

Departamento de Medicina  
Centro de Investigación del Cáncer  
Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca

# DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE INMUNODEFICIENCIAS PREDOMINANTEMENTE DE ANTICUERPOS

Elena Blanco Álvarez

Directores:  
Prof. Martín Pérez Andrés  
Prof. Alberto Orfao

Tesis doctoral  
2018







## Departamento de Medicina

**D. Martín Pérez Andrés, Doctor en Medicina y Profesor Contratado Doctor del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.**

### **CERTIFICA:**

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por Dña. Elena Blanco Álvarez y titulado “*Desarrollo de nuevas estrategias para diagnóstico y clasificación de inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos*”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “*Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional*” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 5 de Junio de 2018.

**Fdo.: Prof. Martín Pérez Andrés**





**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Departamento de Medicina**

**D. José Alberto Orfão de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por Dña. Elena Blanco Álvarez y titulado *“Desarrollo de nuevas estrategias para diagnóstico y clasificación de inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa *“Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional”* de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 5 de Junio de 2018.

**Fdo.: Prof. José Alberto Orfão de Matos Correia e Vale**



Esta Tesis Doctoral fue desarrollada siendo Elena Blanco Álvarez beneficiaria de una *“Ayuda Predoctoral de la Junta de Castilla y León”* financiada por el Fondo Social Europeo (JCYL-EDU/346/2013).

---

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha contado con el apoyo (financiación por proyectos, utilización de infraestructuras y/o cesión de muestras) de las siguientes instituciones:

- Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad)-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional): PI12/00905.
- CIBERONC (Instituto de Salud Carlos III): CB16/12/00400.
- Fundación Mutua Madrileña: AP119882013.
- Servicio General de Citometría (NUCLEUS) de la Universidad de Salamanca.
- Servicios de Pediatría, Alergia, Hematología, Medicina Interna, Bioquímica y Otorrinolaringología, y la unidad de Neonatología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.
- Consorcio EuroFlow-PID: Departamento de Inmunología, Centro Médico de la Universidad Erasmus, Rotterdam, Países Bajos; Departamento de Inmunohematología y Transfusión de Sangre, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países bajos; Departamento de Hematología/Oncología, 2º Facultad de Medicina, Universidad Charles, Praga, República Checa; Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario La Paz, grupo de Fisiopatología de Inmunodeficiencias, Instituto para la investigación de la Salud IdiPAZ, Madrid, España; Instituto de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal; Departamento de Inmunología Clínica y Alergia, Hospital Universitario St Anne, Facultad de Medicina, Universidad Masaryk, Brno, República Checa; Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Gante, Gante, Bélgica.
- Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca.
- Servicio de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.
- Servicio de Hematología, Hospital de Navarra, Pamplona.





La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales, dos de ellos ya publicados y uno en periodo de revisión en revistas científicas indexadas en el *Science Citation Reports*, los cuales se detallan a continuación:

**1. Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells.**

Elena Blanco<sup>1</sup>, Martin Perez-Andres<sup>1</sup>, Luzalba Sanoja-Flores<sup>1</sup>, Marjolein Wentink<sup>2</sup>, Ondrej Pelak<sup>3</sup>, Marta Martín-Ayuso<sup>4</sup>, Georgiana Grigore<sup>4</sup>, Juan Torres-Canizales<sup>5</sup>, Eduardo López-Granados<sup>5</sup>, Tomas Kalina<sup>3</sup>, Mirjam van der Burg<sup>2</sup>, Sonia Arriba-Méndez<sup>6</sup>, Santiago Santa Cruz<sup>7</sup>, Noemí Puig<sup>8</sup>, Jacques J.M. van Dongen<sup>9</sup> y Alberto Orfao<sup>1</sup>, on behalf of the EuroFlow PID group.

*Journal of Immunological Methods*; 2017 Sep 28. doi: 10.1016/j.jim.2017.09.008.

