes del sistema inmunitario adaptativo e innato, así como a otras células no pertenecientes a ellos. Actualmente han surgido cambios en el concepto que existe de las IDPs. La creencia de que son enfermedades poco prevalentes, de marcado patrón hereditario, predominio en la infancia, mal pronóstico y caracterizadas únicamente por la presencia de infecciones severas ha cambiado. Las IDPs son enfermedades relativamente frecuentes, de presentación, en ocasiones, esporádica, que pueden manifestarse en la edad adulta. El pronóstico es bueno si se instaura tratamiento adecuado e inmediato y la expresión clínica no siempre se caracteriza por infecciones oportunistas. Pueden existir otros fenotipos o presentaciones clínicas en los que predominan cuadros autoinmunitarios, alérgicos, cáncer, hemofagocitosis o autoinflamación (5).

Las últimas clasificaciones de la IUIS dividen las IDPs en 8 grandes grupos atendiendo al componente del sistema inmunitario afectado, su asociación con otras patologías o el tipo de sintomatología a la que dan lugar (tabla 1) (4;6).

Tabla 1. Inmunodeficiencias primarias (IDPs)

1. Deficiencias combinadas T y B
 2. Deficiencias predominantes de anticuerpos
 3. Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos
 4. Enfermedades con alteraciones en la regulación de la respuesta inmunitaria
 5. Defectos congénitos del número y/o función fagocitaria
 6. Defectos del sistema inmunitario innato
 7. Enfermedades autoinflamatorias
 8. Deficiencias del complemento
-

Las deficiencias de anticuerpos se caracterizan por alteraciones en la cantidad y/o funcionalidad de todas o alguna clase de inmunoglobulina (tabla 2). Estas alteraciones pueden ser permanentes o transitorias e incrementan la susceptibilidad a padecer infecciones por microorganismos extracelulares, principalmente bacterias encapsuladas. Además, los pacientes con deficiencias de anticuerpos pueden presentar con mayor frecuencia enfermedades autoinmunitarias, autoinflamatorias, alérgicas y tumorales.

Tabla 2. Deficiencias de anticuerpos

1. Disminución severa de todas las clases de inmunoglobulinas con ausencia de linfocitos B
 - a. Déficit de Btk
 - b. Déficit de cadena pesada μ
 - c. Déficit de $\lambda 5$
 - d. Deficiencia de $Ig\alpha$
 - e. Deficiencia de $Ig\beta$
 - f. Deficiencia de BLNK
 - g. Inmunodeficiencia con timoma

2. Disminución severa de al menos 2 clases de inmunoglobulinas con valores normales o disminuidos de linfocitos B
 - a. Inmunodeficiencia variable común
 - b. Deficiencia de ICOS
 - c. Deficiencia de CD19
 - d. Deficiencia de TACI
 - e. Deficiencia de receptor de BAFF

3. Disminución severa de IgG e IgA con valores normales o elevados de IgM y valores normales de linfocitos B
 - a. Deficiencia de CD40L
 - b. Deficiencia de CD40
 - c. Deficiencia de AID
 - d. Deficiencia de UNG

4. Deficiencias de clases o cadenas ligeras de inmunoglobulinas con valores normales de linfocitos B
 - a. Mutaciones y deleciones de cadenas pesadas
 - b. Deficiencias de cadena kappa
 - c. Deficiencias aisladas de subclases de IgG
 - d. Deficiencias de IgA con deficiencia de subclases de IgG
 - e. Deficiencia selectiva de IgA

5. Deficiencia de anticuerpos específicos con valores normales de inmunoglobulinas y linfocitos B

6. Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia con valores normales de linfocitos B

II. Inmunodeficiencia Variable Común

La inmunodeficiencia variable común (IVC) se caracteriza por hipogammaglobulinemia y producción insuficiente de anticuerpos específicos con presencia de un número normal o disminuido de linfocitos B. La elevada frecuencia de infecciones bacterianas, principalmente de los tractos respiratorio y gastrointestinal caracteriza a la mayoría de los pacientes con IVC, sin embargo, esta inmunodeficiencia se asocia a manifestaciones autoinmunitarias y procesos linfoproliferativos o tumorales (7). En el 10-22% de pacientes es común la presencia de granulomas que afectan al pulmón con mayor frecuencia, aunque otros órganos como el tracto gastrointestinal, el bazo o el hígado pueden también estar afectados (8;9).

Es la inmunodeficiencia primaria sintomática de mayor prevalencia afectando aproximadamente a 1 de cada 25.000 a 60.000 personas. Existen dos picos de inicio de la enfermedad, el primero en la niñez y el segundo durante la tercera o cuarta décadas de la vida. Sin embargo, el diagnóstico se establece en la mayoría de los casos en la edad adulta debido a un retraso en la identificación del cuadro clínico. El tiempo medio transcurrido entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico es de 3905 días (10). La aparición de la IVC es esporádica en la mayoría de pacientes, aunque se ha descrito su asociación con otras inmunodeficiencias primarias, principalmente deficiencia de IgA en algunas familias (11).

1. Manifestaciones clínicas

1.1. Infecciones

Las infecciones del tracto respiratorio, principalmente sinusitis, bronquitis y neumonías, son las manifestaciones infecciosas más frecuentes en los

pacientes con inmunodeficiencias primarias humorales y, por tanto, en la IVC. Los microorganismos que con mayor frecuencia las causan son *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis* y *Streptococcus pneumoniae* (12). Si los pacientes no son diagnosticados y tratados adecuadamente, las repetidas infecciones pulmonares pueden conducir a la aparición de bronquiectasias e insuficiencia respiratoria crónica (13). En esta situación las infecciones suelen ser más graves y aparecen nuevos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* que, al igual que en la fibrosis quística, puede empeorar el pronóstico de la enfermedad (14). Un pequeño porcentaje, además, puede presentar infecciones por patógenos como micobacterias, hongos (12) y micoplasmas (15).

Entre las infecciones del tracto gastrointestinal, la más frecuente es la gastroenteritis por *Giardia lamblia* (16) que en ocasiones requiere varios ciclos de tratamiento para su erradicación. Otros gérmenes como *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter* también pueden causar cuadros gastrointestinales en estos pacientes.

Las infecciones víricas no son características de los pacientes con IVC, sin embargo, algunos sufren infecciones por virus herpes zoster, herpes simple y citomegalovirus (17). También se han descrito infecciones por echovirus, con afectación del sistema nervioso central, de evolución tórpida y desenlace fatal. En ocasiones este síndrome presenta manifestaciones no neurológicas típicas de la infección diseminada por enterovirus, como son un cuadro similar a la dermatomiositis, erupción cutánea, fiebre y hepatitis (18). En el LCR se detecta aumento de proteínas, linfocitos y, en ocasiones, el cultivo es positivo para el virus. Las hepatitis virales son menos frecuentes y, en general, secundarias a la administración de preparados de inmunoglobulinas (19).

1.2. Procesos autoinmunitarios e inflamatorios

Al igual que en otras inmunodeficiencias primarias, es frecuente la asociación de IVC y procesos autoinmunitarios. Éstos ocurren en el 22% de los pacientes aproximadamente, siendo más frecuentes en mujeres. Los pacientes con granulomas pueden verse afectados en un 50% (20).

La anemia hemolítica, la púrpura trombocitopénica idiopática y en menor grado la neutropenia autoinmune son los procesos autoinmunitarios más habituales. El diagnóstico de citopenia se realiza en muchos casos de forma previa al de IVC. Es posible que en algunos pacientes coincidan la púrpura trombocitopénica idiopática y la anemia hemolítica (síndrome de Evans) y/o la neutropenia autoinmune. Estos procesos no suelen prevenirse con la administración de gammaglobulina y, habitualmente, precisan de la administración de corticoides, inmunosupresores o incluso de esplenectomía para su resolución (21).

Otros, como la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria y anemia perniciosa se asocian con menor frecuencia a la IVC (17). La presencia de anticuerpos anti-IgA circulantes puede originar complicaciones durante el tratamiento con preparados de gammaglobulina y transfusiones sanguíneas que contengan IgA (22).

Los procesos inflamatorios, al igual que los autoinmunitarios, son más prevalentes en pacientes con IVC. Es característica la hiperplasia nodular linfoide, de difícil diagnóstico debido su escasa o nula sintomatología. Otras veces, la malabsorción asociada a la hiperplasia nodular linfoide puede agravar la hipogammaglobulinemia y originar pérdida de peso (19). La biopsia intestinal muestra atrofia de vellosidades e infiltración linfocitaria de la lámina propia similar a la enfermedad celíaca. A diferencia de la enfermedad celíaca, la hiperplasia nodular linfoide en los pacientes con IVC

es de origen desconocido y, ni el cuadro clínico, ni el anatomopatológico mejoran con la retirada del gluten de la dieta. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa también pueden observarse en algunos pacientes con IVC agravando su hipogammaglobulinemia (17).

La enfermedad pulmonar intersticial es característica de la IVC, sin embargo, es rara en otras inmunodeficiencias humorales como la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. Puede tener diferentes variantes histológicas: hiperplasia linfoide, neumonitis intersticial linfocítica, bronquiolitis folicular y enfermedad granulomatosa. Estos patrones pueden coexistir en biopsias del mismo paciente. La infiltración granulomatosa del pulmón es frecuente en los pacientes con IVC y suele ir asociada a granulomas en otras localizaciones (hígado, ganglio linfático, bazo, etc.) (12;23). La presencia de granulomas se ha relacionado con esplenomegalia y cuadros autoinmunitarios, principalmente trombocitopenia y anemia hemolítica, así como con linfopenia selectiva de la subpoblación CD4⁺CD45RA⁺ y disminución de la respuesta proliferativa T (24). La infiltración esplénica puede, en ocasiones, afectar al hígado causando hipertensión portal y progresión a cirrosis hepática.

1.3. Neoplasias

La frecuencia de neoplasias, tanto sólidas como hematológicas, es mayor en pacientes con IVC que en la población general. Entre las neoplasias hematológicas son frecuentes los linfomas que suelen ser más diferenciados que en otras inmunodeficiencias. La incidencia de carcinoma gástrico y timoma es también superior a la de la población general aunque su asociación a IVC no es tan clara como las anteriores (17;25;26).

2. Etiopatogenia

La respuesta frente a estímulos antigénicos externos y/o internos precisa de la coordinación de todos los elementos del sistema inmunitario. Los antígenos son reconocidos inicialmente por células presentadoras que, tras procesarlos, son capaces de presentar fragmentos peptídicos en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El complejo péptido-MHC es reconocido por los linfocitos T de manera específica a través del receptor del linfocito T o TCR. Sin embargo, para que puedan ser activados precisan de otras señales a través de contacto celular o de mediadores solubles. Estos linfocitos T activados son imprescindibles para que, a su vez, los linfocitos B maduren a células plasmáticas y puedan producir inmunoglobulinas (figura 1).

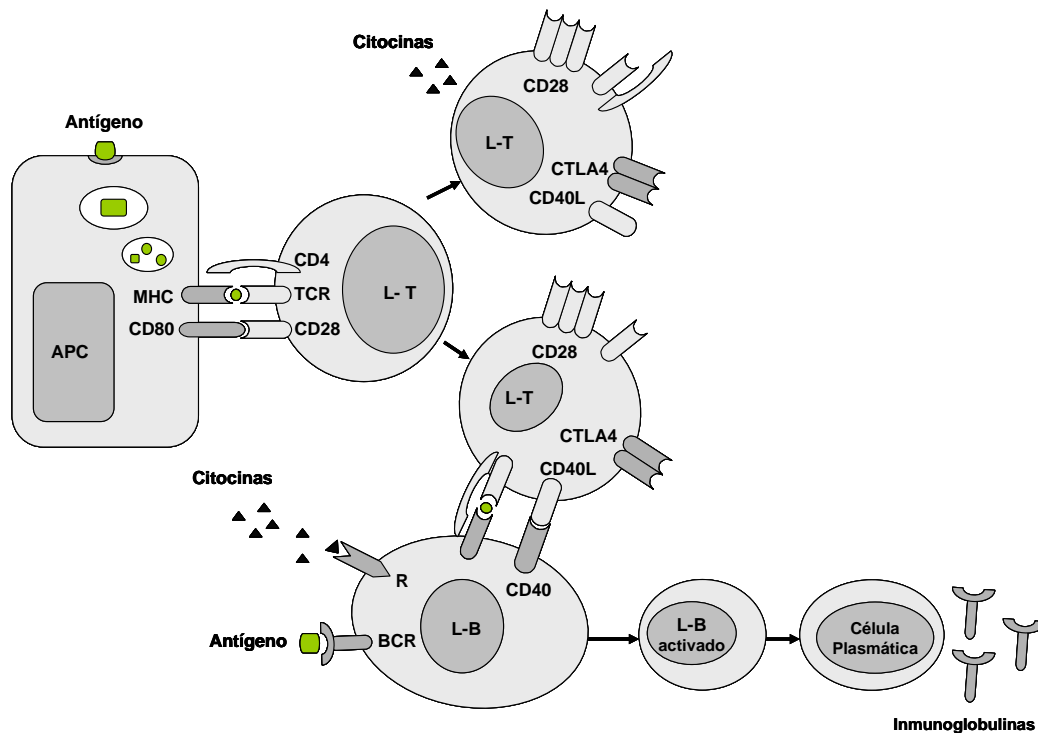


Figura 1. Respuesta inmunitaria y participación de células presentadoras de antígeno, linfocitos T, linfocitos B, moléculas de membrana y mediadores solubles.

Entre las deficiencias primarias de anticuerpos, las debidas a defectos en el proceso inicial de maduración del linfocito B ocasionan un bloqueo en el desarrollo del linfocito B inmaduro, cursan con ausencia de células B maduras en sangre periférica y disminución severa de la mayoría de inmunoglobulinas (27). Las alteraciones que afectan al proceso de diferenciación, como ocurre en la IVC, cursan, en general, con menor linfopenia B y menor disminución de los valores de inmunoglobulinas. Estas alteraciones afectan al cambio de clase de inmunoglobulinas, a la mutación somática de los genes de inmunoglobulinas o a ambos (figura 2).

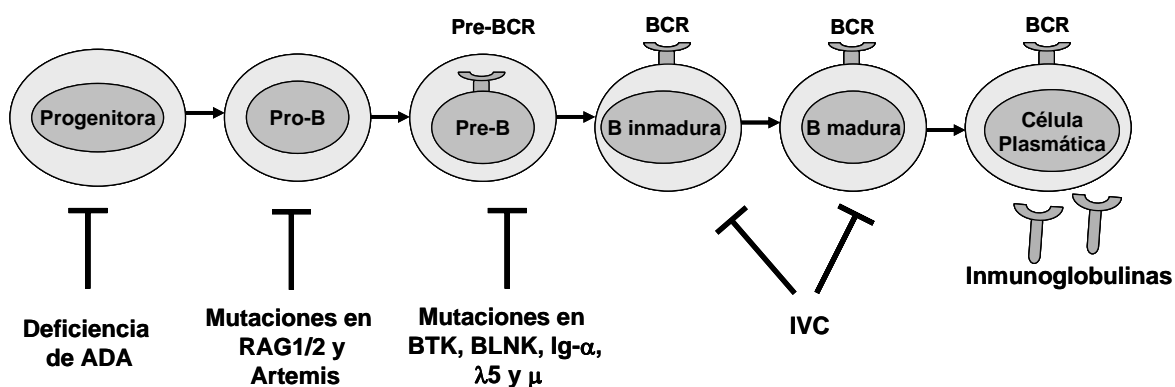


Figura 2. Desarrollo del linfocito B y principales mutaciones que afectan a su desarrollo. Las alteraciones observadas en los pacientes con IVC ocurren en los últimos estadios de maduración del linfocito B.

La heterogeneidad en la presentación clínica y datos analíticos, así como la ausencia de un claro patrón hereditario sugieren que, bajo la denominación de IVC pueden englobarse diferentes entidades. La principal característica de la enfermedad es la hipogammaglobulinemia secundaria a la deficiente maduración del linfocito B cuya causa es desconocida en la mayoría de los casos. El origen de la misma se ha relacionado con mecanismos intrínsecos

que afectan al desarrollo de la célula B, en unas ocasiones, y con mecanismos secundarios a la deficiente cooperación por parte del linfocito T, en otros.

Aunque el defecto en la maduración del linfocito B es el responsable final de la hipogammaglobulinemia de los pacientes con IVC, un elevado porcentaje de pacientes presentan alteraciones en los linfocitos T. Entre estas se incluyen linfopenia e incremento de la apoptosis basal y tras estimulación de la población CD4⁺CD45RA⁺ (28), alteración de la respuesta proliferativa T (29), deficiente producción de citocinas (30) y defectos en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40L/CD154 (31-33) y la molécula co-estimuladora inducible (ICOS) (34). Alteraciones en ICOS constituyen el único defecto molecular observado, hasta la actualidad, en linfocitos T de pacientes con IVC.

El defecto genético subyacente se ha identificado únicamente en un 10% de los pacientes con IVC. Entre los que afectan al desarrollo del linfocito B, se han descrito polimorfismos o mutaciones en el activador transmembrana y modulador de calcio que interacciona con el ligando de ciclofilina / receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 13B (TACI/ TNFRSF13B) (35;36), CD19 (37), receptor del factor activador de células B (BAFF-R) (38), proteína *mutS homolog 5* (Msh5) (39), CD20 (40) y CD81 (41). Mutaciones en el gen ICOS (34) apuntan a alteraciones en el linfocito T como causa primaria de la IVC. En el resto de pacientes no se ha identificado una alteración molecular que explique los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

2.1. Célula presentadora de antígeno

La célula presentadora de antígeno reconoce estructuras moleculares conservadas en microorganismos, denominadas patrones moleculares

asociados a patógenos o PAMP a través de receptores del sistema inmunitario innato “toll like” o TLR. El reconocimiento de los distintos PAMPs por las células presentadoras de antígeno, generará una rápida respuesta inmunitaria innata que, a su vez, dirigirá la respuesta adaptativa al perfil más conveniente para eliminar dicho microorganismo (42). Inicialmente inducirá la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias, moléculas co-estimuladoras y la maduración de la propia célula presentadora de antígeno. Una vez la célula presentadora de antígeno ha madurado será capaz de interactuar con linfocitos T, actuando de puente entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

Entre las células presentadoras de antígeno, las células dendríticas destacan por su gran capacidad de procesar y presentar antígenos. Una vez estimuladas en la periferia emigran al tejido linfoide donde van a adquirir características de células presentadoras profesionales incrementando la expresión en su superficie de moléculas del MHC y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 entre otras. Los antígenos reconocidos y procesados por la maquinaria de la célula presentadora de antígeno se dispondrán en la hendidura de las moléculas de MHC para ser presentadas al linfocito T que los reconocerá mediante el TCR en la llamada sinapsis inmunológica.

Recientemente se ha abordado la capacidad de diferenciación, maduración y función de células presentadoras de antígeno, células dendríticas derivadas “*in vitro*” de monocitos de pacientes con IVC, demostrando en un subgrupo de pacientes que estas células presentan defectos en la inducción de moléculas co-estimuladoras (43;44) aunque con resultados contradictorios en cuanto a su capacidad de producción de citocinas y de cooperar con linfocitos T. Otros estudios en sangre periférica de pacientes con IVC evidencian la existencia de un balance alterado en la distribución de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de sangre periférica (45).

2.2. Linfocito T

La célula T juega un papel central como efectora y reguladora de la respuesta inmunitaria. Estas funciones las realiza a través de contacto celular y producción de citocinas. Alteraciones de la regulación de la respuesta inmunitaria o de su cooperación en la misma por el linfocito T pueden ocasionar enfermedades autoinmunitarias, alérgicas e inmunodeficiencias.

El paso inicial para la activación y diferenciación del linfocito T es el reconocimiento por el TCR de péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Tras el reconocimiento, el complejo CD3 induce la oligomerización de TCRs y la coalescencia de lípidos de membrana favoreciendo el reclutamiento y la activación de enzimas intracitoplásmicas. Entre estas enzimas se encuentran fosfatasa y cinasas que ejercerán su función sobre diferentes sustratos e inducirán diversas vías de transducción de señales. El paso inicial tras la activación del TCR es la activación de las proteínas cinasas Lck y Fyn que van a fosforilar motivos de activación basados en residuos de tirosina o ITAM en las cadenas γ , δ , ϵ y ζ del complejo del TCR que además permite el reclutamiento y activación de la tirosina cinasa Zap-70. Entre los sustratos de Zap-70 se incluyen proteínas adaptadoras como SLP76 y LAT. Estos eventos llevan al reclutamiento y activación de la cinasa ITK y de PLC γ 1 (46). Éstas actúan sobre fosfatidilinositol 4,5 bifosfonato y se genera diacilglicerol e inositol trifosfato desencadenando la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. El flujo de calcio a través de los canales y el aumento de la concentración de calcio intracelular activan factores de transcripción como son NF- κ B, NF-AT y AP1, necesarios para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmunitaria (citocinas, moléculas co-estimuladoras, proteínas antiapoptóticas, etc.), así como para la

maduración y diferenciación de los linfocitos T y su conversión en células de memoria (47;48).

La memoria de los linfocitos es una de las características primordiales del sistema inmunitario. Una vez activados, los linfocitos T específicos de antígeno persisten y son capaces de responder de manera inmediata frente al antígeno. La memoria protectora está mediada principalmente por linfocitos T efectores que migran a los tejidos periféricos para ejercer su función y por linfocitos T de memoria central que se localizan principalmente en órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T de memoria central expresan marcadores de memoria como CD45RO (o ausencia de CD45RA) y marcadores de reclutamiento a áreas T de órganos linfoides secundarios (CCR7 y CD62L). A diferencia de las células T naïve (CD45RA) que también expresan estos dos receptores, los linfocitos T de memoria central son menos dependientes de moléculas co-estimuladoras para su activación e incrementan más la expresión de CD40L/CD154 lo que facilita una mayor cooperación con células dendríticas y linfocitos B. Los linfocitos T efectores pierden la expresión de CCR7, la expresión de CD62L es más heterogénea y expresan moléculas de adhesión para facilitar su reclutamiento a tejidos inflamados. Estas células se caracterizan por su rápida acción efectora y capacidad para producir citocinas. Además, un porcentaje de la población T CD8 efectora es citotóxica y se caracteriza por la re-expresión de CD45RA y la expresión de perforina (49;50).