**2. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood.**

Elena Blanco<sup>1</sup>, Martín Pérez-Andrés<sup>1</sup>, Sonia Arriba-Méndez<sup>6</sup>, Teresa Contreras-Sanfeliciano<sup>10</sup>, Ignacio Criado<sup>1</sup>, Ondrej Pelak<sup>3</sup>, Ana Serra-Caetano<sup>11</sup>, Alfonso Romero<sup>12</sup>, Noemí Puig<sup>8</sup>, Ana Remesal<sup>6</sup>, Juan Torres-Canizales<sup>5</sup>, Eduardo López-Granados<sup>5</sup>, Tomas Kalina<sup>3</sup>, Ana E. Sousa<sup>11</sup>, Menno van Zelm<sup>13</sup>, Mirjam van der Burg<sup>2</sup>, Jacques J.M. van Dongen<sup>9</sup>, Alberto Orfao<sup>1</sup>, on behalf of the EuroFlow PID group.

*Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 2018 Mar 2. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.017.

**3. Dissection of defects in memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin subclasses provides basis for (new) re-classification of CVID and Ig-subclass deficiencies.**

Elena Blanco<sup>1§</sup>, Martín Pérez-Andrés<sup>1§</sup>, Sonia Arriba-Méndez<sup>6</sup>, Cristina Serrano<sup>14</sup>, Lucía del Pino-Molina<sup>1</sup>, Susana Silva<sup>11</sup>, Ignacio Criado<sup>1</sup>, Ignacio Madruga<sup>15</sup>, Ana Serra Caetano<sup>11</sup>, Teresa Contreras-Sanfeliciano<sup>10</sup>, Francisco Sala<sup>16</sup>, Alejandro Martín<sup>8</sup>, José María Bastida<sup>8</sup>, Félix Lorente<sup>6</sup>, Carlos Prieto<sup>17</sup>, Ignacio Dávila<sup>18</sup>, Miguel Marcos<sup>15</sup>, Tomas Kalina<sup>3</sup>, Marcela Vlkova<sup>19</sup>, Carolien Bonroy<sup>20</sup>, Jan Philippé<sup>20</sup>, Eduardo López-Granados<sup>5</sup>, Ana E. da Sousa<sup>11</sup>, Mirjam van der Burg, PhD<sup>2</sup>, Jacques J.M. van Dongen<sup>9\*</sup>, Alberto Orfao<sup>1\*</sup>, on behalf of the EuroFlow PID group.

<sup>§</sup>Both authors contributed equally to this work and should both be considered as first author.

\*Both authors contributed equally to this work and should both be considered as last author.

(sometido para publicación y en revisión en *Journal of Allergy and Clinical Immunology*)

<sup>1</sup>Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Centro Médico de la Universidad Erasmus, Rotterdam, Países Bajos. <sup>3</sup>Departamento de Hematología/Oncología, 2º Facultad de Medicina, Universidad Charles, Praga, República Checa. <sup>4</sup>Cytognos S.L., Salamanca, España. <sup>5</sup>Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario La Paz, grupo de Fisiopatología de Inmunodeficiencias, Instituto para la investigación de la Salud IdiPAZ, Madrid, España. <sup>6</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. <sup>7</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. <sup>8</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. <sup>9</sup>Departamento de Inmuno-Hematología y Transfusión de Sangre, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países bajos <sup>10</sup>Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. <sup>11</sup>Instituto de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal. <sup>12</sup>Centro de Atención Primaria de Salud Miguel Armijo, Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, España. <sup>13</sup>Departamento de Inmunología y Patología, Universidad Monash y Hospital Alfred, Melbourne, Victoria, Australia. <sup>14</sup>Servicio de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. <sup>15</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España. <sup>16</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Navarra, Pamplona, España. <sup>17</sup>Servicio de Bioinformática (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España. <sup>18</sup>Servicio de Alergia, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Departamento de Ciencia Biomédica y de Diagnóstico, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. <sup>19</sup>Departamento de Inmunología Clínica y Alergia, Hospital Universitario St. Anne, Facultad de Medicina, Universidad Masaryk, Brno, República Checa. <sup>20</sup>Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Gante, Gante, Bélgica.

*A mis padres.*

*A Nacho.*



Imagen de portada de  
*Miguel Ángel Blanco Otero*



“Lo más maravilloso de la ciencia es que está viva”

Richard Feynman.