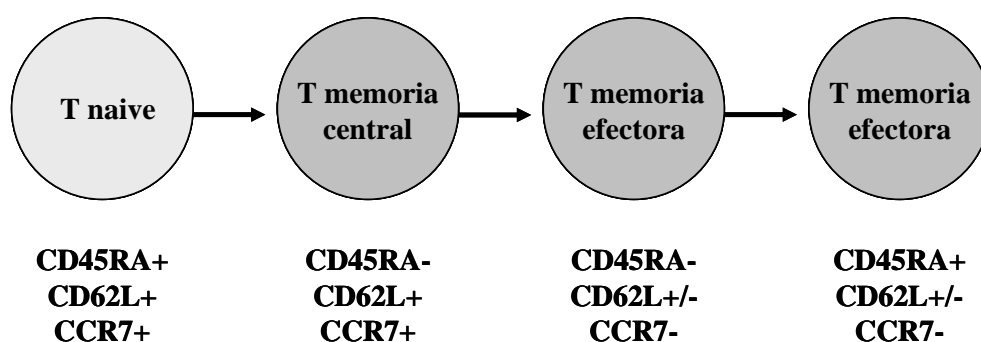


Figura 3. Clasificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ naíve y de memoria (central y efectora) según la expresión de CD45RA, CD62L y CCR7.

Aunque la especificidad de la célula T está determinada por la unión del TCR al complejo MHC-péptido antigénico, esta señal es insuficiente para inducir activación del linfocito T. Para ello es necesaria una segunda señal o señal co-estimuladora en cuya ausencia el resultado de la estimulación del linfocito T será de anergia o ausencia de respuesta en algunos casos y de apoptosis o muerte celular en otros (51). Entre las moléculas co-estimuladoras que juegan un papel determinante en la activación del linfocito T se encuentran CD28, CD40L/CD154, CTLA-4/CD152 e ICOS.

CD28 es una glicoproteína expresada constitutivamente en la superficie de la mayoría de linfocitos T CD4 y en la mitad, aproximadamente, de la subpoblación de linfocitos T CD8. Aunque en la mayoría de linfocitos T su expresión es constitutiva, ésta aumenta tras la activación de los mismos (52). La ausencia de señal a través de CD28 no afecta a las fases iniciales de la proliferación, sin embargo, es imprescindible para el mantenimiento de la proliferación tardía de los linfocitos T y, en general, de la respuesta inmunitaria (figura 4) (53;54).

La señalización a través de CD28 induce la activación de factores de transcripción como NF-κB, NF-AT, AP1. Estos factores permiten mantener

la respuesta proliferativa tardía al prevenir la apoptosis de los linfocitos T (53;55) al inducir la producción de factores antiapoptóticos. La señalización a través de CD28 es necesaria, además, para la inducción de la expresión de genes de citocinas, principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-2, imprescindibles para el mantenimiento de la respuesta inmunitaria (56;57).

Los trabajos que evalúan la expresión y la función de las moléculas co-estimuladoras en linfocitos T de pacientes con IVC son contradictorios. En estudios iniciales se observó una capacidad deficiente de los linfocitos T de pacientes con IVC de transmitir señalización tras estimulación a través del TCR (58). En linfocitos T de pacientes con IVC estimulados con mitógenos y anti-CD3 la adición de anti-CD28 a los cultivos era capaz de restablecer la respuesta proliferativa de las células T de los pacientes (59). Finalmente se observó un incremento de la apoptosis en la población de linfocitos T de pacientes con IVC en los que la viabilidad no podía ser revertida estimulando con anti-CD28 (60).

CD40L/CD154 es otra molécula co-estimuladora clave para la interacción entre linfocitos T y B. CD40L/CD154 se expresa fundamentalmente en la superficie de linfocitos T activados, principalmente en la subpoblación CD4. CD40 se expresa en linfocitos B y otras células como monocitos, macrófagos y células dendríticas. La interacción entre CD40L/CD154 y CD40 desempeña un papel fundamental en la regulación de los linfocitos B y en la producción de inmunoglobulinas principalmente a través de la inducción del cambio de clase o CSR, la maduración de afinidad de los anticuerpos, la diferenciación a células plasmáticas y la formación del centro germinal. La activación de CD40 induce una cascada de señales que activan factores asociados al receptor del TNF (TRAFs), vías de señalización dependientes de NF- κ B y la transcripción del gen que codifica para la deaminasa inducida por activación (AID). Además, la interacción entre CD40L/CD154 y CD40 juega un papel importante en la activación de células presentadoras de

antígeno (monocitos, macrófagos y células dendríticas), la producción de IL-12 y la diferenciación de linfocitos T capaces de producir IFN- γ y una respuesta de tipo 1 o Th1 de vital importancia para la defensa contra patógenos intracelulares (61;62).

En un estudio inicial se observó la disminución de RNA mensajero de CD40L/CD154 en células mononucleadas de sangre periférica (31) y también en linfocitos T purificados (33) de un subgrupo de pacientes con IVC estimulados con ésteres de forbol y en líneas de linfocitos T de pacientes transformados con *Herpesvirus saimiri* (32). En estudios posteriores no se han observado diferencias en la expresión de CD40L entre el grupo de pacientes con IVC y el grupo control al estimular con PMA e ionomicina (63). Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de CD40L/CD154 en linfocitos T purificados estimulados con anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28.

CTLA-4/CD152 es una molécula de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario, principalmente de la actividad de la población T, sin embargo, en contraposición a otras moléculas co-estimuladoras, CTLA-4/CD152 induce una respuesta negativa (figura 4). CTLA-4/CD152 comparte gran homología con CD28 y, al igual que ésta, es capaz de unirse a moléculas co-estimuladoras de células presentadoras de antígeno como CD80 y CD86 con una afinidad mayor que CD28. Una vez activada es capaz de inhibir la transducción de señal mediante la inhibición de la fosforilación de tirosinas que se produce tras la activación del linfocito T (64). CTLA-4/CD152 ha sido menos estudiada en pacientes con IVC y en un estudio reciente no se ha podido establecer asociación entre polimorfismos de CTLA-4/CD152 y la presencia de patología autoinmunitaria en pacientes con IVC (65).

2.2.1. Mutaciones en ICOS

La molécula ICOS pertenece a la familia de moléculas co-estimuladoras presentes en la célula T al igual que CD28, CD40L y CTLA-4/CD152. ICOS se expresa en linfocitos T activados y es necesaria, tras interactuar con su ligando (ICOS-L) en el linfocito B, para la secreción de citocinas, principalmente IL-10, claves en el desarrollo del linfocito B. La interacción de ambas moléculas es imprescindible para la diferenciación de linfocitos B a células de memoria y células plasmáticas (66).

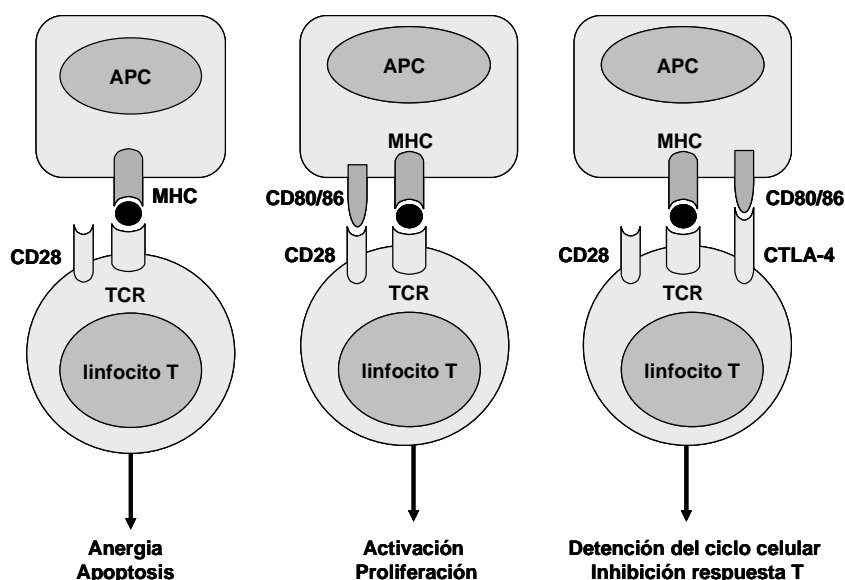


Figura 4. Presencia de CD28 y CTLA-4/CD152 en linfocitos T y resultado de la activación por moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86).

Se ha observado una delección parcial en homocigosis del gen que codifica para ICOS en un reducido porcentaje de pacientes con IVC. En ellos se produce una ausencia de expresión de ICOS en los linfocitos T. Aunque este grupo de pacientes con IVC no presentó alteraciones en la población T, la ausencia de cooperación hizo ineficaz la maduración y la producción de

anticuerpos por los linfocitos B originando hipogammaglobulinemia característica de los pacientes con IVC (34).

2.3. Linfocito B

La función principal de los linfocitos B es la producción y secreción de anticuerpos además del mantenimiento de la memoria humoral. La memoria de los linfocitos B está mediada por células plasmáticas que secretan anticuerpos y por los linfocitos B de memoria capaces de diferenciarse rápidamente a células plasmáticas en respuesta a la estimulación antigénica. Para el desarrollo de la célula B es necesario el reordenamiento de los genes de cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas en médula ósea. Los linfocitos B maduros que salen de médula ósea expresan IgD e IgM en su superficie y van a los folículos linfoides secundarios donde tiene lugar el cambio de clase de inmunoglobulina o CSR que permite la producción del resto de clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgE). En este proceso son imprescindibles la acción de enzimas como AID y MutS, la de citocinas (IL-10, IL-21, etc.) y CD40L/CD154 que actúan a través de sus respectivos receptores en el linfocito B. Finalmente los linfocitos B con mayor afinidad antigénica se convertirán en linfocitos B de memoria o células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (67).

Además de estos estímulos, para una correcta maduración del linfocito B es necesaria la interacción de miembros de la familia del TNF como el factor activador de células B (BAFF) y el ligando inductor de proliferación (APRIL), con sus receptores: antígeno de maduración B (BCMA), TACI/TNFRSF13B y BAFF-receptor/TNFRSF13C presentes en el linfocito B (68;69). Además, moléculas de membrana como CD19 y CD81, que disminuyen el umbral de señalización intracelular dependiente del receptor de la célula B y CD20, que favorece la respuesta en anticuerpos T

independiente, son también necesarias para una correcta respuesta B y para la producción de anticuerpos (70-72).

Según la capacidad funcional de los linfocitos B para producir IgM e IgG *in vitro* tras ser estimulados con anti-IgM en presencia de IL-2 los pacientes con IVC fueron clasificados inicialmente en diferentes grupos (73). Sin embargo, dada la complejidad de esta técnica para su realización de forma rutinaria, la clasificación de pacientes se realiza actualmente atendiendo a la distribución de las diferentes poblaciones de linfocitos B de memoria definidos según la expresión de IgD y CD27 de superficie (74;75). La población de linfocitos B se divide en tres grupos según su fenotipo: (i) linfocitos B naïve caracterizados por la expresión de IgD y la ausencia de expresión de CD27 (IgD⁺CD27⁻) en la superficie celular; (ii) células B de memoria que no ha realizado el cambio de clase de inmunoglobulina caracterizadas por la expresión conjunta de IgD y CD27 (IgD⁺CD27⁺) y (iii) célula B de memoria que han realizado el cambio de clase y que se caracterizan por la ausencia de expresión de IgD, la presencia de otras clases de inmunoglobulinas de superficie y CD27 (IgD⁻CD27⁺). Atendiendo a esta distribución de la población B, los pacientes con IVC pueden clasificarse en: (i) pacientes con la distribución de subpoblaciones B similar a los individuos normales; (ii) pacientes con porcentajes de linfocitos B de memoria (IgD⁺CD27⁺) similares a la población control, pero con ausencia de linfocitos B que han realizado el cambio de clase (IgD⁻CD27⁺) y, (iii) pacientes con ausencia de linfocitos B de memoria (CD27⁺). Existe una correlación entre la ausencia o disminución de células B de memoria y la disminución en la secreción de IgG e IgA, la respuesta deficiente a antígenos T independientes y la severidad de la patología infecciosa, principalmente por gérmenes encapsulados, presentada por los pacientes (76).

La expresión de algunos TLRs, en especial TLR9, es característica del linfocito B. El reconocimiento antigénico a través del receptor del linfocito B

(BCR) induce un aumento de la expresión de TLR9, que permite una activación T independiente. La expresión constitutiva de TLR9 en linfocitos B de memoria, les permite generar continuamente anticuerpos de diversas especificidades y el mantenimiento de la memoria inmunológica (77;78).

2.3.1 Mutaciones en CD19, CD20 y CD81

Se han descrito recientemente dos familias de pacientes con IVC y mutaciones en el gen que codifica para CD19. La expresión de CD19 en estos pacientes es residual o ausente, aunque el porcentaje de población linfoide B es normal. Estos pacientes se caracterizan clínicamente por padecer, al igual que otros pacientes con IVC, infecciones de repetición de los tractos respiratorio y gastrointestinal. Además son características la ausencia o títulos bajos de isohemaglutininas, así como ausencia de respuesta en anticuerpos frente al virus de la rabia y disminución de la proliferación de la población B (37).

Se ha descrito también una paciente con ausencia de expresión de CD20 debido a una mutación en el exón 5 del gen que codifica para CD20. Esta paciente presentó niveles bajos de IgG y normales de IgA e IgM. Los valores de poblaciones linfocitarias, incluyendo los de linfocitos B fueron normales, sin embargo esta última población no expresaba CD20. Los linfocitos B de memoria y la respuesta en anticuerpos estaban disminuidos (40).

CD81 forma parte de un complejo de membrana en los linfocitos B, junto a CD19, CD21 y CD225, que es capaz de disminuir el umbral de activación del BCR. Recientemente se describió un paciente con una mutación en homocigosis en el gen que codifica para CD81 que originó la ausencia de expresión de la proteína en la membrana además de la ausencia de expresión de CD19. El paciente presentó hipogammaglobulinemia, disminución de los linfocitos B de memoria, trombopenia y nefropatía (41).

2.3.2 Polimorfismos en TACI/TNFRSF13B, BAFF-R y MSH5

Un pequeño porcentaje de pacientes con IVC y algunos pacientes con deficiencia de IgA presentan mutaciones en el gen que codifica para TACI/TNFRSF13B (35;36). En estos pacientes, el número de linfocitos B es normal o está discretamente disminuido y las células B de memoria (CD27⁺) están disminuidas, principalmente las que han realizado el cambio de clase de inmunoglobulina (IgD-CD27⁺). Sin embargo, tanto en trabajos posteriores como en la última clasificación de la IUIS se describen las alteraciones en este gen como factores modificadores de la enfermedad o polimorfismos más que mutaciones causantes de la misma (4;79).

Se han observado también polimorfismos en los genes que codifican para BAFF-R (38) y Msh5 (39), sin embargo, dado que también se han detectado en individuos sin hipogammaglobulinemia, son necesarios más estudios para conocer el papel que dichos polimorfismos pueden desempeñar en el desarrollo de la hipogammaglobulinemia que presentan los pacientes con IVC.

3. Diagnóstico

La Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) establece dos grados diagnósticos de IVC: probable y posible. El diagnóstico probable se define por la presencia, en cualquier sexo, de valores de IgG dos desviaciones estándar por debajo de la media y disminución de IgM o de IgA además de cumplirse los siguientes criterios: (i) inicio de la enfermedad por encima de los dos años de edad; (ii) ausencia de isohemaglutininas y/o pobre respuesta a la vacunación; y (iii) ausencia de otras causas de hipogammaglobulinemia (Tabla 3). El diagnóstico posible se establece en pacientes con disminución

de una de las clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) que cumplen los criterios anteriormente citados (80).

3.1. Diagnóstico diferencial

Una vez se ha confirmado la hipogammaglobulinemia que caracteriza a estos pacientes, el diagnóstico de la IVC debe realizarse por exclusión de otros procesos que pueden cursar con datos clínicos y analíticos similares (Tabla 3).

Debe plantearse el diagnóstico de IVC en todo paciente que presente infecciones bacterianas de repetición, en especial del aparato respiratorio, y en el que se han descartado otras causas que predispongan a este tipo de infecciones, como la fibrosis quística, el síndrome del cilio inmóvil, procesos alérgicos de vías respiratorias o anomalías anatómicas de las mismas. También deben descartarse otras inmunodeficiencias primarias como la deficiencia de subclases de IgG, la deficiencia selectiva de IgA o la falta de respuesta en anticuerpos específicos con niveles normales de inmunoglobulinas séricas.

La ausencia de historia familiar, una mayor edad de aparición de las manifestaciones clínicas y la presencia de linfocitos B circulantes en la mayoría de pacientes con IVC, la diferencian de la agammaglobulinemia ligada al X y de otras formas de agammaglobulinemia con herencia autosómica recesiva.

Inmunodeficiencias primarias como el déficit de transcobalamina II asociado a hipogammaglobulinemia, el síndrome linfoproliferativo asociado al cromosoma X, la inmunodeficiencia combinada severa ligada al X y algunas alteraciones metabólicas deberían, también, tenerse en cuenta al evaluar otras posibles causas. Tampoco hay que olvidarse de ciertas anomalías

cromosómicas al realizar el diagnóstico diferencial como pueden ser las trisomías 8 y 21, la monosomía 22 y el síndrome del cromosoma 18q que, en ocasiones, se asocian a hipogammaglobulinemia. Finalmente, deben excluirse enfermedades infecciosas como la causada por el virus de la inmunodeficiencia humana, rubeola congénita, citomegalovirus, toxoplasma y virus de Epstein Barr. Otros diagnósticos a tener en cuenta son ciertas enfermedades tumorales (principalmente neoplasias hematológicas como leucemias linfáticas crónicas y linfomas) y alteraciones sistémicas como el hipercatabolismo de inmunoglobulinas o la pérdida excesiva de las mismas que ocurre en quemaduras severas, síndrome nefrótico, linfangiectasia o diarrea severa.

Algunos fármacos pueden provocar hipogammaglobulinemia. Por tanto, al evaluar un paciente con hipogammaglobulinemia debe valorarse la toma de medicación. Entre estos fármacos se encuentran los corticoides, sales de oro, carbamazepina, captopril, penicilamina, fenitoínas, fenclofenac, sulfasalacina y agentes antimalaria.

Tabla 3. Diagnóstico diferencial de la hipogammaglobulinemia

- 1. Inducida por drogas o fármacos.** Fármacos antimalaria, captopril, carbamazepina, corticoides, fenclofenaco, sales de oro, penicilamina, fenitoína, sulfasalazina.
 - 2. Alteraciones genéticas.** Ataxia telangiectasia, algunas formas de inmunodeficiencia combinada severa, hiper IgM, deficiencia de transcobalamin II e hipogammaglobulinemia, agammaglobulinemia ligada al X, alteración linfoproliferativa ligada al X asociada al virus de Epstein-Barr, inmunodeficiencia combinada severa ligada al X, alteraciones metabólicas, anomalías cromosómicas (síndrome del 18q-, monosomía 22, trisomía 8, trisomía 21).
 - 3. Enfermedades infecciosas.** Virus de la inmunodeficiencia humana, rubeola congénita, infección congénita por citomegalovirus o toxoplasma gondii, Epstein-Barr Virus.
 - 4. Neoplasias.** Leucemia linfática crónica, inmunodeficiencia asociada a timoma, linfoma no Hodgkin y otras neoplasias de células B.
 - 5. Alteraciones sistémicas.** Inmunodeficiencia secundaria a hipercatabolismo o pérdida excesiva de inmunoglobulinas (síndrome nefrótico, quemaduras, linfangiectasia, diarrea severa).
-

4. Tratamiento

El tratamiento de elección de los pacientes con IVC es la administración de gammaglobulina humana. Inicialmente se utilizó la vía intramuscular, sin embargo, en la actualidad se utilizan preparaciones de aplicación endovenosa y subcutánea. Las dosis recomendadas oscilan entre los 300 y 500 mg/kg de peso cada 2-4 semanas. Aunque en nuestro medio se utiliza preferentemente la vía endovenosa, diversos estudios han demostrado una eficacia y seguridad similar al utilizar la vía de administración subcutánea (81). Esta última es una buena alternativa en pacientes con dificultad para el desplazamiento a centros hospitalarios, que desempeñan una actividad laboral intensa o tienen necesidad de viajar y no pueden depender de las infusiones de gammaglobulina realizadas en el medio hospitalario. El tratamiento sustitutivo con gammaglobulina no es curativo, sin embargo, su correcta aplicación, unida a la instauración de tratamiento antibiótico inmediato en caso de infección y al diagnóstico precoz de la enfermedad, han conseguido mejorar notablemente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con IVC.

En los pacientes con IVC y enfermedad autoinmunitaria, el tratamiento de esta última con medicación inmunosupresora y/o inmunomoduladora puede complicar y agravar la inmunodeficiencia.

Hipótesis

Alteraciones en la función del linfocito T de los pacientes con inmunodeficiencia variable común (activación, proliferación y/o capacidad co-estimuladora y de producción de interleucinas) pueden ser la causa de una colaboración deficiente con el linfocito B. Ello daría lugar a defectos en la maduración del linfocito B y a la aparición de la hipogammaglobulinemia característica de estos pacientes.

Material y métodos

I. Obtención de células mononucleadas y linfocitos T

Las obtención de células mononucleadas se realizó mediante gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) a partir de muestras de sangre heparinizada. La población obtenida se utilizó para realizar cultivos celulares, lisados celulares y purificación de linfocitos T. La obtención de linfocitos T se realizó mediante selección negativa. Se incubaron 200 μ l de células mononucleadas de sangre periférica a una concentración de 10^7 /ml en PBS-BSA 0.1% con una mezcla de anticuerpos de ratón anti-CD14, anti-CD16, anti-CD56, anti-HLA DR y anti-HLA DP humanos (T cell negative isolation kit, Dynal) durante 10 minutos a 4° C. Las células se lavaron 2 veces con PBS-BSA 0.1% y, a continuación, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación con 2 ml de bolas de captura recubiertas con anticuerpos IgG específicos frente a los anticuerpos de ratón previamente descritos. La muestra se sometió a un campo magnético (Dynal MPC) y se recuperó la suspensión de células no adheridas al imán (figura 5). Tras dos lavados con PBS-BSA 0.1% las células se resuspendieron en RPMI 1640 (Cansera) con suero de ternera fetal (Gibco Laboratories) al 10%. La pureza de linfocitos T fue superior al 95% en todos los experimentos realizados. Estas células fueron utilizadas posteriormente para evaluar la proliferación celular, la visualización de proteínas fosforiladas en tirosina mediante *western blot*, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas.

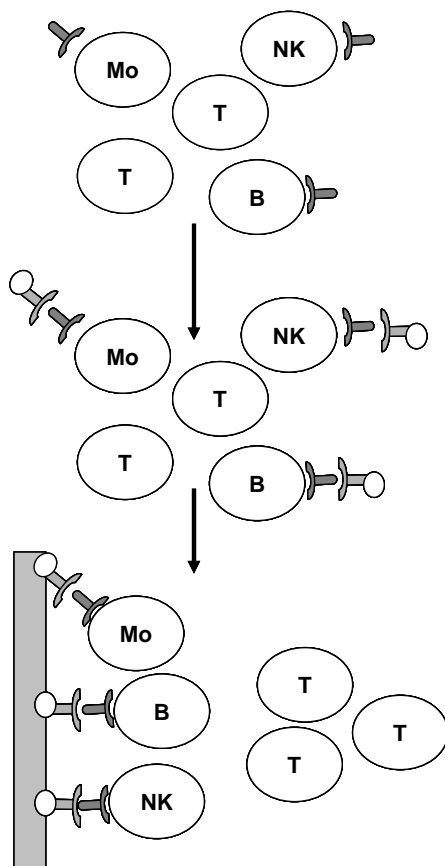


Figura 5. Representación esquemática de la obtención de linfocitos T mediante selección negativa.

II. Visualización de proteínas fosforiladas

El análisis de proteínas fosforiladas se efectuó en células mononucleadas de sangre periférica y en poblaciones de linfocitos T purificados mediante *western blot*. Ambas poblaciones celulares fueron estimuladas, lisadas y los lisados celulares se congelaron.

La estimulación celular se realizó incubando 10^6 células mononucleadas o linfocitos T resuspendidos en 100 μ l de RPMI con 1 μ g/ml de anti-CD3 (clon UCHT1, Dako) durante 10 minutos a 4° C. Posteriormente se mantuvieron 2

minutos a 37° C para su activación. La activación de linfocitos T purificados se realizó siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente y, además, para una correcta activación del receptor del linfocito T, se entrecruzaron los anticuerpos anti-CD3 de ratón con anticuerpos de cabra anti-ratón (anti-mouse IgG, Sigma) a una concentración de 20 µg/ml.

Tras la activación de células mononucleadas de sangre periférica o de linfocitos T, la reacción se paró con 2 mililitros de tampón de lisis frío (Tris-HCl 50mM, pH 7.4, octylphenoxypolyethoxyethanol -nonidet P-40- 1%, NaCl 150mM, EDTA 1 mM) en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, aprotinina 2 µg/ml y leupeptina 2 µg/ml) e inhibidores de fosfatasa (Na_3VO_4 1mM y NaF 1mM) y se congelaron para su posterior separación. El contenido proteico de los extractos fue cuantificado mediante ensayo colorimétrico de Bradford y se depositó la misma cantidad de extracto proteico de los diferentes lisados celulares en geles de poliacrilamida al 10%. Estos fueron separados y transferidos a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL nitrocellulose, Amersham Biosciences). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche en polvo al 5% en PBS durante 1 hora. A continuación se incubaron con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina (4G10, Upstate biotechnology) durante toda la noche a 4° C en agitación. Tras lavar la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó con anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa de rábano. Finalmente el revelado se llevó a cabo con sustrato quimioluminiscente (SuperSignal substrate *western blot* kit, Pierce) tras exposición durante 10 segundos de exposición.

III. Cultivos celulares

Para los cultivos, las células mononucleadas fueron resuspendidas a una concentración de 10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 (Cansera)

suplementado con suero de ternera fetal al 10%, glutamine (2 mM) (Gibco Laboratories), Hepes (200 mM) (Gibco Laboratories), penicilina y estreptomina (Gibco Laboratories). Se cultivaron 2×10^5 células por pocillo en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Nunc). La estimulación celular se realizó con anti-CD3 soluble (clon UCHT1, Dako) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. La proliferación celular se determinó en cuentas por minuto (cpm) a las 72 horas de cultivo añadiendo timidina tritiada (1 μCi / por pocillo) durante las últimas 16 horas del cultivo. Transcurrido ese tiempo el cultivo fue recogido en filtros de papel con un recolector de cultivo semiautomático (Skatron) y la radioactividad, medida en cuentas por minuto (cpm), cuantificada en un contador de centelleo β .

Los cultivos de linfocitos T se realizaron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos. El medio de cultivo (RPMI-1640) se preparó de la misma manera que para los cultivos de células mononucleadas. Al igual que en el estudio de proteínas fosforiladas, para una correcta activación a través de CD3 es necesario el entrecruzamiento de los anticuerpos anti-CD3 estimuladores. Dado que en los cultivos de linfocitos T purificados no existían otras estirpes celulares que pudieran realizarlo se incubaron previamente los pocillos de cultivo con 50 μl de anticuerpo de cabra anti-ratón a 20 $\mu\text{g/ml}$ y mantenidos a 4° C durante toda la noche. Tras lavar las placas con agua destilada estéril, se añadieron 10^5 linfocitos T por pocillo (100 μl de una suspensión de 10^6 células/ml. de medio de cultivo) y fueron estimuladas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (clon UCHT1, Dako) o con 0.01 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD28 (clone L293, Becton Dickinson). La dosis óptima de anti-CD3 utilizada para realizar la estimulación fue de 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que al emplear anti-CD28 a 5 $\mu\text{g/ml}$ la dosis de anti-CD3 necesaria para obtener una proliferación óptima fue 100 veces menor (0.01 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos se mantuvieron a 37° C en una atmósfera de CO₂ del 5% durante 48 horas para evaluar la expresión de CD28 y CD40L o 72h para medir la

inducción de CTLA-4/CD152. La proliferación celular se determinó a las 72 horas de cultivo de la misma forma que para las células mononucleadas.

IV. Citometría de flujo

El estudio de marcadores celulares de superficie e intracitoplásmicos en muestras de sangre periférica y de cultivos celulares y la cuantificación de múltiples citocinas (*cytometric bead array*; CBA) se realizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson). Se cuantificaron la intensidad media de fluorescencia (mfi) como unidad arbitraria de medida y/o el porcentaje de células que expresaban el marcador evaluado.

Para la determinación de poblaciones de memoria B se marcaron muestras de sangre periférica con anti-CD19, anti-CD27 (ambos anticuerpos de Becton Dickinson) y anti-IgD (Dako) marcados con proteína clorofila peridina (PerCp), ficoeritrina (PE) y isotiocianato de fluoresceína (FITC) respectivamente. El porcentaje de cada una de las poblaciones B de memoria fue referido al total de células B (CD19+).

La identificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 se realizó mediante tinción con combinaciones de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 (Becton Dickinson) marcados con diferentes fluorocromos (FITC, PE o PerCp). La expresión de CD45RA y CCR7 se evaluó en cada una de las subpoblaciones de CD4 y CD8 mediante tinción de superficie con combinaciones de anticuerpos monoclonales frente a CD45RA y CCR7 marcados con FITC y PE (Becton Dickinson) respectivamente, en muestras de sangre periférica.

La expresión de CD28 y CD40L/CD154 de superficie se realizó con anticuerpos monoclonales conjugados con PE (Becton Dickinson). Para la determinación de CTLA-4/CD152 intracelular las células fueron previamente fijadas y permeabilizadas (Dako IntraStain, Fixation and Permeabilization Kit). A continuación se realizó la tinción con anti-CTLA-4/CD152 (Coulter Immunotech) marcado con PE. Para determinar el umbral de positividad de las tinciones con los diferentes anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos, se utilizaron controles de isotipo tanto de superficie como intracitoplásmicos.

V. Cuantificación de citocinas

La producción de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α) fue evaluada en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T purificados recogidos a las 16 horas del mismo y congelados hasta su posterior análisis. El estudio de IL-2 e IL-10 en sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas de sangre periférica se realizó mediante técnica de ELISA convencional (Coulter, Immunotech). Para la evaluación de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α) en cultivos de linfocitos T se utilizó la técnica de detección de múltiples citocinas (*cytometric bead array*; CBA, Becton Dickinson). Se utilizaron seis esferas unidas a anticuerpos de captura frente a IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α , cada una de ellas de diferente intensidad de fluorescencia detectada en el tercer detector o FL-3 del citómetro de flujo (figura 6). Estas poblaciones se incubaron con 50 μ l de estándares de cada una de las citocinas o de sobrenadante de los cultivos y anticuerpos de detección marcados con PE para formar un complejo de sándwich. Tras 3 horas de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad las muestras fueron lavadas, resuspendidas y analizadas en un citómetro de flujo. La concentración de cada una de las citocinas analizadas

se calculó comparando la intensidad de fluorescencia en PE de cada complejo de sándwich con la curva estándar (figura 7).

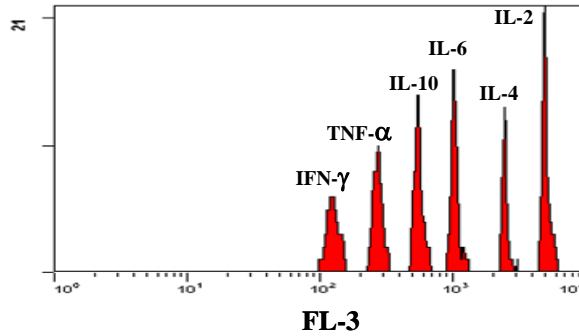


Figura 6. Intensidad de fluorescencia de las poblaciones con anticuerpos de captura para cada una de las citocinas analizadas.

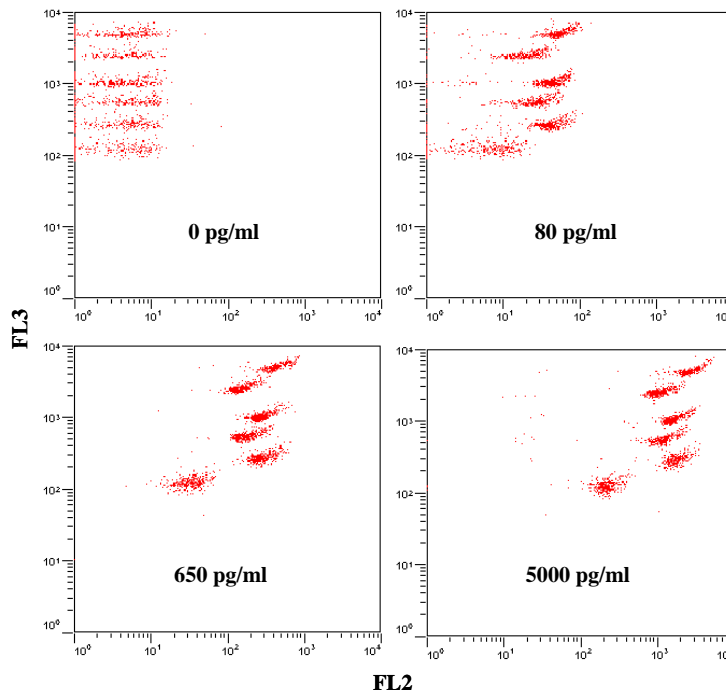


Figura 7. Análisis de la fluorescencia de las poblaciones con anticuerpos de captura (FL3) y la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario marcado con PE (FL2). La figura muestra las diferentes intensidades de fluorescencia para cada una de las 6 citocinas analizadas de cuatro puntos (0, 80, 650 y 5000 pg/ml) de la curva estándar.

VI. Análisis estadístico

Para la comparación de resultados entre pacientes y controles se utilizaron test T no pareados. Los resultados se expresan como $\text{media} \pm \text{error estándar}$ de la media. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para una $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego California, USA).

Resultados

I. Características de los pacientes con IVC

1. Datos demográficos, inmunoglobulinas y poblaciones linfocitarias

Los pacientes con IVC fueron seleccionados atendiendo a criterios diagnósticos del grupo de expertos en IDP de la unión internacional de sociedades inmunológicas (IUIS), es decir, tenían valores bajos de IgG, IgA y/o IgM con ausencia o pobre respuesta en anticuerpos frente a la vacunación y no hubo ninguno menor de 2 años de edad. Aunque todos ellos habían padecido procesos infecciosos de vías respiratorias en algún momento, ninguno de ellos presentó patología infecciosa durante tres meses previos a la realización del estudio. Los pacientes estaban siendo tratados con gammaglobulina endovenosa cada 21 días y la obtención de las muestras de sangre para el estudio se realizó previamente a la infusión. Los controles, al igual que el grupo de pacientes con IVC, fueron individuos adultos y no presentaron patología infecciosa, inflamatoria, ni habían sido tratados con medicación anti-inflamatoria durante tres meses previos a la realización del estudio.

La edad de los pacientes estuvo comprendida entre los 18 y los 84 años con una media de 53 ± 5.4 años. La edad de los individuos control incluidos en el estudio (45 ± 3.7 años) fue menor que la de los pacientes, sin embargo, las diferencias entre los grupos no alcanzaron la significación estadística. La relación de hombres y mujeres fue de 6/8 en el grupo de pacientes con IVC y de 7/7 en el de individuos control.

Los valores de inmunoglobulinas de los pacientes con IVC en el momento del diagnóstico estuvieron disminuidos respecto a los valores de normalidad, circunstancia que caracteriza a los pacientes con IVC y criterio necesario para el diagnóstico de la enfermedad. Los valores de IgG fueron de 393.6 ± 12.6 mg/dl, los valores de IgA 17.9 ± 4.9 mg/dl y los valores de IgM

28.07± 6.00 mg/dl (tabla 5). La media de la población de linfocitos B (CD19⁺) de los pacientes con IVC se encontraba dentro de los límites de la normalidad (6.7±1.3 %). Sin embargo, el 50% de los pacientes presentaron porcentajes por debajo de la normalidad atendiendo a los valores de referencia del laboratorio (6-15 %).

En el momento del diagnóstico, se observó una disminución de la población linfoide total en cuatro de los pacientes. El 50% de los pacientes presentaron linfopenia T, tanto en valores absolutos como en valores porcentuales, principalmente a expensas de la subpoblación CD4⁺ (tabla 5). La presencia de dicha linfopenia CD4 junto al incremento del porcentaje de linfocitos T CD8 explicaría la inversión del cociente CD4/CD8 en algunos pacientes.

Entre las patologías autoinmunitarias que presentaron los pacientes destacan la presencia de anemia hemolítica autoinmune en un paciente y anemia perniciosa en otro. Aunque la existencia de granulomas es característica en pacientes con IVC, no observamos su presencia en ninguno de los pacientes evaluados.

Paciente	IgG	IgA	IgM	Linfocitos (10 ³ /ml)	CD4		CD8		CD19 %
	mg/dl				%	absolutos	%	absolutos	
1	425	10	36	600	48	288	16	96	3
2	450	40	23	1500	54	810	21	315	2
3	310	<6	15	2700	33	891	51	1377	3
4	350	62	23	1700	32	544	31	527	9
5	410	<6	<5	800	54	432	22	176	3
6	352	45	91	1400	37	518	21	294	4
7	444	<6	14	3300	28	924	44	1452	7
8	330	30	19	900	49	441	27	243	8
9	420	<6	36	2300	56	1288	25	575	10
10	416	12	48	2300	43	989	33	759	6
11	385	<6	44	1900	32	608	36	684	14
12	461	<6	<5	2100	23	575	29	725	19
13	356	10	15	4400	42	1848	36	1584	3
14	401	<6	19	900	31	279	31	279	3
Valores normales	500-1500	50-250	50-200	1000-2700	39-51	640-1300	17-31	280-700	6-15

Tabla 5. Valores de inmunoglobulinas, linfocitos totales, linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) y linfocitos B (CD19⁺) de los pacientes incluidos en el estudio en el momento del diagnóstico. En la fila inferior están indicados los valores de normalidad.

2. Linfocitos B

La hipogammaglobulinemia y la ausencia de respuesta específica en anticuerpos son las principales características de los pacientes con IVC, sin embargo, los valores de linfocitos B son variables. Aunque la mitad de los pacientes estudiados presentaron porcentajes de linfocitos B por debajo de los valores de referencia (6-15%) no observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de linfocitos B del grupo de pacientes con IVC ($6.7 \pm 1.3\%$) con los de los individuos control ($9.9 \pm 0.9\%$) (figura 8).

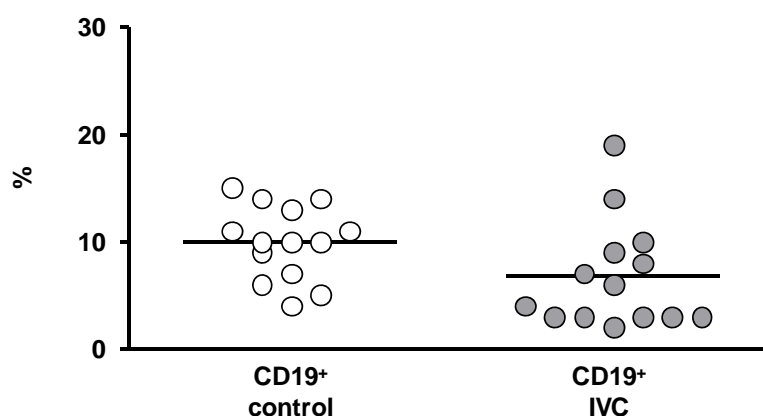


Figura 8. Porcentaje de linfocitos B en muestras de sangre periférica.

Dado que los pacientes con IVC pueden clasificarse según el grado de maduración de sus linfocitos B, estudiamos en pacientes y controles la distribución de las diferentes subpoblaciones naïve y de memoria B. En el grupo de pacientes con IVC se observó un mayor porcentaje de linfocitos B naïve ($CD19^+IgD^+CD27^-$) que en los controles ($87.3 \pm 2.1\%$ vs. $67.8 \pm 3.2\%$ respectivamente; $p < 0.0001$) y un menor porcentaje de linfocitos B de

memoria (CD19⁺CD27⁺) ($6.8 \pm 1.9\%$ vs. $19.8 \pm 2.4\%$ respectivamente; $p < 0.0003$) (figura 9).

Dentro de los linfocitos B de memoria se pueden diferenciar dos subpoblaciones. La primera población (CD19⁺CD27⁺) expresa IgD en la superficie y no ha realizado el cambio de clase de inmunoglobulinas (CD19⁺IgD⁺CD27⁺). La otra subpoblación no expresa IgD en la superficie al haber realizado el cambio de clase de inmunoglobulinas (CD19⁺IgD⁻CD27⁺). Al evaluar estas dos subpoblaciones observamos que, al igual que ocurría con la población de memoria total (CD19⁺CD27⁺), los pacientes con IVC tenían un menor porcentaje de linfocitos B de memoria que no han realizado el cambio de clase de inmunoglobulinas (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) que los controles ($4.7 \pm 1.4\%$ vs. $8.4 \pm 0.9\%$; $p < 0.05$) y un menor porcentaje de población B de memoria que ha realizado el cambio de clase de inmunoglobulinas (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) ($2.1 \pm 0.7\%$ vs. $11.4 \pm 1.8\%$; $p < 0.0001$) (figura 10).

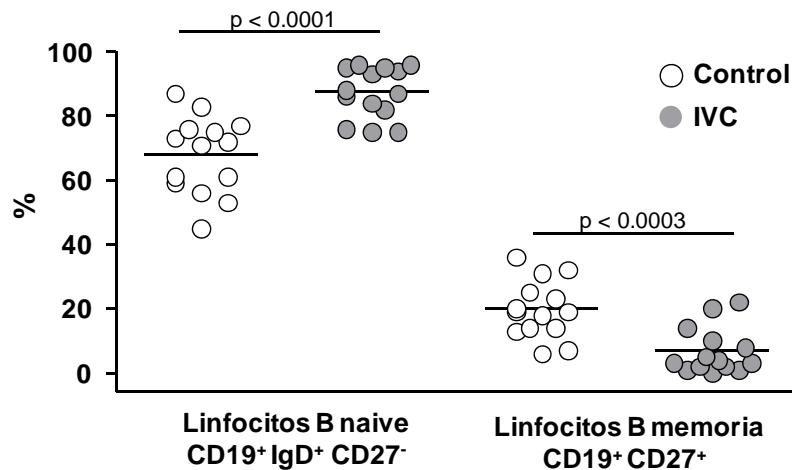


Figura 9. Distribución de linfocitos B naïve (CD19⁺IgD⁺ CD27⁻) y memoria (CD19⁺CD27⁺).

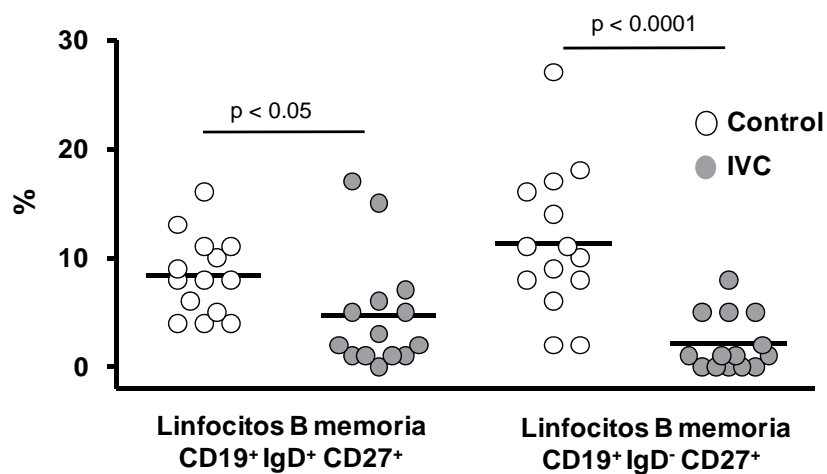


Figura 10. Distribución de linfocitos B de memoria que no han realizado el cambio de clase de inmunoglobulina (CD19+IgD+ CD27+) y que han realizado el cambio de clase de inmunoglobulina (CD19+IgD- CD27+).

3. Linfocitos T

3.1. Linfocitos T CD4

Los porcentajes de linfocitos T CD4 totales fueron similares en pacientes con IVC (44.82 ± 2.5 %) y controles (45.80 ± 1.9 %) (figura 11).

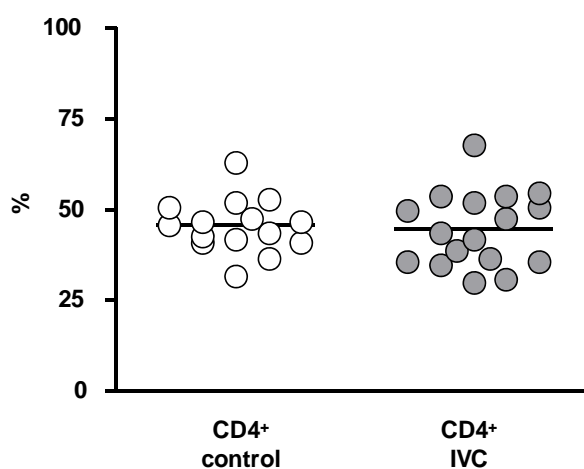


Figura 11. Porcentaje de linfocitos T CD4 respecto de la población T (CD3+).