# Agradecimientos

Cuando una etapa llega a su fin, es inevitable mirar atrás, y aunque el periodo de tesis está lleno de altibajos y supone todo un reto (no solamente intelectual) creo que con lo que nos tenemos que quedar al final es con las cosas buenas. Y entre ellas, está toda la gente que me ha ayudado a llegar hasta aquí y me han hecho el camino más fácil.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis por la oportunidad de llevar a cabo este trabajo. Martín, gracias por todas las horas dedicadas a este proyecto y por tener siempre tiempo para mis múltiples llamadas y correos con dudas, aunque estuvieras hasta arriba de trabajo. Y, sobre todo, gracias por ver el vaso medio lleno, cuando yo lo veía vacío del todo. Alberto, gracias por ser un ejemplo de trabajo y dedicación a la ciencia, por hacernos pensar y plantearnos las cosas desde diferentes perspectivas, y por todos tus consejos y apoyo estos años. Sin vosotros, este trabajo no habría sido posible.

Nunca he sabido en qué momento decidí dedicarme a la ciencia, pero el hecho de que al final esté aquí ha sido por el "empujón" de muchas personas. Gracias a Gemma, Paco y Don Manuel, por haberme inculcado el cariño por la farmacia, que fue el primer pasito. También a mis profesores de grado y máster, por "meterme el gusanillo" de la investigación, y especialmente a Rafa Góngora, ya que contigo empecé en el complejo y apasionante mundo de la inmunología.

También quiero dar las gracias a Sonia, ya que, aunque no hayas dirigido esta tesis, sin tu ayuda no habría salido adelante. Gracias por contestar a todos mis correos, whatsapps, llamadas... siempre con una sonrisa y sin denunciarme por acoso. Y, sobre todo, gracias por tu amistad y apoyo estos años. Gracias también a las demás personas del servicio de Pediatría del Hospital Clínico, y especialmente a Carmen, por hacerme el trabajo mucho más fácil. Eduardo, Lucía, Juan, Nacho y Cristina, muchas gracias por vuestra colaboración en la recopilación de pacientes y datos clínicos. Y por supuesto, gracias a todos los pacientes y voluntarios por participar en el estudio.

I would also like to thank all the members of the EuroFlow immunodeficiency consortium for your collaboration and fruitful discussions (Tomas, Mirjam, Ana...), and specially to Jacques, thank you for your continuous support, review my articles and always have a kind word.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, a los que están y a los que ya se han ido. Muchos de vosotros, tras tantas horas juntos, os habéis convertido en grandes amigos. Hablando de horas en un laboratorio... ¡Cristina! Aunque te hayan adoptado en Leiden, sabes que siempre serás del 11, y más concretamente "del café". Muchas gracias por haberme enseñado tanto, por estar siempre dispuesta a echar un mano y por ser sincera cuando hace falta. Aún echo de menos nuestras cenas (incluso las de "¿me puede traer una pizza al Hospital Clínico?"). Gracias también a Albita, la chica más resolutiva del mundo, por haberme facilitado tanto las cosas siempre y por cuidar de todos, aunque ahora sea en la distancia. Paula, gracias por tus ánimos y las risas que nos hemos echado estos años (especialmente disgregando amígdalas y en algún que otro congreso y despedida...).

¡Y ahora a los del café que aún se mantienen fieles a nuestra cita de las 10,30 con Abundio et al.! Gracias Guille por tantas y tantas risas, tantos y tantos cafés, y por escucharme y ayudarme en mis "brotos". Gracias Mayado por estar siempre pendiente y aconsejarme cuando lo he necesitado, y por compartir mi indignación con los "hámsters" del mundo. Nacho (zorro...), gracias por hacernos los cafés tan amenos y elegir tan bien los pinchos. A los ahora usuarios ocasionales del café: María GG, ¡mi referente! gracias por ser una gran maestra Jedi, por ponerte en modo madre y hasta insultarme con amor cuando hace falta, y por hacerme tanta gracia. M. Jara, alias mata-zombis, gracias por tu sitio, tus recomendaciones de series y tus achuchones de osezno ocasionales. Gracias Dani por acogerme cuando solo era una "patita" e introducirme en el mundo de la citometría. Y tito Sergio, aunque nos veamos mucho menos que antes, sigues haciéndome mucha gracia, gracias por tus tontunas.