Al evaluar las células naïve $CD45RA^+CCR7^+$ observamos un menor porcentaje de éstas en el grupo de pacientes con IVC (29.0 ± 3.9 %) que en el grupo control (34.6 ± 4.3 %), sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La distribución de células T de memoria central $CD45RA^-CCR7^+$ en la subpoblación T CD4+ fue similar en pacientes con IVC (30.9 ± 2.0 %) y controles (27.1 ± 1.7 %). De la misma manera no observamos diferencias significativas entre el grupo de pacientes (38.3 ± 4.2 %) y el grupo control (36.0 ± 3.7 %) al evaluar la población de linfocitos T CD4 efectores de memoria $CD45RA^-CCR7^-$. La población de células con fenotipo $CD45RA^+CCR7^-$ es minoritaria en la subpoblación T CD4 como puede observarse al comparar con los porcentajes del resto de subpoblaciones T CD4 de memoria. Finalmente, al comparar esta población

en el grupo de pacientes y el grupo control, tampoco observamos diferencias entre ambos (1.7 ± 0.3 y 2.1 ± 0.3 % respectivamente) (Figura 12).

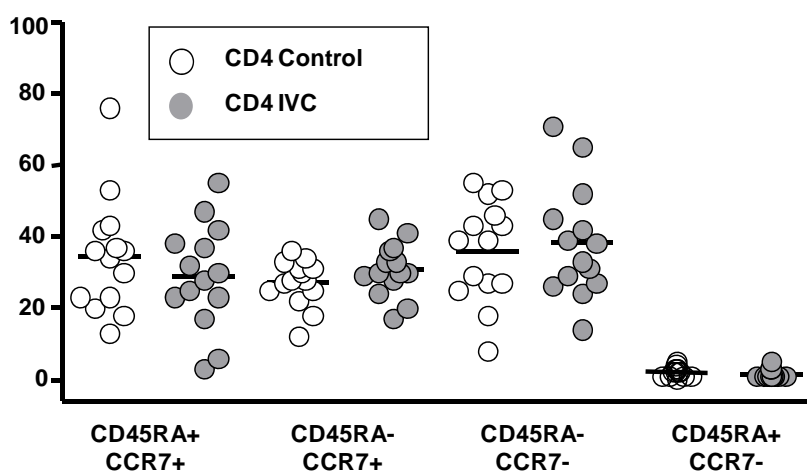


Figura 12. Distribución porcentual de las poblaciones de linfocitos T CD4 naïve ($CD45RA^+CCR7^+$), memoria central ($CD45RA^-CCR7^+$), efectoras de memoria ($CD45RA^-CCR7^-$) y efectoras de memoria RA+ ($CD45RA^+CCR7^-$).

3.2. Linfocitos T CD8

La distribución de los porcentajes de linfocitos T CD8 totales fue, al igual que la de CD4, similar en pacientes con IVC (30.41 ± 3.1 %) y controles (26.53 ± 1.8 %) (figura 13).

La distribución global de las poblaciones de memoria en los linfocitos T CD8 es diferente a la distribución observada en la subpoblación T CD4. En los primeros existe un porcentaje menor de células de memoria central $CD45RA^-CCR7^+$ y un mayor porcentaje de linfocitos T efectoras de memoria que expresan $CD45RA^+$ (figuras 12 y 14).

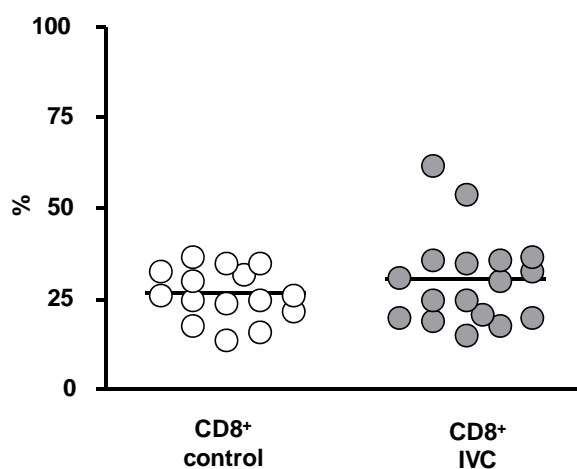


Figura 13. Porcentaje de linfocitos T CD8 respecto de la población T (CD3+).

Al igual que con la subpoblación de células T CD4, observamos un menor porcentaje de linfocitos T CD8 naïve (CD45RA⁺CCR7⁺) en los pacientes con IVC (25.8 ± 4.1 %) que en los controles (32.5 ± 3.9 %), sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles al evaluar las poblaciones T CD8 de memoria central CD45RA⁻CCR7⁺ (5.8 ± 0.8 y 3.9 ± 0.5 % respectivamente) ni CD8 de memoria efectores CD45RA⁻CCR7⁻ (34.6 ± 2.6 y 31.1 ± 3.2 % respectivamente). Finalmente, no observamos diferencias en los porcentajes de linfocitos T CD8 efectores de memoria CD45RA⁺ entre pacientes con IVC y controles (31.7 ± 3.6 y 32.6 ± 2.6 % respectivamente) (figura 14).

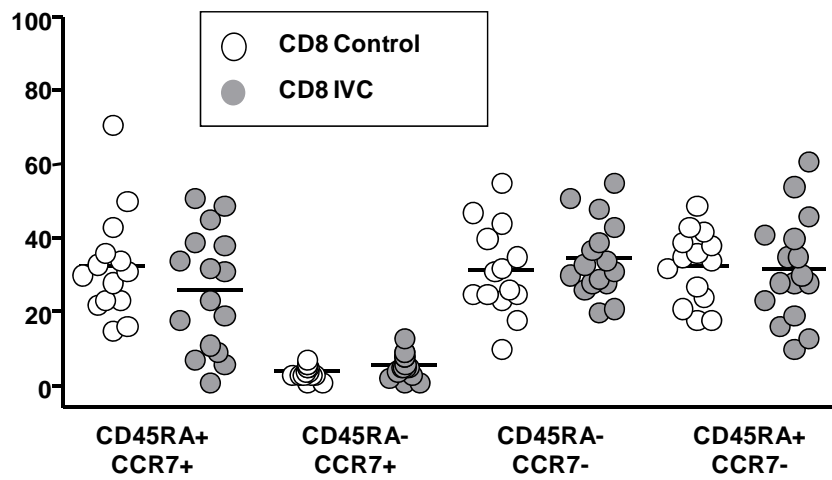


Figura 14. Distribución porcentual de las poblaciones de linfocitos T CD8 naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), memoria central (CD45RA⁻CCR7⁺), efectoras de memoria (CD45RA⁻CCR7⁻) y efectoras de memoria RA⁺ (CD45RA⁺CCR7⁻).

II. Estudios funcionales en células mononucleadas

1. Patrón de fosforilación en tirosina

Con el fin de estudiar las primeras fases de la activación de la célula T se evaluó, en algunos de los pacientes con IVC y controles incluidos en el estudio, el patrón de fosforilación en tirosina tras estimulación con anti-CD3. Los patrones observados fueron similares en los extractos de células mononucleadas de pacientes y de controles. Sin embargo, la intensidad de la señal de los extractos de células mononucleadas de los pacientes fue menor que la de los controles. La figura 15 ilustra un experimento representativo de la fosforilación de proteínas en una muestra de células mononucleadas de un individuo control y un paciente con IVC en situación basal y tras estimular con anti-CD3.

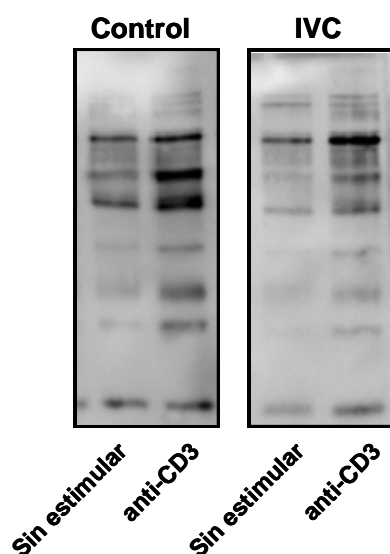


Figura 15. *Western blot* de proteínas fosforiladas en tirosina en situación basal y tras estimulación con anti-CD3 (1 μ g/ml) en células mononucleadas de un individuo control y un paciente con IVC.

2. Proliferación celular

La proliferación de células mononucleadas se evaluó en condiciones basales y tras estimular con anti-CD3 a dosis de 1µg/ml. No observamos diferencias de proliferación en situación basal entre pacientes y controles (222±67 y 208±53 cpm respectivamente). Al estimular con anti-CD3 se observó una menor proliferación por parte de las células mononucleadas de los pacientes (38999±5746 cpm) frente a las de los controles (54123±5227 cpm), sin embargo, las diferencias no alcanzaron la significación estadística (figura 16).

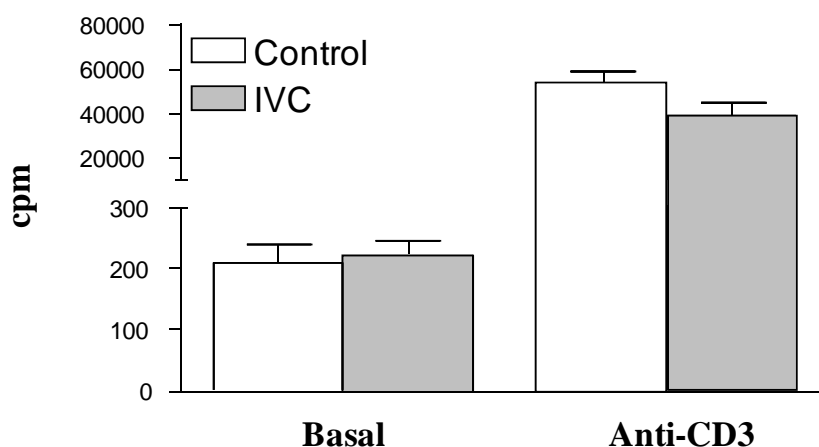


Figura 16. Proliferación de células mononucleadas de sangre periférica medida en cuentas por minuto (cpm) en situación basal y tras estimulación con anti-CD3 (1 µg/ml).

3. Producción de citocinas (IL-2 e IL-10)

Se analizó la producción de IL-2 e IL-10 en sobrenadantes de células mononucleadas de sangre periférica de controles y pacientes en situación basal y tras estimulación durante 16 horas con 1 µg/ml de anti-CD3. En condiciones basales (sin estímulo) no se observaron diferencias en la

secreción de IL-2 entre pacientes y controles (17 ± 4 y 21 ± 6 pg/ml respectivamente). Al evaluar la producción de IL-2 tras estimulación con $1\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 se observó menor producción de IL-2 en el grupo de pacientes (340 ± 60 pg/ml) que en el grupo control (420 ± 91 pg/ml). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 17).

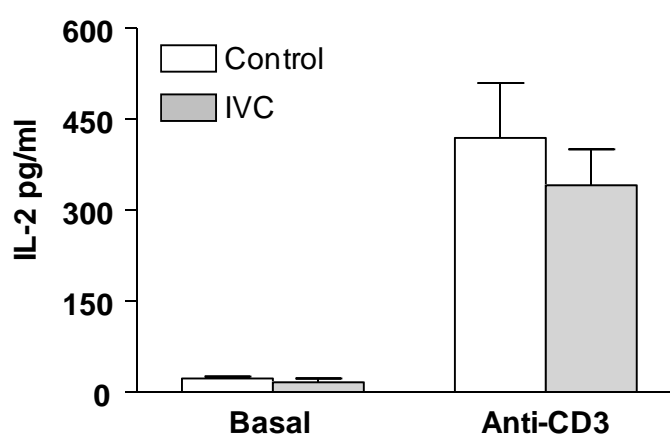


Figura 17. Producción de IL-2 en cultivos de células mononucleadas de sangre periférica sin estimular (basal) y tras estimulación con $1\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3.

Al evaluar la producción de IL-10 tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con IVC y controles en situación basal (9 ± 2 y 17 ± 4 pg/ml respectivamente) ni tras estimulación con $1\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (119 ± 29 y 125 ± 30 pg/ml respectivamente) (figura 18).

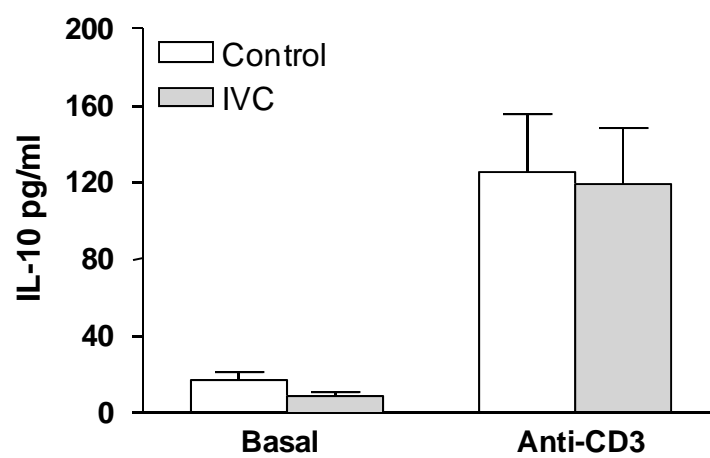


Figura 18. Producción de IL-10 en cultivos de células mononucleadas de sangre periférica sin estimular (basal) y tras estimulación con anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$).

III. Estudios funcionales en linfocitos T

1. Patrón de fosforilación en tirosina

Las proteínas fosforiladas se evaluaron también en linfocitos T purificados de pacientes con IVC y controles. Al igual que en los *western blot* de proteínas fosforiladas de células mononucleadas, no hubo diferencias en los patrones de fosforilación entre ambos grupos. En este caso, la intensidad de la señal fue similar en las proteínas fosforiladas de controles y de pacientes. La figura 19 ilustra un experimento representativo de la fosforilación de proteínas en una muestra de linfocitos T de un individuo control y un paciente con IVC en situación basal y tras estimular con anti-CD3.

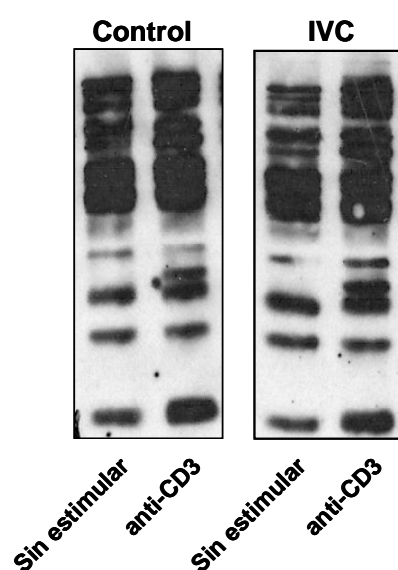


Figura 19. *Western blot* de proteínas fosforiladas en tirosina en situación basal y tras estimulación con anti-CD3 (1 μ g/ml) de linfocitos T purificados de un individuo control y un paciente con IVC.

2. Proliferación celular

En situación basal, la respuesta proliferativa de los linfocitos T de pacientes con IVC y controles fue similar (143 ± 18 y 152 ± 27 cpm, respectivamente) y muy inferior a la obtenida tras estimular con anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28. La respuesta proliferativa de los linfocitos T de pacientes con IVC al estimular con anti-CD3 fue menor que la del grupo control (73133 ± 6671 y 90565 ± 11474 cpm, respectivamente), sin embargo, las diferencias no alcanzaron la significación estadística (figura 20).

La combinación de anti-CD3 y anti-CD28 fue más eficaz que la de anti-CD3 (113051 ± 12890 y 90565 ± 11474 cpm, respectivamente) para inducir proliferación en los linfocitos T de los controles, sin embargo, las diferencias no alcanzaron la significación estadística. A diferencia de los individuos control, en los pacientes la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 fue estadísticamente superior a la de anti-CD3 (106553 ± 8839 y 73133 ± 6671 cpm respectivamente; $p<0.05$) (figura 20).

Al comparar los dos grupos observamos una respuesta proliferativa mayor al estimular con anti-CD3 y anti-CD28 en el grupo control (113051 ± 12890 cpm) que en el de pacientes con IVC (106553 ± 8839 cpm), sin embargo, esta diferencia no alcanzó la significación estadística (figura 20).

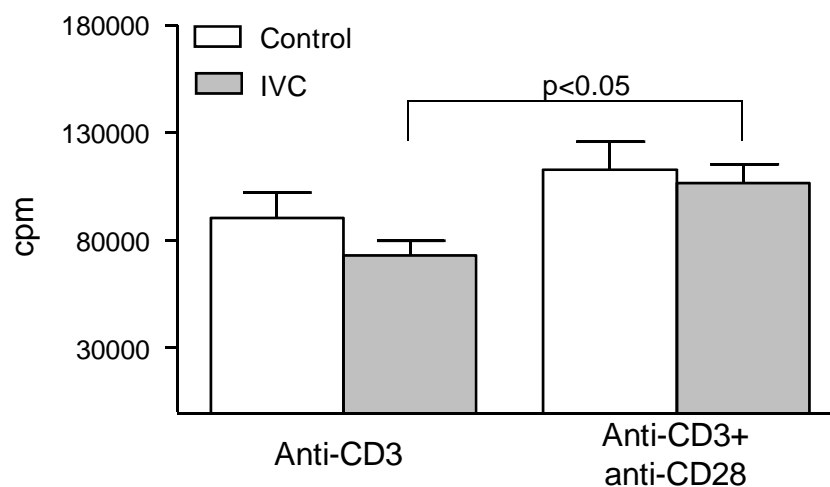


Figura 20. Proliferación de linfocitos T purificados de controles y pacientes con IVC medida en cuentas por minuto (cpm) tras activación con anti-CD3 ($1\mu\text{g/ml}$) ó anti-CD3 ($0.01\mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 ($5\mu\text{g/ml}$).

3. Producción de citocinas

La producción de citocinas por linfocitos T purificados se evaluó con los mismos estímulos utilizados para los estudios de proliferación celular: $1\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 ó $0.01\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 y $5\mu\text{g/ml}$ de anti-CD28.

El patrón de producción de citocinas fue diferente según el estímulo utilizado (figura 21). Al estimular con anti-CD3 y anti-CD28 la producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α fue mayor de manera estadísticamente significativa que tras estimular con anti-CD3 únicamente (6141 ± 919 vs. 63 ± 28 , 6169 ± 1423 vs. 2908 ± 1204 y 1695 ± 455 vs. 99 ± 43 pg/ml respectivamente) en el grupo control. Este patrón de producción de citocinas está conservado en el grupo de pacientes con IVC. Sin embargo, en este caso únicamente detectamos diferencias significativas en la secreción de TNF- α e IL-2 (2199 ± 1025 vs. 192 ± 52 y 5230 ± 1038 vs. 165 ± 41 pg/ml respectivamente) al

comparar ambos estímulos. La diferencia de producción de IFN- γ , aunque menor al estimular con anti-CD3, no fue estadísticamente significativa frente a la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 (5129 \pm 1267 *vs.* 7098 \pm 2298 pg/ml). No observamos diferencias en la producción de IL-4, IL-6 e IL-10 tras estimular con anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28 en el grupo de pacientes con IVC (113 \pm 27 *vs.* 157 \pm 61, 247 \pm 119 *vs.* 347 \pm 116 y 98 \pm 35 *vs.* 57 \pm 18 pg/ml), ni en el grupo de individuos control (36 \pm 10 *vs.* 67 \pm 15, 193 \pm 114 *vs.* 198 \pm 91 y 132 \pm 83 *vs.* 69 \pm 23 pg/ml) (figuras 22 y 23).

Al comparar controles y pacientes con IVC observamos que tras estimular con anti-CD3, los linfocitos T de los pacientes producían mayores cantidades de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-6 que los controles (165 \pm 41 *vs.* 63 \pm 28, 5129 \pm 1267 *vs.* 2908 \pm 1204, 192 \pm 52 *vs.* 99 \pm 43 y 247 \pm 119 *vs.* 193 \pm 114 pg/ml respectivamente), aunque las diferencias sólo alcanzaron la significación estadística para la producción de IL-4 (113 \pm 27 *vs.* 36 \pm 10 pg/ml; $p < 0.05$). La producción de IL-10, fue algo menor en el grupo de IVC (98 \pm 35 pg/ml) que en el grupo control (132 \pm 83 pg/ml) aunque de nuevo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 22).

Al estimular los linfocitos T con anti-CD3 más anti-CD28 no encontramos diferencias entre los grupos de pacientes con IVC y controles para ninguna de las citocinas evaluadas: IL-2 (5230 \pm 1038 *vs.* 6141 \pm 919 pg/ml), IFN- γ (7098 \pm 2298 *vs.* 6169 \pm 1423 pg/ml), TNF- α (2199 \pm 1025 *vs.* 1695 \pm 455 pg/ml), IL-6 (347 \pm 116 *vs.* 198 \pm 91 pg/ml) e IL-10 (57 \pm 18 *vs.* 69 \pm 23 pg/ml). Aunque la producción de IL-4 fue mayor en el grupo de pacientes, la diferencia no fue estadísticamente significativa (157 \pm 61 *vs.* 67 \pm 15 pg/ml) (figura 23).

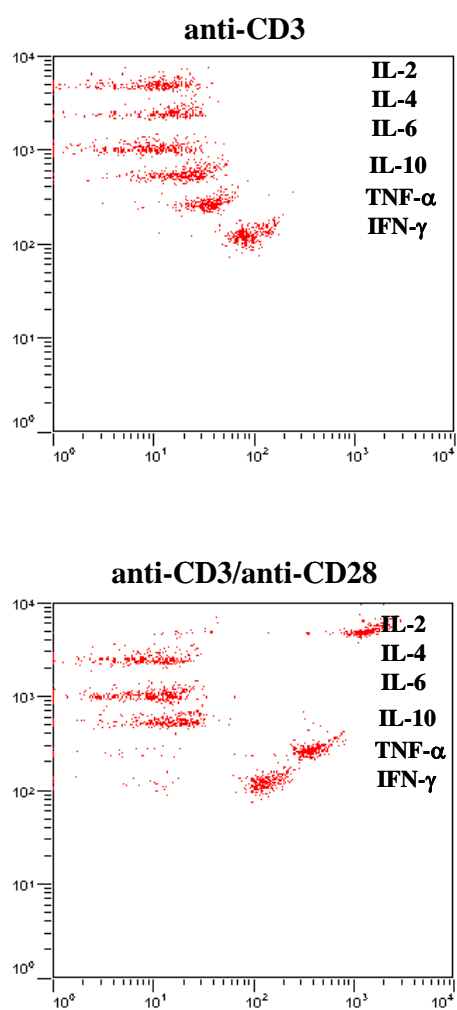


Figura 21. Producción de citocinas mediante CBA en sobrenadantes de cultivo de un individuo control tras estimulación con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (arriba) ó 0.01 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD28 (abajo).

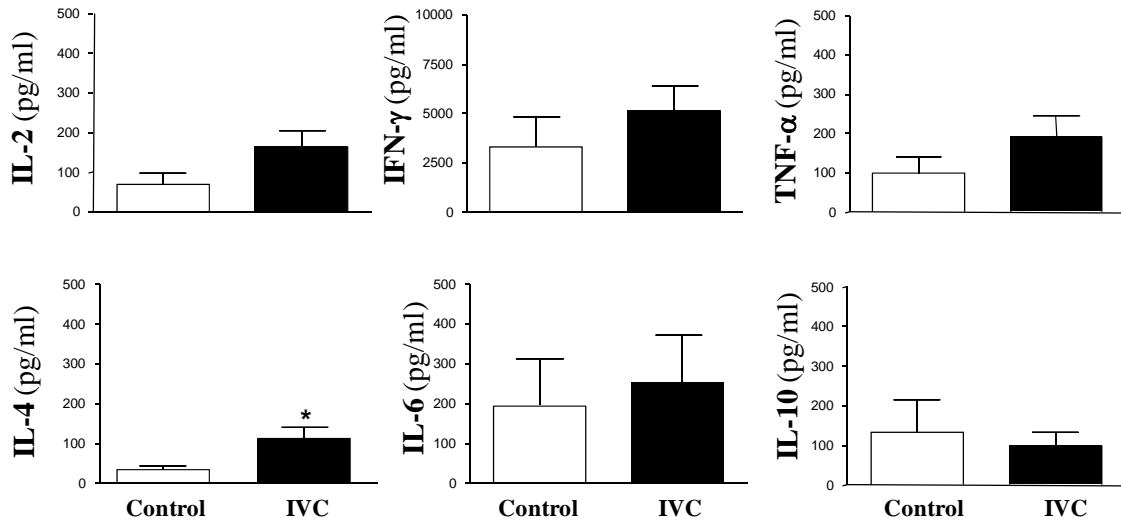


Figura 22. Producción de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 por linfocitos T purificados de pacientes (barras negras) y controles (barras blancas) tras estimulación con 1 μ g/ml de anti-CD3. (* $p < 0.05$).

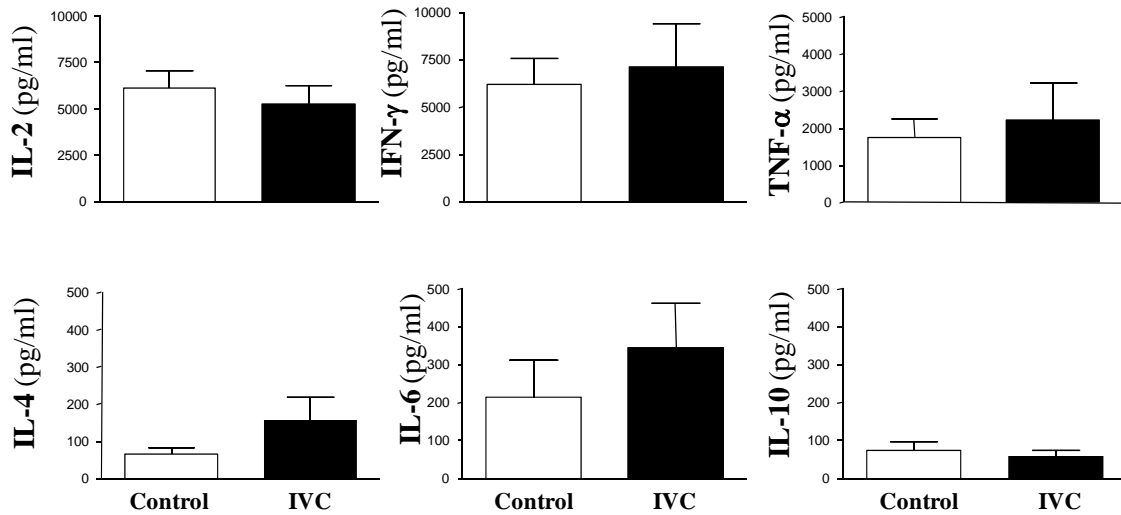


Figura 23. Producción de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 por linfocitos T purificados de pacientes (barras negras) y controles (barras blancas) tras estimular con 0.01 μ g/ml de anti-CD3 y 5 μ g/ml de anti-CD28.

4. Moléculas co-estimuladoras

4.1. Expresión de CD28

La molécula CD28 es necesaria para la co-estimulación o segunda señal de activación del linfocito T. Por ello, evaluamos su expresión basal y post-estimulación en los linfocitos T de pacientes y controles. El pico de expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se produjo a las 48 h de estimulación con 1µg/ml de anti-CD3 (figura 24) y este fue el tiempo elegido para su determinación.

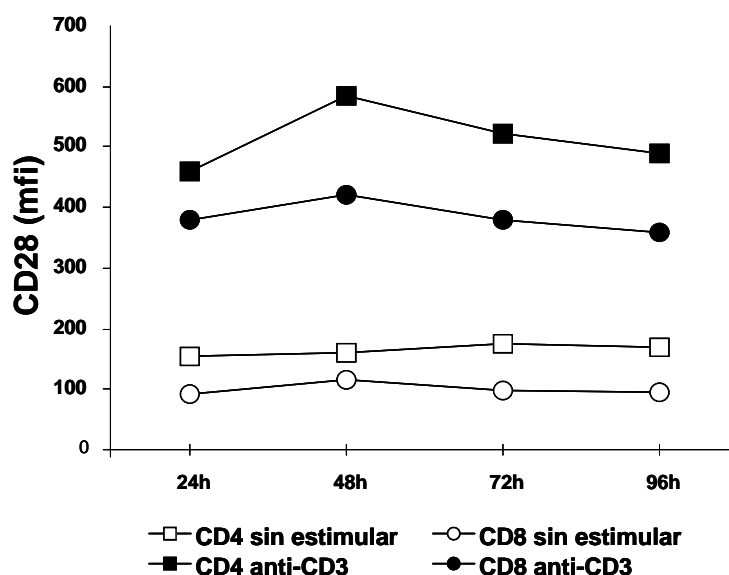


Figura 24. Cinética de expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ sin estimular y tras estimulación con 1 µg/ml de anti-CD3.

La expresión de CD28 a las 48 horas, en la subpoblación T CD4⁺ fue similar en controles y pacientes, tanto sin estimular (137±11 vs. 143±10 mfi) como tras estimulación con anti-CD3 (580±58 vs. 564±54 mfi) (figura 25). Tampoco encontramos diferencias significativas en la expresión de CD28 en

linfocitos T CD8⁺ sin estimular en controles y pacientes (102±11 vs. 94±10 mfi) (figura 26). Finalmente, aunque la expresión de CD28 fue menor en los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes tras estimulación con anti-CD3, las diferencias entre controles y pacientes no fueron estadísticamente significativas (414±43 vs. 368±43 mfi) (figura 26).

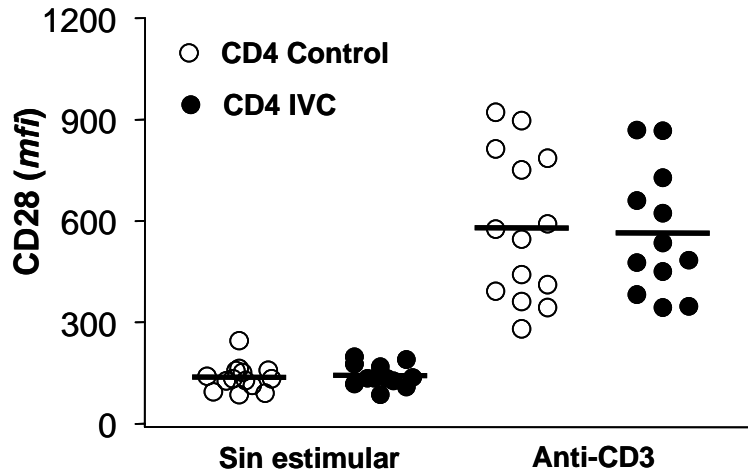


Figura 25. Análisis de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ sin estimular y tras estimulación con 1 µg/ml de anti-CD3.

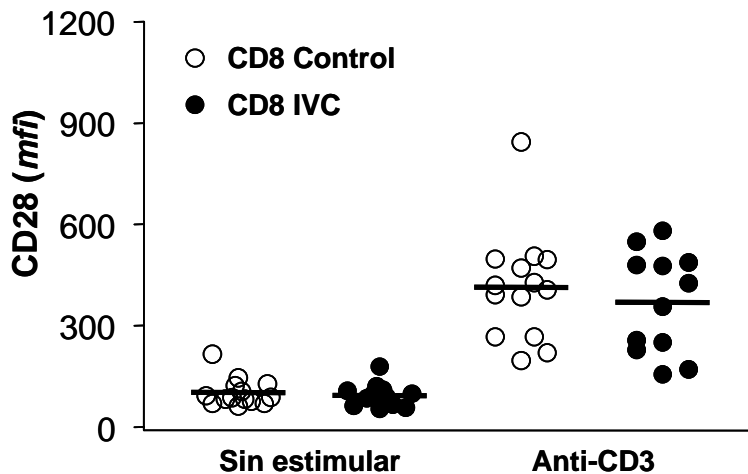


Figura 26. Análisis de la expresión de CD28 en linfocitos T CD8⁺ sin estimular y tras estimulación con 1 µg/ml de anti-CD3.

4.2. Expresión de CD40L / CD154

La molécula CD40L/CD154 se expresa en linfocitos T activados y su expresión es mayor en la subpoblación T CD4⁺ que en la CD8⁺ (figura 27). El nivel máximo de expresión, en ambas subpoblaciones, se produjo a las 48 horas del cultivo y tras estimular con dosis óptimas de anti-CD3 (1 µg/ml) o con anti-CD3 a 0.01 µg/ml más anti-CD28 a 5 µg/ml (figuras 28 y 29). Apenas se observó incremento en la expresión de CD40L/CD154 tras estimular con dosis subóptimas de anti-CD3 (0.01 µg/ml) o anti-CD28 (5 µg/ml) de manera aislada. CD40L/CD154 se evaluó en ambas subpoblaciones linfocitarias de pacientes con IVC y controles tanto en situación basal como tras estimular con anti-CD3 a 1 µg/ml o con anti-CD3 a 0.01 µg/ml más anti-CD28 a 5 µg/ml. La expresión de CD40L/CD154 en la subpoblación CD8⁺ se determinó en la población de linfocitos T CD4⁻ (figura 27).

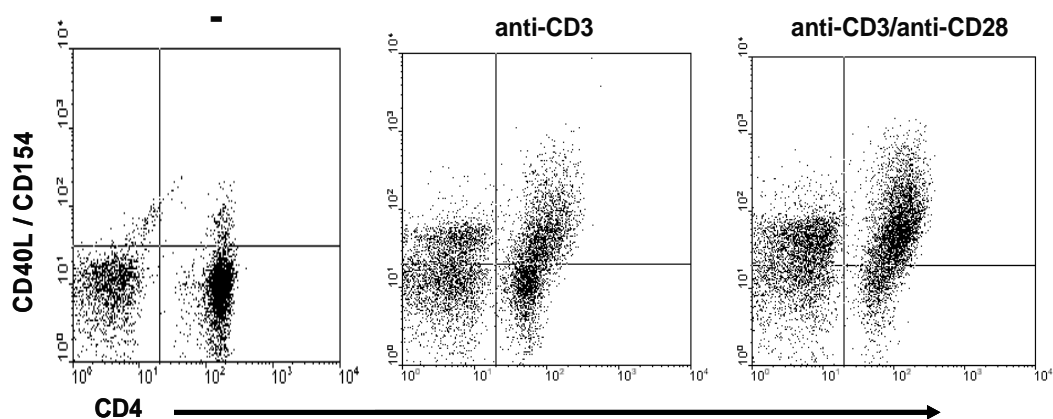


Figura 27. Expresión de CD40L/CD154 en linfocitos T (CD4⁺ y CD4⁻) sin estimular, tras estimulación con anti-CD3 (1 µg/ml) y anti-CD3 (0.01 µg/ml) más anti-CD28 (5 µg/ml).

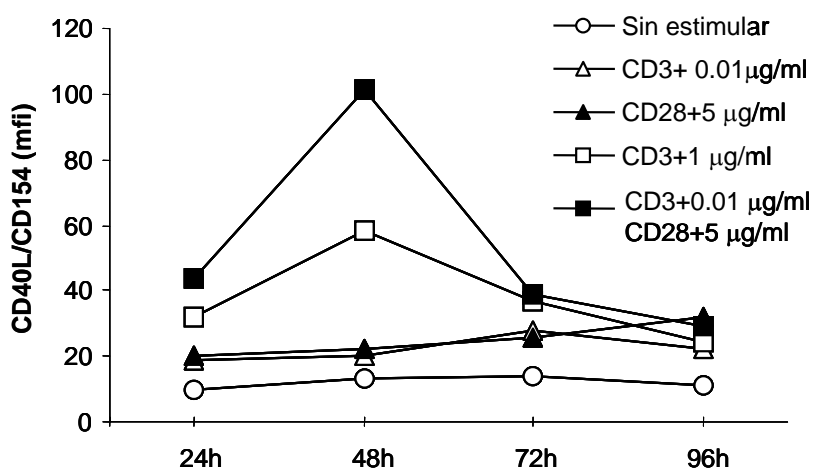


Figura 28. Cinética de expresión de CD40L/CD154 en linfocitos T CD4 con los diferentes estímulos utilizados.

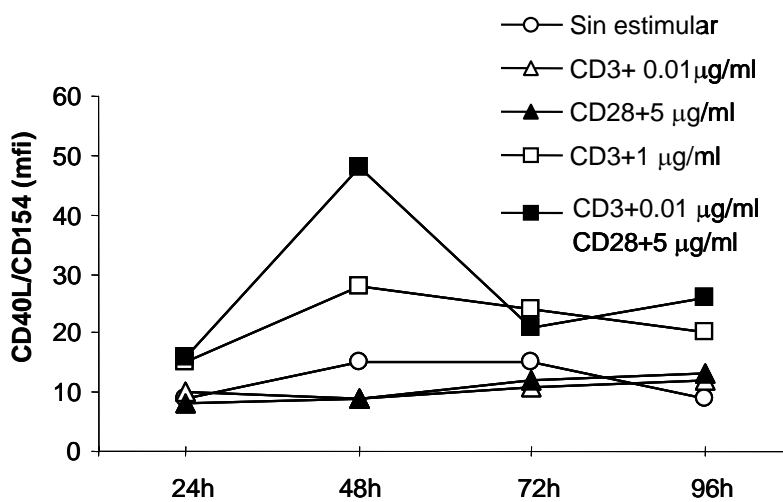


Figura 29. Cinética de expresión de CD40L/CD154 en linfocitos T CD8 con los diferentes estímulos utilizados.

Los linfocitos T CD4⁺ de pacientes con IVC y controles mostraron niveles similares de expresión de CD40L/CD154 tras estimular con anti-CD3 (78 ± 11 vs. 72 ± 6 mfi, respectivamente) o anti-CD3 y anti-CD28 (119 ± 17 vs. 102 ± 8 mfi, respectivamente) (figura 30).

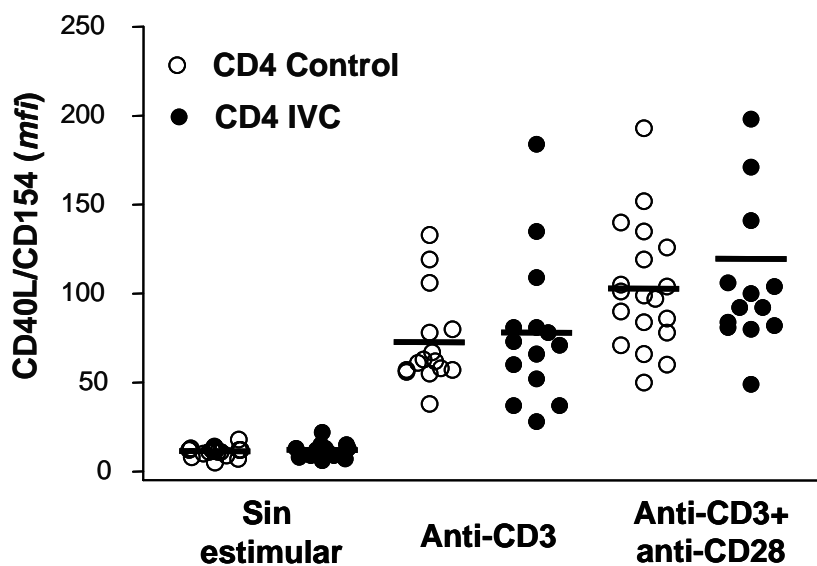


Figura 30. Expresión de CD40L/CD154 en linfocitos T CD4⁺ sin estimular, tras estimulación con anti-CD3 (1 μ g/ml) y con anti-CD3 (0.01 μ g/ml) más anti-CD28 (5 μ g/ml).

La expresión de CD40L/CD154 fue también similar en los linfocitos T CD8 de paciente y controles tras estimular con anti-CD3 (38 ± 5 vs. 33 ± 4 mfi respectivamente) o con anti-CD3 y anti-CD28 (41 ± 5 vs. 38 ± 4 mfi respectivamente) (figura 31).

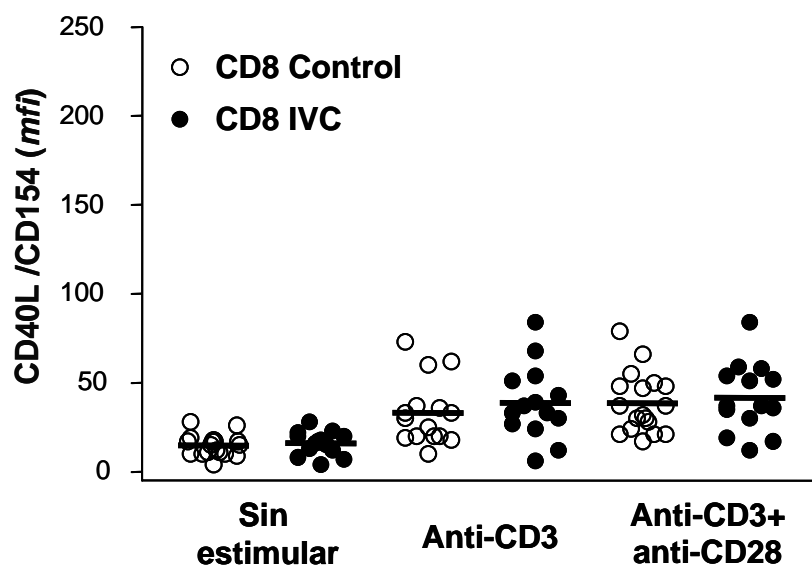


Figura 31. Expresión de CD40L/CD154 en linfocitos T CD8⁺ sin estimular, tras estimulación con anti-CD3 (1 µg/ml) y con anti-CD3 (0.01 µg/ml) más anti-CD28 (5 µg/ml).

4.3 Expresión de CTLA-4 / CD152

La molécula CTLA-4/CD152, al igual que CD40L/CD154, incrementa su expresión en los linfocitos T tras estimulación. Sin embargo, sufre un proceso de endocitosis por lo que su expresión se evaluó en el citoplasma y no en la superficie de los linfocitos T. La expresión de CTLA-4/CD152 en la subpoblación CD8⁺ se determinó en la población de linfocitos T CD4⁻ (figura 32). Al igual que ocurría con la expresión de CD40L/CD154, la expresión de CTLA-4/CD152 fue mayor en la población de linfocitos T CD4⁺ que en la población de linfocitos T CD8⁺ (figura 32).

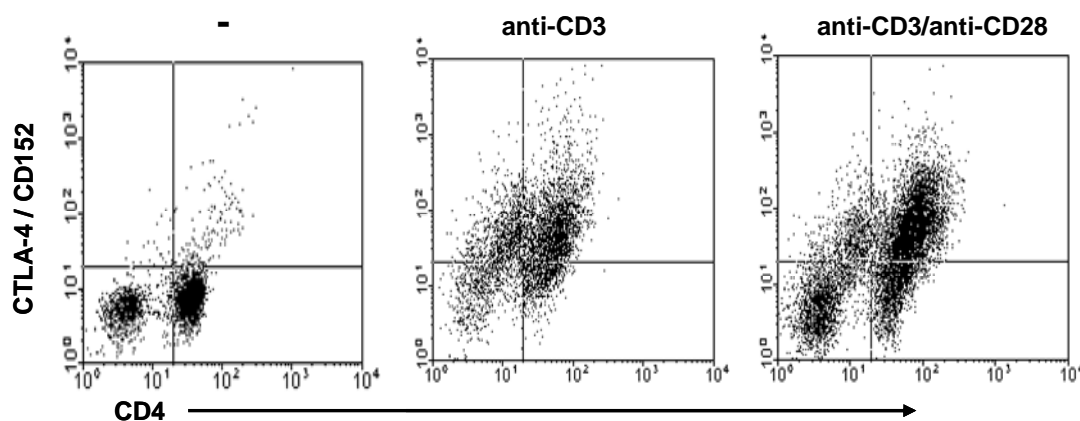


Figura 32. Expresión de CTLA-4/CD152 en cultivos de linfocitos T (CD4⁺ y CD4⁻) sin estimular, tras estimulación con anti-CD3 (1 µg/ml) y anti-CD3 (0.01 µg/ml) más anti-CD28 (5 µg/ml).

A diferencia de CD40L/CD154 cuya expresión fue mayor a las 48h, la de CTLA-4/CD152 fue mayor a las 72 horas del cultivo tras estimular con anti-CD3 (1µg/ml) o con anti-CD3 (0.01µg/ml) y anti-CD28 (5µg/ml) (figuras 33 y 34). Apenas hubo aumento de la expresión en linfocitos no estimulados o tras estimulación con dosis subóptima de anti-CD3 o anti-CD28 aislados.

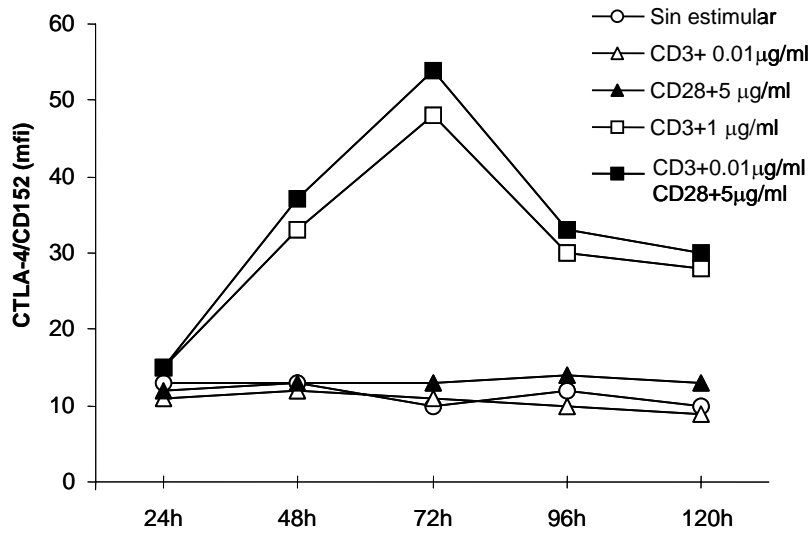


Figura 33. Cinética de expresión de CTLA-4/CD152 intracitoplásmico en linfocitos T CD4 con los diferentes estímulos utilizados.

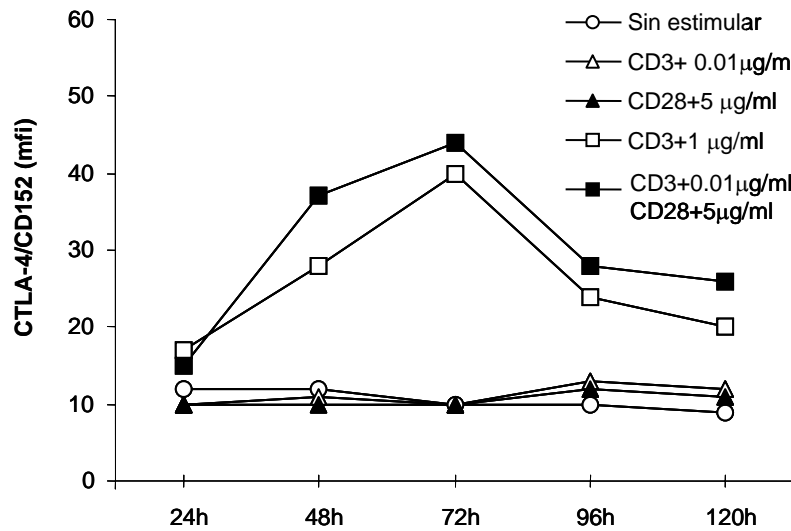


Figura 34. Cinética de expresión de CTLA-4/CD152 intracitoplásmico en linfocitos T CD8 con los diferentes estímulos utilizados.

Los linfocitos T CD4⁺ de pacientes expresaron niveles similares de CTLA-4/CD152 al comparar con los controles tras estimular con anti-CD3 (55 ± 12 vs. 46 ± 7 mfi respectivamente) y tras estimular con anti-CD3 y anti-CD28 (50 ± 5 vs. 49 ± 5 mfi respectivamente) (figura 35).

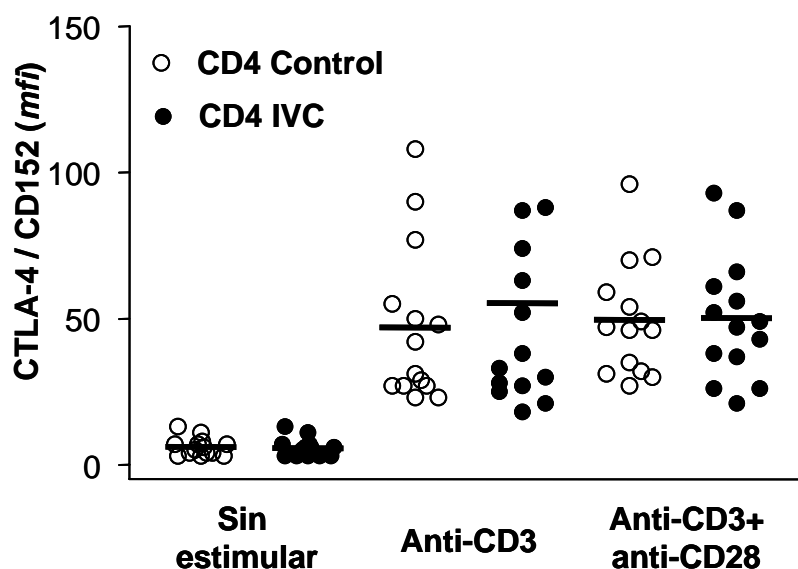


Figura 35. Análisis de la expresión de CTLA-4/CD152 en linfocitos T CD4 sin estimular, estimulados con anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) y con anti-CD3 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) más anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$).

Los linfocitos T CD8⁺ de pacientes y controles expresaron menos CTLA-4/CD152 que los linfocitos T CD4⁺. Al comparar pacientes y controles no observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CTLA-4/CD152 en linfocitos T CD8⁺ tras estimular con anti-CD3 (36 ± 3 mfi vs. 33 ± 3 mfi respectivamente) ni con anti-CD3 y anti-CD28 ($26 \pm$ mfi vs. 23 ± 2 mfi respectivamente) (figura 36).

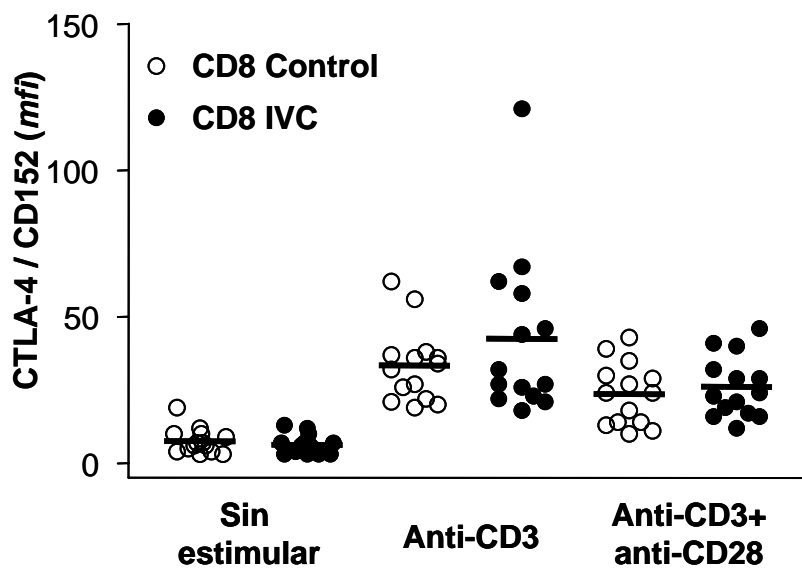


Figura 36. Análisis de la expresión de CTLA-4/CD152 en linfocitos T CD8 sin estimular, estimulados con anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) y con anti-CD3 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) más anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$).

Discusión

La IVC es una inmunodeficiencia primaria predominantemente de anticuerpos caracterizada por una mayor susceptibilidad a padecer procesos infecciosos. Algunos estudios apuntan a alteraciones primarias del linfocito B como origen de la misma, habiéndose observado una disminución de las diferentes poblaciones de linfocitos B de memoria. Existe, sin embargo, controversia respecto al origen de la hipogammaglobulinemia en estos pacientes. En este sentido se han descrito alteraciones en otras poblaciones celulares, como linfocitos T o células presentadoras de antígeno.

En nuestro grupo de pacientes, observamos una disminución de los valores de inmunoglobulinas y, evaluados agrupadamente, un porcentaje normal de la población de linfocitos B. Sin embargo, algunos pacientes presentan linfopenia B lo que indica el elevado grado de heterogeneidad de la enfermedad. Independientemente del grado de linfopenia de los pacientes con IVC evaluados, hemos observado una disminución de los linfocitos B de memoria. Esta disminución ha ocurrido tanto a expensas de los que no han realizado el cambio de clase de inmunoglobulina como de los que sí lo han realizado. Esta circunstancia ha sido también descrita previamente en varios trabajos (74;75).

Alteraciones en la maduración de los linfocitos B causan, probablemente, la hipogammaglobulinemia que caracteriza a los pacientes con IVC. Sin embargo, es difícil discernir si estas alteraciones son intrínsecas del linfocito B o secundarias a una deficiente colaboración con otras estirpes celulares. Algunos datos indirectos, como la coexistencia de patologías autoinmunitarias, alérgicas o neoplasias hematológicas, sugieren la coexistencia de deficiencias de otros componentes del sistema inmunitario. Esta circunstancia implicaría la existencia de alteraciones en células presentadoras de antígeno o linfocitos T en los pacientes con IVC. De esta manera alteraciones en éstas poblaciones celulares podrían originar una

deficiente cooperación y/o activación que inducirían el fallo de la población B de los pacientes.

En la activación, maduración y capacidad de producción de inmunoglobulinas de los linfocitos B, juegan un papel esencial la correcta distribución y activación de la población T. Alteraciones en la distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T inmaduros o naïve y de memoria se han relacionado con deficiencias en la cooperación con el linfocito B. Sin embargo, también se han observado alteraciones en la distribución de estas subpoblaciones de linfocitos T secundarias a procesos infecciosos (50). Este último hecho sugiere que las alteraciones de la población T en pacientes con infecciones y, en concreto, infecciones crónicas y/o de repetición, podrían ser consecuencia y no causa del proceso infeccioso.

Por otro lado, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la capacidad de los linfocitos T para producir citocinas son fundamentales para que las células B sean capaces de madurar y producir inmunoglobulinas. Esto nos llevó a evaluar alteraciones en la distribución, proliferación, expresión de moléculas co-estimuladoras o producción de citocinas de las poblaciones de linfocitos T que pudieran contribuir al deficiente desarrollo y maduración de la población B y la hipogammaglobulinemia que caracteriza a los pacientes con IVC.

Aunque porcentualmente se detectó inversión del cociente CD4/CD8 en algunos de los pacientes, no observamos, de forma global, una disminución del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los pacientes con IVC. Al evaluar la distribución de las poblaciones de linfocitos T observamos una disminución de la población de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ naïve en los pacientes con IVC, sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. En estudios previos, otros autores, también han descrito la disminución de la población de linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ (28) y

de la población de linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (82). Esta disminución podría explicarse por una mayor apoptosis de la población T naïve de estos pacientes (28) o por un incremento del número de linfocitos T activados (83) que, a su vez, podría ser secundaria a la activación linfocitaria existente durante las constantes infecciones que padecen estos pacientes. En este sentido se ha observado una disminución de la población CCR7⁺ en pacientes con IVC e inflamación crónica (84) así como una deficiente capacidad proliferativa en pacientes con predominio de la población CCR7⁺ (85). Sin embargo, de nuestros datos podemos deducir que los pacientes con IVC no presentan alteraciones significativas en la generación de las distintas subpoblaciones T. Como este proceso requiere de una correcta circulación de los linfocitos T por los órganos linfoides secundarios, podemos inferir un correcto acceso de estos linfocitos a los lugares donde se produce la cooperación entre células T y B.

En los estudios funcionales con células mononucleadas de sangre periférica, el patrón de fosforilación tras estimular con anti-CD3, fue más débil en los pacientes estudiados que en los controles. En un estudio realizado en células mononucleadas de pacientes con IVC, Majolini M.B. *et al.* (86) también observaron, en las fases iniciales, una menor capacidad de activación de los linfocitos T de los pacientes. Sin embargo, al evaluar algunos enzimas responsables de la cascada de señalización intracelular como p56lck o Zap-70 observaron que la expresión fue normal. En un estudio posterior se observó un reclutamiento y activación defectuosos de Zap-70 en un grupo de pacientes con IVC aunque no encontraron alteraciones al realizar el estudio genético de dicha enzima (87). Las alteraciones observadas en este trabajo y en los trabajos referidos previamente podrían tener su origen en una activación deficiente de los primeros estadios de la cascada de señalización intracelular de los linfocitos T. Sin embargo, éstas no afectan ni a la respuesta proliferativa ni a la producción de citocinas (IL-2 e IL-10). La menor intensidad del patrón de tirosinas fosforiladas observada en los

pacientes podría explicarse por la linfopenia T de éstos. La disminución relativa de la población T y, a su vez, de su representación en el extracto proteico utilizado en los experimentos explicaría la menor intensidad de las bandas en los pacientes con IVC. Por otro lado, no se puede descartar la existencia de una deficiente colaboración entre linfocitos T y otras poblaciones celulares de linfocitos o monocitos. Esta última circunstancia implicaría una menor actividad o señalización intracelular de los linfocitos T de los pacientes que se traduciría en una menor intensidad en los patrones de fosforilación de tirosinas.

En este trabajo no hemos observado diferencias al evaluar la proliferación y producción de citocinas por parte de las células mononucleadas de los pacientes con IVC. La revisión de estudios previos pone en evidencia resultados contradictorios. Pastorelli G. *et al* observaron que las células mononucleadas de pacientes con IVC proliferaron correctamente al estimularlas con fitohemaglutinina y concavalina A aunque produjeron niveles bajos de IL-2, IL-4 e IFN- γ (88). Por otra parte Fischer M.B. *et al* observaron disminución de la respuesta proliferativa y la producción de IL-2 tras estimulación antigénica, sin embargo, ambas fueron corregidas tras estimular con anti-CD3 (89). Zhou Z. *et al* describieron un aumento en la producción de IL-10 con efectos antiinflamatorios, por los monocitos de los pacientes, que explicaría la deficiente proliferación de celular de la población T (90). Finalmente, Oliva A *et al* no encontraron diferencias en la producción de IL-10 en pacientes y controles tras estimular con anti-CD3 (91). Todas estas controversias en los resultados utilizando cultivos de células mononucleadas de sangre periférica podrían explicarse por los diferentes estímulos aplicados en cada uno de los estudios, por la gran heterogeneidad de los pacientes con IVC o por la influencia de otras poblaciones celulares (linfocitos B, monocitos, células NK) presentes en el cultivo.

Con el fin de evitar la influencia de otras poblaciones celulares y estudiar la población T en las mismas condiciones en el grupo control y en el de pacientes con IVC purificamos linfocitos T, mediante selección negativa, en ambos grupos de individuos. En esta población de linfocitos T purificados estudiamos la fosforilación en residuos de tirosina, la respuesta proliferativa, la expresión de moléculas co-estimuladoras positivas (CD28 y CD40L/CD154) y negativa (CTLA-4/CD152) y la producción de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10. Utilizamos dos estímulos diferentes (dosis óptimas de anti-CD3 o dosis subóptimas de anti-CD3 más anti-CD28). Estudios previos en IVC han mostrado alteraciones de las subpoblaciones de linfocitos T (92;93), disminución de la proliferación y de la producción de citocinas debido a defectos intrínsecos en la maquinaria de señalización a través del TCR (94) y menor capacidad de inducir la expresión de CD40L/CD154 (31-33). Sin embargo, en estos estudios no se evaluó el efecto de la co-estimulación o doble señalización utilizando anti-CD3 y anti-CD28. Por otro lado, hasta el momento de la realización del estudio no se había evaluado la inducción de CTLA-4/CD152 en pacientes con IVC.

A diferencia de las células mononucleadas de sangre periférica, los linfocitos T de los pacientes con IVC, mostraron un patrón similar al de los controles tanto en intensidad como en la distribución de las bandas al ser estimulados con anti-CD3. Estos datos apuntan a que los linfocitos T de los pacientes son capaces, al ser estimulados a través del TCR, de fosforilar las tirosinas de las enzimas iniciales de la cascada de señalización intracelular. Además, la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los pacientes con IVC fue similar a la de los controles con los dos estímulos empleados (anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28). A diferencia de este trabajo, se ha observado una deficiente respuesta proliferativa frente a mitógenos o antígenos en pacientes con IVC y granulomas (8). Dado que se ha asociado una respuesta proliferativa disminuida con la presencia de granulomas, la respuesta

proliferativa normal de nuestros pacientes podría explicarse por la ausencia de enfermedad granulomatosa.

La expresión basal y la regulación positiva de la molécula co-estimuladora CD28 fueron también similares en ambos grupos, lo que implica que la cantidad de moléculas de CD28 disponibles en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ durante el cultivo fue similar. Estos resultados dan validez al uso de la segunda señal co-estimuladora utilizada en los experimentos en los que se ha estimulado con dosis subóptimas de anti-CD3 y anti-CD28. En estudios previos, la estimulación a través de CD28 produjo un incremento de la proliferación inducida mediante anti-CD3 o anti-TCR, sin embargo, no fue capaz de corregir la respuesta disminuida frente a antígenos (94); la estimulación con anti-CD28 también incrementó la síntesis de DNA, aunque no la producción de IL-2 ni la viabilidad de células T irradiadas lo que sugiere que la señalización a través de CD28 no está completamente abolida (60).

La molécula CD40L/CD154 juega un papel importante en la respuesta inmunitaria humoral. Su interacción con CD40 en la superficie de linfocitos B es necesaria para el cambio de clase de inmunoglobulinas. Los pacientes con síndrome de hiper-IgM tipo 1 (HIGM1) tienen mutaciones en el gen que codifica para CD40L/CD154, lo que origina que la proteína esté ausente o no sea funcional (95). Estudios previos mostraron que pacientes con IVC tenían niveles disminuidos de CD40L/CD154. Estos estudios, sin embargo, fueron realizados en células mononucleadas de sangre periférica y no en linfocitos T purificados de forma que no pudieron excluirse efectos inhibidores por parte de otras células mononucleadas de sangre periférica presentes en el cultivo (31;91). Oliva A. *et al* observaron una expresión normal de CD40L/CD154 en la mayoría de pacientes aunque detectaron un posible defecto funcional al inducir su expresión (91). Otros estudios han evaluado la presencia de CD40L/CD154 en linfocitos T purificados, sin embargo estos estudios

utilizaron otros estímulos (33) o los experimentos fueron realizados en líneas de linfocitos T transformadas con Herpesvirus Saimiri (32). De nuevo, las diferencias entre los distintos estudios pueden ser debidas al procedimiento experimental llevado a cabo en cada uno de ellos. En el presente estudio, al estimular con anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28, linfocitos T purificados de pacientes con IVC expresaron los mismos niveles de CD40L/CD154 que los controles. Algunas evidencias indirectas sugieren que la señalización a través de CD40/CD154 está conservada en pacientes con IVC: a pesar de que un fenotipo similar al síndrome de hiper-IgM ocurre en pacientes con IVC, las infecciones oportunistas que caracterizan a los síndromes de hiper-IgM causados por mutaciones en CD40L/CD154 (HIGM1) o CD40 (HIGM3) no afectan a los pacientes con IVC (61). Además el eje CD40L/CD40 es esencial para la óptima producción de IL-12 y estudios realizados en pacientes con IVC apuntan a un incremento en la producción de IL-12. Tanto la concentración de IL-12 en suero, no asociada a polimorfismos en el gen que codifica para la misma, como el porcentaje de monocitos productores de IL-12 están incrementados en los pacientes con IVC (45; 96).

La molécula CTLA-4/CD152 es una molécula co-estimuladora negativa que compete con CD28 para unirse a CD80 y CD86 presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno y células B, disminuyendo la señalización positiva o de activación de la célula. El bloqueo de la activación a través de CD28 es suficiente para inducir anergia (97) y, en ausencia de IL-2, las células anérgicas sufrirán apoptosis (98). Además, la señalización a través de CTLA-4/CD152 en células previamente activadas origina apoptosis de estos linfocitos T específicos de antígeno (99). Se ha descrito un incremento de la apoptosis espontánea y tras estimulación en linfocitos T de pacientes con IVC que correlaciona con la linfopenia presente en ellos. Aunque existe un aumento en la expresión de CD95 en las células T de los pacientes, trabajos intentando inducir apoptosis mediada por CD95 fueron infructuosos (28), lo que sugiere que puedan existir otros mecanismos

responsables, como por ejemplo la apoptosis mediada por receptores del TNF. Se ha propuesto que el incremento en la expresión de RNA mensajero de TNFR1 y TNFR2 en linfocitos T CD4⁺ de pacientes con IVC pudiera ser otro de los mecanismos responsables del incremento de la apoptosis de estos pacientes (100). Nuestros datos apoyan el hecho de que la apoptosis observada en pacientes con IVC no es debida a un incremento de la expresión de CTLA-4/CD152, ya que esta fue comparable a la de los controles con cualquiera de los estímulos utilizados.

Las señales coestimuladoras son fundamentales para la correcta activación del linfocito T. Sin embargo, se necesita también la señalización a través de mediadores solubles como las citocinas. Diversos estudios habían abordado la producción de citocinas en pacientes con IVC de forma parcial y no en poblaciones de linfocitos T purificados (30;32;101). Por ello, evaluamos también la producción de citocinas en cultivos de linfocitos T purificados utilizando los dos estímulos comentados previamente. Los pacientes con IVC presentan una tendencia a producir mayores cantidades de citocinas, en especial IL-4, tras estimular con anti-CD3. Ello sugiere que los linfocitos T de los pacientes podrían estar activados. Sin embargo, las diferencias existentes se normalizan al estimular con un co-estímulo o segunda señal.

Si consideramos la función efectora de las moléculas co-estimuladoras, estos resultados muestran que las vías de estimulación a través de TCR/CD3 y CD28 son funcionales en los linfocitos T de nuestro grupo de pacientes. En el transcurso de la respuesta inmunitaria existe un equilibrio entre señales activadoras o amplificadoras y señales inactivadoras o negativas que tienden a inhibir la respuesta inmunitaria. Las moléculas co-estimuladoras CD28 y CD40L/CD154 se inducen de manera óptima en los linfocitos T de los pacientes evaluados y no explicarían la ausencia de cooperación de éstos con los linfocitos B y células presentadoras de antígeno de los mismos. La inducción de CTLA-4/CD152 en el grupo de pacientes estudiado es similar a

la de los controles evaluados. Esto excluye la posibilidad de que un posible incremento en la expresión de CTLA-4/CD152 pudiera explicar la baja proliferación de los linfocitos T de los pacientes así como el incremento de la apoptosis de estas células limitando su disponibilidad en la cooperación con otras estirpes celulares en pacientes con IVC.

Aunque no encontramos alteraciones en la expresión e inducción de moléculas co-estimuladoras clásicas en linfocitos T de pacientes con IVC, no podemos descartar alteraciones en otras moléculas co-estimuladoras. De hecho, mutaciones en ICOS se han descrito en un pequeño número de pacientes con IVC (34). Otra posibilidad es que los co-receptores para estas moléculas co-estimuladoras no se expresen o induzcan correctamente en linfocitos B de los pacientes. En este sentido se han descrito alteraciones en los co-receptores CD70 y CD86 en linfocitos B de pacientes con IVC (102;103).

Los presentes resultados sugieren que, en un modelo experimental en el que se han utilizado células purificadas, los linfocitos T de pacientes con IVC son capaces de regular de manera eficiente moléculas co-estimuladoras (CD28, CD40L/CD154 y CTLA-4/CD152) y de producir niveles normales de interleucinas (IL-2, IFN- γ y TNF- α , IL4, IL-6 e IL-10). Los defectos observados en las células T de estos pacientes podrían ser secundarios a alteraciones en los mediadores solubles producidos por otras poblaciones tales como células presentadoras de antígeno y/o linfocitos B. Finalmente, la maduración anómala observada en la población B de los pacientes y la producción reducida de inmunoglobulinas no pueden explicarse por una deficiente funcionalidad de los aspectos del linfocito T evaluados en este estudio.

Conclusiones

1. El porcentaje de linfocitos B en los pacientes con inmunodeficiencia variable común (IVC) estudiados fue similar al del grupo control. Sin embargo, los porcentajes de las poblaciones de linfocitos B de memoria de los pacientes fueron menores que los del grupo control.
2. Los porcentajes de linfocitos T CD4 y T CD8 totales y las subpoblaciones naïve y memoria de los pacientes con IVC fueron similares a los del grupo control.
3. La intensidad de fosforilación en residuos de tirosina de proteínas intracitoplásmicas de células mononucleadas de sangre periférica, fue menor en los pacientes con IVC que en los individuos control.
4. No observamos diferencias, entre pacientes con IVC y controles, en la proliferación celular y producción de IL2 e IL10 al estimular con anti-CD3 células mononucleadas de sangre periférica.
5. La intensidad de fosforilación en residuos de tirosina de proteínas intracitoplásmicas de los linfocitos T de pacientes con IVC fue similar a la de individuos control.
6. Los linfocitos T aislados de pacientes y controles proliferaron de forma similar al ser estimulados a través del TCR (anti-CD3) y añadiendo a esta activación un co-estímulo (anti-CD28).
7. Al estimular con anti-CD3, los linfocitos T de los pacientes con IVC produjeron más IL-4 que los de los controles. Sin embargo, no observamos diferencias en la producción de IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α . No observamos diferencias en la producción de ninguna de las citocinas evaluadas al estimular con anti-CD3 y anti-CD28.

8. La expresión de CD28, CD40L/CD154 y CTLA-4/CD152 en situación basal y tras estimulación con anti-CD3 fue similar en pacientes con IVC y controles.

9. La expresión de CD40L/CD154 y CTLA-4/CD152 tras estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 fue similar en pacientes con IVC y controles.

10. Ni la maduración deficiente, ni la reducida producción de inmunoglobulinas por la población B de los pacientes con IVC pueden explicarse por alteraciones de los aspectos del linfocito T evaluados en este estudio

Bibliografía

- (1) Fudenberg HH, Good RA, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, Rosen FS et al. Classification of the primary immune deficiencies: WHO recommendation. *N Engl J Med* 1970; 283(12):656-657.
- (2) Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM et al. Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee. *Pediatrics* 1971; 47(5):927-946.
- (3) Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R et al. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(3):677-687.
- (4) Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(6):1161-1178.
- (5) Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science* 2007; 317(5838):617-619.
- (6) Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(4):776-794.
- (7) Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001; 1(5):421-429.
- (8) Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med* 1997; 127(8 Pt 1):613-617.

- (9) Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(2):415-421.
- (10) Matamoros N, Mila J, Pons J. [Primary immunodeficiencies in Spain. Data of the Spanish Registry of Primary Immunodeficiencies. REDIP 1980-1999 (Registro Espanol de Immunodeficiencias Primarias)]. *Med Clin (Barc)* 2000; 114(3):96-100.
- (11) Schroeder HW, Jr., Schroeder HW, III, Sheikh SM. The complex genetics of common variable immunodeficiency. *J Investig Med* 2004; 52(2):90-103.
- (12) Tarzi MD, Grigoriadou S, Carr SB, Kuitert LM, Longhurst HJ. Clinical immunology review series: An approach to the management of pulmonary disease in primary antibody deficiency. *Clin Exp Immunol* 2009; 155(2):147-155.
- (13) Seymour B, Miles J, Haeney M. Primary antibody deficiency and diagnostic delay. *J Clin Pathol* 2005; 58(5):546-547.
- (14) Henry RL, Mellis CM, Petrovic L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1992; 12(3):158-161.
- (15) Webster D, Windsor H, Ling C, Windsor D, Pitcher D. Chronic bronchitis in immunocompromised patients: association with a novel *Mycoplasma* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(9):530-534.
- (16) Herbst EW, Armbruster M, Rump JA, Buscher HP, Peter HH. Intestinal B cell defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994; 95(2):215-221.

- (17) Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999; 92(1):34-48.
- (18) Halliday E, Winkelstein J, Webster AD. Enteroviral infections in primary immunodeficiency (PID): a survey of morbidity and mortality. *J Infect* 2003; 46(1):1-8.
- (19) Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol* 2009; 145(6):709-727.
- (20) Bussone G, Mouthon L. Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmun Rev* 2009; 8(4):332-336.
- (21) Michel M, Chanet V, Galicier L, Ruivard M, Levy Y, Hermine O et al. Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83(4):254-263.
- (22) Horn J, Thon V, Bartonkova D, Salzer U, Warnatz K, Schlesier M et al. Anti-IgA antibodies in common variable immunodeficiency (CVID): diagnostic workup and therapeutic strategy. *Clin Immunol* 2007; 122(2):156-162.
- (23) Park JH, Levinson AI. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* 2010; 134(2):97-103.
- (24) Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5(5):370-375.

- (25) Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF et al. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet* 1985; 1(8423):263-266.
- (26) Mellekjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* 2002; 130(3):495-500.
- (27) Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:199-227.
- (28) 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(1):138-146.
- (29) North ME, Webster AD, Farrant J. Defects in proliferative responses of T cells from patients with common variable immunodeficiency on direct activation of protein kinase C. *Clin Exp Immunol* 1991; 85(2):198-201.
- (30) 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; 102(2):286-289.
- (31) Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(3):1099-1103.
- (32) Cabanillas JA, Cambronero R, Pacheco-Castro A, Garcia-Rodriguez MC, Martin-Fernandez JM, Fontan G et al. Characterization of Herpesvirus

saimiri-transformed T lymphocytes from common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol* 2002; 127(2):366-373.

(33) Brugnani D, Airo P, Lebovitz M, Malacarne F, Ugazio AG, Notarangelo LD et al. 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; 7(4):176-179.

(34) Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003; 4(3):261-268.

(35) Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005; 37(8):820-828.

(36) Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 2005; 37(8):829-834.

(37) van Zelm MC, Reisli I, van der BM, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006; 354(18):1901-1912.

(38) Losi CG, Silini A, Fiorini C, Soresina A, Meini A, Ferrari S et al. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2005; 25(5):496-502.

(39) Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarstrom Q, Graham RR, Ziemba B, de Vries SS et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(17):7193-7198.

- (40) Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 2010; 120(1):214-222.
- (41) van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* 2010; 120(4):1265-1274.
- (42) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-376.
- (43) Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood* 2004; 104(8):2441-2443.
- (44) Scott-Taylor TH, Green MR, Eren E, Webster AD. Monocyte derived dendritic cell responses in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(3):484-490.
- (45) Martinez-Pomar N, Raga S, Ferrer J, Pons J, Munoz-Saa I, Julia MR et al. Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon-gamma gene. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(2):233-238.
- (46) Guy CS, Vignali DA. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol Rev* 2009; 232(1):7-21.
- (47) Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(6):472-484.
- (48) Liu JO. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol Rev* 2009; 228(1):184-198.

- (49) Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-763.
- (50) Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003; 4(9):835-842.
- (51) Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:233-258.
- (52) Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH, Thompson CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J Immunol* 1990; 144(5):1646-1653.
- (53) Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, Fields LE, Loh DY. Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J Immunol* 1995; 154(11):5757-5768.
- (54) Green JM, Noel PJ, Sperling AI, Walunas TL, Gray GS, Bluestone JA et al. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1994; 1(6):501-508.
- (55) Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995; 3(1):87-98.
- (56) McArthur JG, Raulat DH. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. *J Exp Med* 1993; 178(5):1645-1653.
- (57) Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG et al. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(4):1333-1337.

- (58) Fischer MB, Wolf HM, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Sasgary M et al. 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; 26(1):231-237.
- (59) North ME, Akbar AN, Borthwick N, Sagawa K, Funachi M, Webster AD et al. Co-stimulation with anti-CD28 (Kolt-2) enhances DNA synthesis by defective T cells in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994; 95(2):204-208.
- (60) Di Renzo M, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced apoptosis of T cells in common variable immunodeficiency (CVID): role of defective CD28 co-stimulation. *Clin Exp Immunol* 2000; 120(3):503-511.
- (61) Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:111-135.
- (62) Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; 229(1):152-172.
- (63) Ravanbakhsh M, Sarafnejad A, Aghamohammadi A, Kardar GA, Asgarian OH, Atarod L et al. CD40 Ligand Expression on Stimulated T-Helper Lymphocytes in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2007; 6(3):129-135.
- (64) Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(3):220-228.
- (65) Knight AK, Serrano D, Tomer Y, Cunningham-Rundles C. CTLA-4 gene exon-1 +49 A/G polymorphism: lack of association with autoimmune disease in patients with common variable immune deficiency. *J Clin Immunol* 2007; 27(1):95-100.

- (66) Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:515-548.
- (67) LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112(5):1570-1580.
- (68) Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 2005; 201(1):35-39.
- (69) Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3(9):822-829.
- (70) Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; 256(5053):105-107.
- (71) Maecker HT, Levy S. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med* 1997; 185(8):1505-1510.
- (72) Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol* 2004; 16(1):119-129.
- (73) 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; 56(2):239-248.
- (74) Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; 99(5):1544-1551.

- (75) Piqueras B, Lavenu-Bombléd C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003; 23(5):385-400.
- (76) Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A et al. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(2):412-417.
- (77) Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003; 101(11):4500-4504.
- (78) Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 2006; 36(4):810-816.
- (79) Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(5):1178-1185.
- (80) Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999; 93(3):190-197.
- (81) Gardulf A, Nicolay U, Math D, Asensio O, Bernatowska E, Bock A et al. Children and adults with primary antibody deficiencies gain quality of life

by subcutaneous IgG self-infusions at home. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4):936-942.

(82) Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Carbone J. Immunophenotypic profile of T cells in common variable immunodeficiency: is there an association with different clinical findings? *Allergol Immunopathol (Madr)* 2009; 37(1):14-20.

(83) Viillard JF, Blanco P, Andre M, Etienne G, Liferman F, Neau D et al. CD8+HLA-DR+ T lymphocytes are increased in common variable immunodeficiency patients with impaired memory B-cell differentiation. *Clin Immunol* 2006; 119(1):51-58.

(84) Fevang B, Yndestad A, Damas JK, Bjerkeli V, Ueland T, Holm AM et al. Chemokines and common variable immunodeficiency; possible contribution of the fractalkine system (CX3CL1/CX3CR1) to chronic inflammation. *Clin Immunol* 2009; 130(2):151-161.

(85) Holm AM, Sivertsen EA, Tunheim SH, Haug T, Bjerkeli V, Yndestad A et al. Gene expression analysis of peripheral T cells in a subgroup of common variable immunodeficiency shows predominance of CCR7(-) effector-memory T cells. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(2):278-289.

(86) Majolini MB, D'Elios MM, Boncristiano M, Galieni P, Del Prete G, Telford JL et al. Uncoupling of T-cell antigen receptor and downstream protein tyrosine kinases in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84(1):98-102.

(87) Boncristiano M, Majolini MB, D'Elios MM, Pacini S, Valensin S, Ulivieri C et al. Defective recruitment and activation of ZAP-70 in common variable immunodeficiency patients with T cell defects. *Eur J Immunol* 2000; 30(9):2632-2638.

(88) Pastorelli G, Roncarolo MG, Touraine JL, Peronne G, Tovo PA, de Vries JE. Peripheral blood lymphocytes of patients with common variable

immunodeficiency (CVID) produce reduced levels of interleukin-4, interleukin-2 and interferon-gamma, but proliferate normally upon activation by mitogens. *Clin Exp Immunol* 1989; 78(3):334-340.

(89) Fischer MB, Wolf HM, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Lokaj J et al. 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; 95(2):209-214.

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

(91) Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansotegui IJ, Giovannetti A et al. IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 1997; 46(1):86-90.

(92) 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; 90(1):25-30.

(93) Wright JJ, Wagner DK, Blaese RM, Hagenruber C, Waldmann TA, Fleisher TA. Characterization of common variable immunodeficiency: identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features. *Blood* 1990; 76(10):2046-2051.

(94) Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E et al. A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1994; 84(12):4234-4241.

(95) Etzioni A, Ochs HD. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatr Res* 2004; 56(4):519-525.

- (96) 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; 164(1):488-494.
- (97) Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356(6370):607-609.
- (98) Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(14):6586-6590.
- (99) Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E et al. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(3):811-815.
- (100) Di Renzo M, Serrano D, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(1):117-122.
- (101) 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; 92(2):340-352.
- (102) Groth C, Drager R, Warnatz K, Wolff-Vorbeck G, Schmidt S, Eibel H et al. Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2002; 129(1):133-139.

(103) Denz A, Eibel H, Illges H, Kienzle G, Schlesier M, Peter HH. Impaired up-regulation of CD86 in B cells of "type A" common variable immunodeficiency patients. *Eur J Immunol* 2000; 30(4):1069-1077.

Publicaciones

Costimulatory Molecules and Cytokine Production by T Lymphocytes in Common Variable Immunodeficiency Disease

J. Pons, J. M. Ferrer, N. Martínez-Pomar, J. Iglesias-Alzueta & N. Matamoros

Servei d'Immunologia, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

Received 8 February 2006; Accepted in revised form 9 March 2006

Correspondence to: Dr N. Matamoros, Servei d'Immunologia, Hospital Son Dureta, Andrea Doria 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain. E-mail: nmatamoros@hsd.es

Abstract

Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous syndrome characterized by hypogammaglobulinaemia and recurrent infections. Although early works pointed to a primary B-lymphocyte defect as a cause of the disease, a failure in T-lymphocyte cooperation has also been suggested. T cells exert their costimulatory function through either membrane costimulatory molecules or secreted cytokines, both having an influence in the development of the humoral response. The aim of our study was to evaluate whether an abnormal expression and induction of costimulatory molecules or alterations in the production of cytokines by T cells cause deficient T/B cooperation in CVID patients. We studied the expression and upregulation of costimulatory molecules (CD28, CD40L/CD154 and CTLA-4/CD152) and production of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) in purified T lymphocytes from CVID patients stimulated with optimal doses of anti-CD3 or suboptimal doses of anti-CD3 and anti-CD28. Stimulated T cells from CVID patients expressed normal levels of CD28, CD40L/CD154 and CTLA-4/CD152 when compared with controls. Except for higher production of IL-4 after stimulation with anti-CD3, T cells of CVID patients produced similar amounts of cytokines compared with controls. An imbalance between costimulatory molecules expression (CD28, CD40L/CD154 and CTLA-4/CD152) and cytokine production by T cells does not explain a deficient cooperation between T and B cells in this group of CVID patients.

Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous group of disorders of unknown aetiology characterized by deficient antibody production and recurrent infections [1]. There is a failure in B-cell differentiation and immunoglobulin secretion in these patients, but it is not clear if this is because of either a primary B-cell defect or to deficient T-cell cooperation [2].

T lymphocytes perform their B helper function through either direct cell-cell interactions or production of soluble mediators (interleukins) that interact with the corresponding receptors on the target cell. Costimulatory signals may decide both the T-cell fate and the development of the humoral immune response. Studies addressing expression and function of costimulatory molecules on T cells from CVID patients, are controversial: costimulation through CD28 cannot correct deficient antigen response [3, 4] and the induction of expression of CD40L/CD154 is impaired on T cells from a subset of CVID patients

[5–7]. Cross-linking of CTLA-4/CD152 on previously normal activated T cells results in antigen-specific apoptosis [8]. Although increased apoptosis has been described in T cells from CVID patients [9], the implication of CTLA-4/CD152 in this fact has not been previously studied in these patients. Interleukins produced by T lymphocytes have a great influence on B-cell differentiation. However, the production of interleukins by T cells has been only partially addressed [10–12].

The aim of this study was to assess if highly purified stimulated T cells from CVID patients were able to express costimulatory molecules and produce the interleukins needed for a correct B-cell cooperation. We evaluated in T cells from CVID patients the following: (1) proliferative response; (2) expression of positive (CD28 and CD40L/CD154) and negative (CTLA-4/CD152) costimulatory molecules; and (3) production of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) after stimulation with anti-CD3 or anti-CD3 and anti-CD28.

Materials and methods

Patients. CVID patients ($n=14$) were selected according to the diagnostic criteria of the International Union for Immunological Societies (IUIS) scientific group for primary immunodeficiency diseases. Patients were on regular substitution therapy with intravenous γ -globulin every 3 weeks and did not suffer infections at the time of the study. Blood samples from patients were collected before replacement therapy after informed consent. Table 1 summarizes age, gender, lymphocyte count, T- and B-cell subpopulations of the patients included in the study. None of the patients had granulomatous-type CVID. Healthy, age- and sex-matched controls ($n=14$) were included in each experiment.

T-lymphocyte purification. T lymphocytes were obtained by negative selection. Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were isolated from heparinized blood by Lymphoprep density gradient centrifugation. PBMC were resuspended in 0.5% BSA–PBS containing a mixture of mouse IgG monoclonal antibodies against CD14, CD16, CD56 and HLA class II. Polystyrene beads coated with IgG antibody against mouse IgG (Dynabeads; Dynal, Oslo, Norway) were added and the sample placed in a magnet to remove unwanted cells. Negatively selected cells were washed twice in PBS–BSA 0.5% and resuspended in RPMI-1640 medium. The purity of T cells defined as CD3⁺ cells was greater than 95% in each experiment.

Cell culture. Purified T lymphocytes were resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), glutamine (2 mM), HEPES (200 mM) and antibiotics (penicillin–streptomycin). For T-cell stimulation, 96-well plates were previously coated with 20 μ g/ml of IgG(Fab) goat anti-mouse (Sigma, Madrid, Spain) and kept at 4 °C overnight. After washing the plates, 10⁵ T cells/well were added and stimulated with 1 μ g/ml of anti-CD3 (clone UCHT1, Dako, Glostrup, Denmark) or with 0.01 μ g/ml of anti-CD3 and

5 μ g/ml of anti-CD28 (clone L293, Becton Dickinson, Madrid, Spain). Cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere during 48 h to measure CD28 and CD40L/CD154 expression. Preliminary experiments revealed that the highest expression was obtained after 72 h of culture (data not shown) and that was the time point chosen for intracellular CTLA-4/CD152 staining. T-cell proliferation was determined at 72 h of culture by adding 1 μ Ci/well of ³H-thymidine during the final 16 h.

Flow cytometry. Phenotyping of cultured cells was performed by flow cytometry using mean fluorescence intensity (MFI) as arbitrary measuring units. Anti-CD4 FITC and anti-CD8 PerCp-labelled monoclonal antibodies (Becton Dickinson) were used to gate both T-cell subpopulations. To evaluate surface CD28 and CD40L/CD154 expression, anti-CD28 and anti-CD40L/CD154 PE-conjugated monoclonal antibodies (both from Becton Dickinson) were used.

For intracellular detection of CTLA-4/CD152, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-CTLA-4/CD152 (Immunotech, Beckman-Coulter, Izasa, Spain) or mouse control IgG PE-conjugated monoclonal antibodies using the Intrastain Fixation and Permeabilization kit (Dako, Glostrup, Denmark), following the manufacturer's instructions. FACS analysis was performed with a FACSCalibur using the CELLQUEST software (Becton Dickinson).

Cytokine quantification. Cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) were measured in culture supernatants after 16 h of culture, using the cytometric bead array (Becton Dickinson) according to the instructions of the manufacturer.

Statistical analysis. All results are expressed as mean \pm SEM. Unpaired t-tests were used to assess the statistical significance between groups. $P<0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Table 1 Age, gender and lymphocyte populations of common variable immunodeficiency patients included in the study

Patient	Age (years)	Sex (M/F)	Lymphocytes (10 ³ /ml)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD19 (%)
1	70	F	600	48	16	3
2	56	M	1500	54	21	2
3	77	M	2700	33	51	3
4	84	F	1700	32	31	9
5	30	M	800	54	22	3
6	33	M	1400	37	21	4
7	42	M	3300	28	44	7
8	37	F	900	49	27	8
9	39	F	2300	56	25	10
10	55	F	2300	43	33	6
11	50	F	1900	32	36	14
12	18	M	2500	23	29	19
13	74	F	4400	42	36	3
14	71	F	900	31	31	3
Normal range	–	–	1000–2700	39–51	17–31	6–15

Results

Proliferative response to CD3 or CD3 and CD28

In vitro stimulation with optimal doses of cross-linked anti-CD3 (1 µg/ml) or suboptimal doses of anti-CD3 (0.01 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) induced similar proliferation of T cells from CVID patients and controls (Fig. 1).

Expression of CD28 and CD40L molecules

Unstimulated and anti-CD3-stimulated CD4⁺ T cells from CVID patients and controls expressed similar levels of CD28 (143 ± 10 versus 137 ± 11 and 564 ± 54 versus 580 ± 58 MFI, respectively) (Fig. 2).

CD8⁺ T cells from both the groups also expressed similar amounts of CD28 before (94 ± 10 versus 102 ± 11 MFI) and after stimulation with anti-CD3 (368 ± 43 versus 414 ± 43 MFI) (Fig. 2).

CD4⁺ T cells from CVID patients and controls expressed similar levels of CD40L/CD154 after stimulation with anti-CD3 antibody (78 ± 11 versus 72 ± 6 MFI, respectively) or anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies (119 ± 17 versus 102 ± 8 MFI, respectively) (Fig. 3).

CD8⁺ T cells from CVID patients and controls also expressed similar amounts of CD40L/CD154 after stimulation with anti-CD3 antibody alone (38 ± 5 versus 33 ± 4 MFI, respectively) or anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation (41 ± 5 versus 38 ± 4 MFI, respectively) (Fig. 3).

Expression of CTLA-4/CD152 molecule

CTLA-4/CD152 is rapidly endocytosed and most molecules are found intracellular rather than at the cell surface [13]. Thus, we determined the intracellular expression of CTLA-4/CD152. CD4⁺ T cells from patients and controls expressed similar levels of CTLA-4/CD152 after anti-

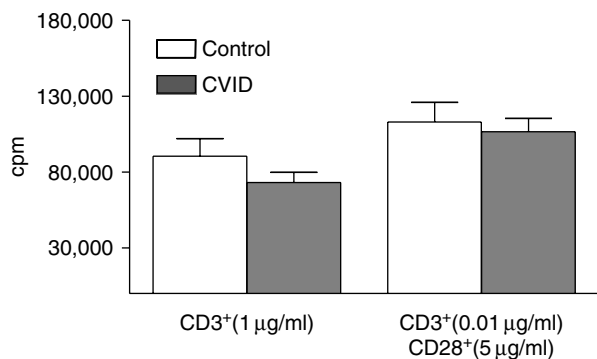


Figure 1 Proliferative response (measured as cpm) to anti-CD3 (1 µg/ml) or anti-CD3 (0.01 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) (*P*-value nonsignificant).

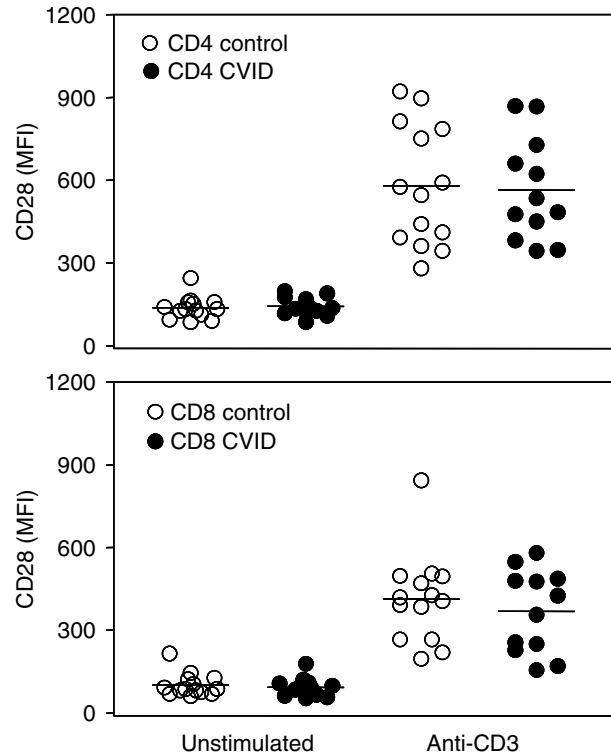


Figure 2 Analysis of CD28 expression on T lymphocytes. CD28 [measured as mean fluorescence intensity (MFI)] was evaluated in basal conditions and after 1 µg/ml of anti-CD3 antibody stimulation. Graphics represents surface CD28 MFI on CD4 (upper panel) and CD8 (lower panel) from controls (○) and common variable immunodeficiency (CVID) patients (●).

CD3 stimulation (44 ± 6 versus 46 ± 7 MFI, respectively) or after anti-CD3 and anti-CD28 antibody co stimulation (50 ± 5 versus 49 ± 5 MFI, respectively) (Fig. 4).

Expression of CTLA-4/CD152 on CD8⁺ T cells from CVID patients and controls were similar after anti-CD3 stimulation (36 ± 3 MFI versus 33 ± 3 MFI, respectively) or after anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation (26 ± MFI versus 23 ± 2 MFI, respectively) (Fig. 4).

Interleukin production after stimulation with anti-CD3 or anti-CD3 and anti-CD28

T cells from CVID patients showed a trend towards higher secretion of IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-4 and IL-6 after stimulation with 1 µg/ml of anti-CD3 than controls. However, differences were only statistically significant for IL-4 (Fig. 5).

Stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 induced the production of higher concentration of IL-2, IFN-γ, TNF-α and IL-6 by T cells than did anti-CD3 alone [14]. Using this costimulus, no differences were found when we compared interleukin production by T cells from CVID patients and controls (Fig. 6).

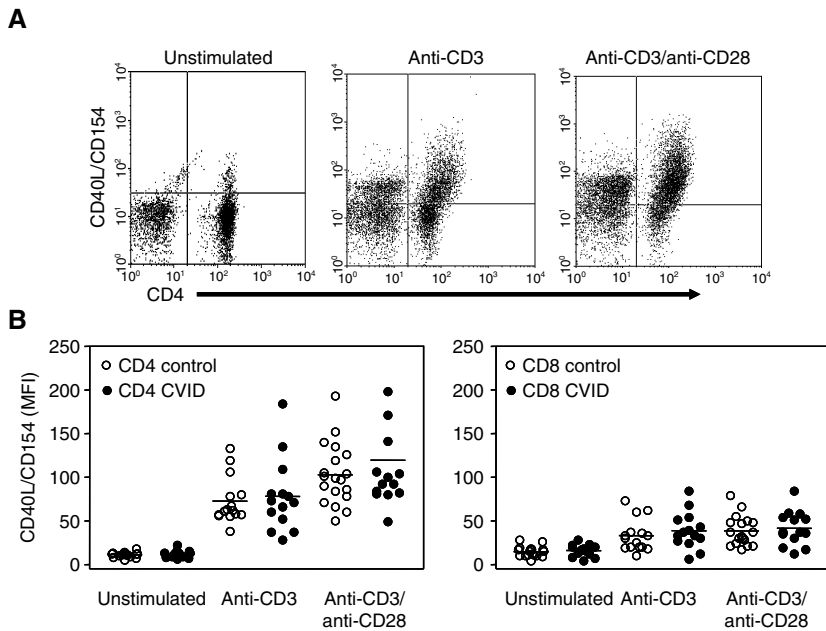


Figure 3 Analysis of CD40L/CD154 expression on T lymphocytes. Panel A shows the flow cytometry analysis of surface expression of CD40L/CD154 on unstimulated (left), anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) (centre)- and anti-CD3 (0.01 $\mu\text{g/ml}$)/anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) (right)-stimulated control T cells. Panel B shows the expression of CD40L/CD154 [measured as mean fluorescence intensity (MFI)] in basal conditions and after stimulation with anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) or with anti-CD3 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) and anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) monoclonal antibodies on CD4 (panel B, left) and CD8 (panel B, right) in controls (○) and common variable immunodeficiency (CVID) patients (●).

Discussion

We used two different stimuli (optimal doses of cross-linked anti-CD3 and suboptimal doses of anti-CD3 plus anti-CD28) to evaluate: (1) proliferative response; (2) expression of positive (CD28, CD40L/CD154) and negative (CTLA-4/CD152) costimulatory molecules; and (3) production of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 and IL-10 by T cells from CVID patients and controls. Except for a higher production of IL-4 after anti-CD3 stimulation, T cells from CVID patients showed similar capabilities than T cells from normal controls.

Previous reports on CVID patients have shown alterations in the distribution of T-cell subpopulations [15, 16] and decreased mitogen-induced T-cell proliferation [17]. Abnormal production of several interleukins, an intrinsic alteration of the TCR signalling machinery in the CD4⁺ population [18] and impaired induction of CD40L/CD154 have also been described [5–7]. In addition, some of our CVID patients showed low levels of proliferation, IL-2 production and protein phosphorylation when the experiments were carried out using PBMC (J. Pons *et al.*, unpublished results). However, most of these studies have been done using unpurified T cells instead of isolated

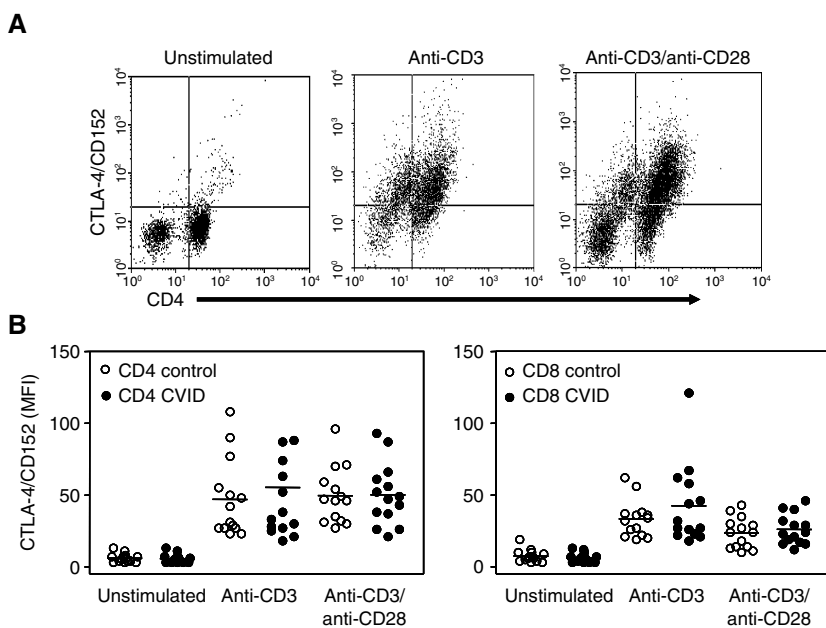


Figure 4 Analysis of CTLA-4/CD152 expression on T lymphocytes. Panel A shows the flow cytometry analysis of intracellular expression of CTLA-4/CD152 on unstimulated (left), anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) (centre)- and anti-CD3 (0.01 $\mu\text{g/ml}$)/anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) (right)-stimulated control T cells. Panel B shows the expression of CTLA-4/CD152 [measured as mean fluorescence intensity (MFI)] in basal conditions and after stimulation with anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) or with anti-CD3 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) and anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) monoclonal antibodies on CD4 (panel B, left) and CD8 (panel B, right) in controls (○) and CVID patients (●).

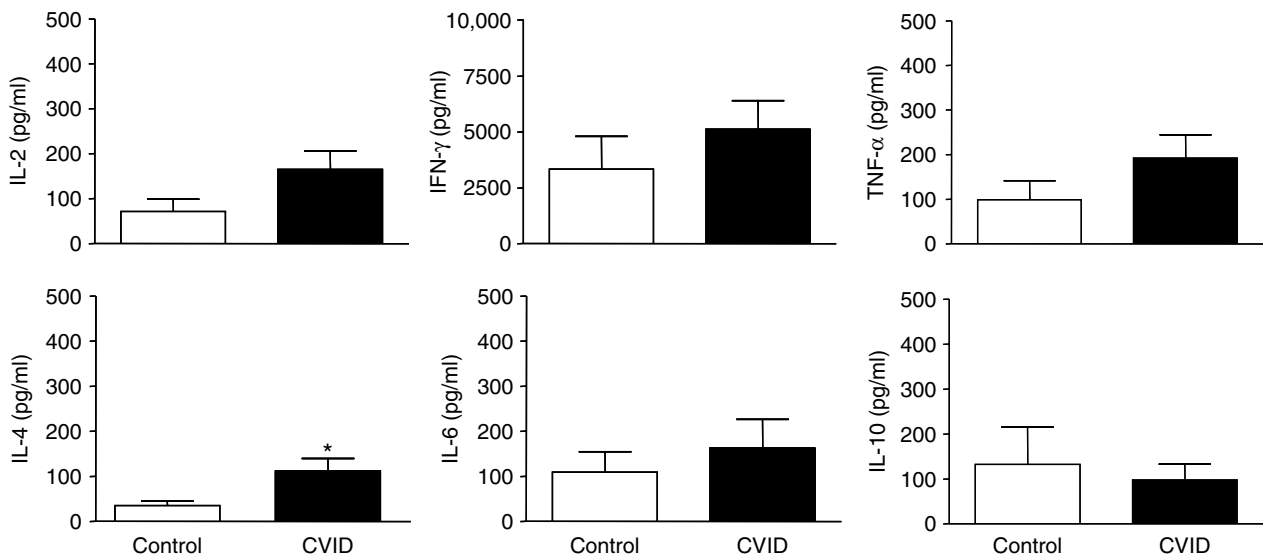


Figure 5 Production of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 and IL-10 by highly purified T lymphocytes from controls (open bars) and common variable immunodeficiency (CVID) patients (closed bars) after anti-CD3 (1 μ g/ml) stimulation. (* $P < 0.05$).

T cells, thus, not excluding the influence of other cells in the obtained results. Furthermore, those studies have not been performed using a two-signalling model simultaneously.

We have found similar levels of proliferative response in CVID and controls with both stimuli. Basal expression and upregulation of CD28 costimulatory molecule was also similar in both groups, implying that CD28 molecules are available at the membrane surface of both, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations, during the culture period. These results validate the costimulatory stimulus used in our experiments.

CD40L/CD154 plays an important role in the humoral immune response. Its interaction with CD40 on B lymphocytes is necessary for productive immunoglobulin class switching. Patients with the hyper-IgM type I (HIGM1) syndrome have mutations in the CD40L/CD154 gene that result in absent or nonfunctional protein expression on activated T cells [1]. Previous studies showed decreased levels of CD40L in CVID patients. However, these studies were carried out in PBMC instead of purified T cells, and inhibitory signals from the antigen-presenting cells (APC) cannot be excluded [7, 19]. When CD40L was analysed in

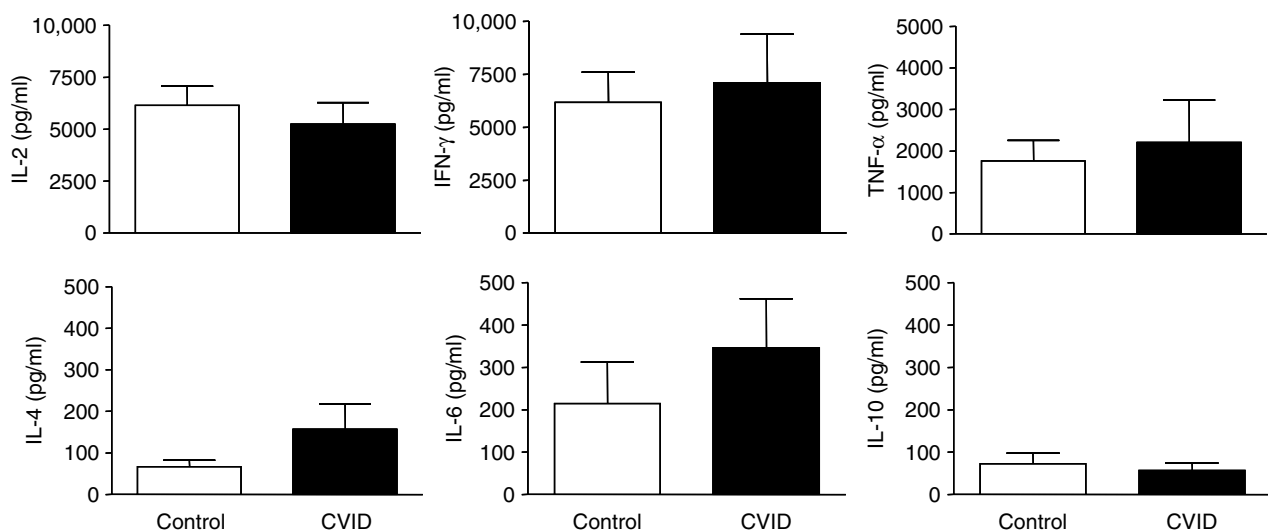


Figure 6 Production of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 and IL-10 by highly purified T lymphocytes from controls (open bars) and common variable immunodeficiency (CVID) patients (closed bars) after anti-CD3 (0.01 μ g/ml) and anti-CD28 (5 μ g/ml) stimulation.

purified CD4⁺ T lymphocytes, other stimuli were used [6] or the experiments were performed on herpesvirus saimiri-transformed T cells [5]. In our hands, when stimulated with anti-CD3 or anti-CD3 plus anti-CD28, T lymphocytes from CVID patients express the same surface amount of CD40L/CD154 than controls. Differences in the results can thus be attributed to experimental procedures. In keeping with this, indirect evidence suggests that CD40L/CD154 signalling is conserved in CVID patients: opportunistic infections that characterize hyper-IgM syndromes caused by mutations in CD40L/CD154 gene (HIGM1) or CD40 gene (HIGM3) are not a consistent finding in CVID patients, although a similar phenotype to hyper-IgM occurs in CVID patients [20]. Moreover, the CD40L/CD40 axis is essential for optimal production of IL-12, and several reports point to an increased IL-12 production in CVID patients [21].

CTLA-4/CD152 is a negative costimulatory molecule and can compete with CD28 for CD80 and CD86 presents on the surface of APC and B cells, reducing positive signalling through this molecule. Blockade of CD28 signalling is sufficient to induce anergy [22] and, in the absence of IL-2, anergized T cells undergo apoptosis [23]. Furthermore, signalling through CTLA-4/CD152 in previously activated T cells results in antigen-specific apoptosis [8]. Increased spontaneous and poststimulation apoptosis has been described in T cells from CVID patients and this has been correlated with the lymphopenia present in these patients. Although CD95 expression is increased in T cells from CVID patients, attempts to induce CD95-mediated apoptosis were unsuccessful [9], pointing to other causes of apoptosis, as those mediated through TNF receptors. Increased expression of TNFR1 and TNFR2 mRNA in CD4⁺ cells from CVID patients has also been proposed as one of the possible mechanisms responsible for accelerated T-cell apoptosis in CVID [24]. To our knowledge, CTLA-4/CD152 has not been previously studied in CVID patients as a possible cause of increased apoptosis. The fact that T cells from CVID patients express similar levels of CTLA-4/CD152 than controls, suggests that the apoptosis observed in CVID patients T cells is not because of an overexpression of CTLA-4/CD152.

Production of cytokines by CVID T cells has been addressed previously with contradictory results. However, most of the studies evaluated only a few cytokines at once or no purified T cells were used [3, 5, 10–12]. The trend towards a higher production of most cytokines by anti-CD3-stimulated CVID T cells, and the significantly higher production of IL-4 (that reinforces previous results published by our group [10]), suggest that these T cells may be highly activated. However, no differences between groups were seen when the second stimulus was applied.

Our results demonstrate that, for the studied variables, the TCR/CD3- and CD28-signalling pathways are functional in T cells of our CVID patients group. During an

ongoing immune response, there is a balance between signals mediating activation and amplification and those that subsequently induce antigen-specific cellular deletion. Positive costimulatory molecules like CD28 and CD40L/CD154 are optimally induced in the patients T cells and cannot account for a lack of cooperation with the B cells and APC in the immune response. CTLA-4/CD152 induction in T cells from our patients is similar to that seen in controls. This suggests that an increased CTLA-4/CD152 expression cannot explain the diminished long-term proliferation and increased apoptosis of T cells, limiting their availability in cooperative responses.

Although we did not find alterations in the expression/induction of classical costimulatory molecules in T cells from CVID patients, we cannot rule out alterations in other costimulatory molecules more recently described. In fact, inducible T cell co-stimulator (ICOS) deletion resulting in a lack of expression of this costimulatory molecule has been recently described in four patients with features of CVID [25]. Another possibility could be that the coreceptors for the studied costimulatory molecules are not properly expressed/induced in the cooperating B cells. This has been described for the coreceptors CD70 and CD86 in B lymphocytes from CVID patients [26, 27].

In summary, these results show that T lymphocytes from our group of CVID patients express normal levels of CD28, CD40L/CD154 and CTLA-4/CD152 and, except for higher production of IL-4, produced similar concentration of cytokines than controls.

Acknowledgments

We thank R. Canet for providing patient samples and X. Busquets and J. A. Bengoechea for a critical review of this manuscript. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1005).

Author's contributions

J. Pons, J. M. Ferrer and N. Matamoros designed the study and wrote the manuscript. J. Pons, J. Ferrer, N. Martínez-Pomar and J. Iglesias performed the experimental procedures (flow cytometry, cell purification, cell culture). All the authors contributed to the interpretation of the results and revised the manuscript.

References

- 1 Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A *et al*. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:677–87.
- 2 Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:421–9.

- 3 Fischer MB, Wolf HM, Eggenbauer H *et al.* 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;95:209–14.
- 4 North ME, Akbar AN, Borthwick N *et al.* Co-stimulation with anti-CD28 (Kolt-2) enhances DNA synthesis by defective T cells in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994;95:204–8.
- 5 Cabanillas JA, Cambronero R, Pacheco-Castro A *et al.* Characterization of Herpesvirus saimiri-transformed T lymphocytes from common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol* 2002;127:366–73.
- 6 Brugnoli D, Airo P, Lebovitz M *et al.* 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;7:176–9.
- 7 Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S *et al.* CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1099–103.
- 8 Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA *et al.* CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:811–5.
- 9 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.
- 10 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;102:286–9.
- 11 Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:298–304.
- 12 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;92: 340–52.
- 13 Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001;1:220–8.
- 14 Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:29–53.
- 15 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;90: 25–30.
- 16 Wright JJ, Wagner DK, Blaese RM, Hagenruber C, Waldmann TA, Fleisher TA. Characterization of common variable immunodeficiency: identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features. *Blood* 1990;76:2046–51.
- 17 Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34–48.
- 18 Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H *et al.* A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1994;84:4234–41.
- 19 Oliva A, Scala E, Quinti I *et al.* IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 1997;46:86–90.
- 20 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998;16:111–35.
- 21 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;164: 488–94.
- 22 Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulat DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992;356:607–9.
- 23 Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6586–90.
- 24 Di Renzo M, Serrano D, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol* 2001;125:117–22.
- 25 Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M *et al.* Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003;4:261–8.
- 26 Groth C, Drager R, Warnatz K *et al.* Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27⁻) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2002;129:133–9.
- 27 Denz A, Eibel H, Illges H, Kienzle G, Schlesier M, Peter HH. Impaired up-regulation of CD86 in B cells of 'type A' common variable immunodeficiency patients. *Eur J Immunol* 2000;30: 1069–77.

**Otras publicaciones
relacionadas**

- (1) Clemente A, Pons J, Matamoros N, Iglesias J, Ferrer JM. B cells from common variable immunodeficiency patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand (CpG-ODN) or anti-CD40+IL21. *Cell Immunol* 2011; 268(1):9-15
- (2) Escobar D, Pons J, Clemente A, Iglesias J, Regueiro V, Bengoechea JA, Matamoros N, Ferrer JM. Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cell Immunol* 2010; 262(2):105-111
- (3) Martinez-Pomar N, Raga S, Ferrer J, Pons J, Munoz-Saa I, Julia MR, de Gracia J, Matamoros N. Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon-gamma gene. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(2):233-8.
- (4) Gardulf A, Nicolay U, Asensio O, Bernatowska E, Böck A, Carvalho BC, Granert C, Haag S, Hernández D, Kiessling P, Kus J, Pons J, Niehues T, Schmidt S, Schulze I, Borte M. Rapid subcutaneous IgG replacement therapy is effective and safe in children and adults with primary immunodeficiencies-a prospective, multi-national study. *J Clin Immunol* 2006; 26(2):177-185

- (5) Matamoros N, De Gracia J, Hernández F, Pons J, Alvarez A, Jiménez V. A prospective controlled crossover trial of a new presentation (10% vs. 5%) of a heat-treated intravenous immunoglobulin. *Int Immunopharmacol* 2005; 5(3):619-626
- (6) Matamoros N, Milà J, Pons J. Primary immunodeficiencies in Spain. Data of the Spanish Registry of primary immunodeficiencies. REDIP 1980-1999 (Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias. *Med Clin (Barc)* 2000; 114(3):96-100.
- (7) Milà J, Matamoros N, Pons J, Ragá S, Iglesias J. The Spanish Registry of primary immunodeficiencies. *Sangre (Barc)* 1999; 44(2):163-167.