También quiero dar las gracias a mis demás compañeros del centro del cáncer. Julia, gracias por escucharme y ayudarme siempre que lo he necesitado, y por ser un ejemplo. A Arancha por ser una gran compi de sitio, y ser siempre tan amable. A Quentin, por toda tu ayuda con infinicyt y Excel, por vigilarme el coche como buen vecino y por derrotar a Locky. A Manuel, por tener fe en que algún día seré famosa. A mis ex-compis del horno, también llamada sala de análisis del I+D+i: a Lourdes (atempera tu entusiasmo) por ser una gran bestie y las risas que nos hemos echado estos años, a Susana por tu ayuda siempre, a Carlos por haberme enseñado tanto (aunque aún tengo mucho que aprender), por animarme siempre que me veías de bajón y por tu gran empatía. A Mari Luz, Sheila, Paloma, Javi y Carolina por vuestra ayuda y por coger mis muestras siempre con una sonrisa. A Laura por todos tus consejos y estar siempre dispuesta a echar una mano, a Lola por tu amabilidad y a Andrés por estar siempre pendiente de cómo vamos y por tus ánimos. Gracias

también al "equipo Cytognos", Georgiana y Marta, por todo vuestro apoyo estos años. A los "predocs" nuevos y no tan nuevos: Alejandro, Noemí, Blanca, Guille y especialmente "mi heredera" Sara, gracias por coger el relevo y mucho ánimo, al final todo sale. Juanito, gracias por tu paciencia con todas mis dudas y por tus enseñanzas de calibración y compensación. Gracias Chema por tu sinceridad y tus consejos, y Josito por tu ayuda cuando empecé y la palabra "bulk" me sonaba a nombre de fruta. Gracias también a las técnicas de citometría: Miriam 1, Miriam 2, Virginia y Rosana, por vuestra paciencia cuando os robaba anticuerpos y por dejarme "colarme" en el citometro, A los citometristas más veteranos: gracias Juana por todo tu cariño y por poner un punto artístico a todo. Y por supuesto, gracias Toño por haberme transmitido una pequeña parte de tus conocimientos y por ser una gran persona.

¡Pero fuera del laboratorio también hay vida! Aunque muchas veces se comparta también con los coworkers. Gracias Noe por estar siempre pendiente, por todos los detalles que tienes siempre con nosotros y por ser mi compi lectora. Luz ¡Chama!, gracias por todo tu apoyo y ayuda estos años, y por alegrarte tanto de mis logros como si fueran tuyos. Vítor, eres el mejor padawan y compi yogui que se puede tener, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme (si es que somos taaan majos...). Gracias a mi chileno favorito, Álex, por tu ayuda y tus psicoanálisis, y a María Tablas y a Pilar, por vuestra alegría contagiosa. Gracias también, aunque ya no estéis por aquí, a Patri y Valentina, por los momentos vividos dentro y fuera del labo.

Y ya fuera del mundo científico, quiero dar las gracias a mis farma-charros, por todo vuestro apoyo desde que llegué a Salamanca hace ya 12 años y que aún seguís dándome, aunque estemos cada uno en una punta del mundo. Gracias Santos, Ruth, Domin, Quique, Javi, Pardal, Sandra, Irene, Joanna, Pili, Elia, Alva, Vir, Ángel y especialmente Ana, por ser la mejor compañera de piso y amiga que se puede tener. También gracias al club de fans de Bob Dylan, por poner ese punto de locura que siempre es bien recibido: Miki, Dani, y especialmente gracias Kike por tener más confianza en mí que yo misma, y mi tovarich Jose, por estar ahí siempre.

Por supuesto, gracias también a toda mi familia, ¡que no os nombro porque sois tropecientos! A mis abuelos, por ser una inspiración para todos nosotros. A mis tíos y primos, por echarme la bronca cuando falta y por vuestro cariño, y especialmente gracias a Miguel por la portada, y a Nere, por todo, siempre.

Por último, quiero dedicar este trabajo a mis padres, porque sin ellos nunca hubiera llegado hasta aquí. Mamá, gracias por escucharme siempre, por todo tu apoyo y por repetirme hasta la saciedad que podía conseguirlo ("al toro que es una

hormiga"). Papá, gracias por ayudarme con todos y cada uno de mis agobios, por muchos agobios que tuvieras tú también, y por todos tus consejos. Gracias también a la subpiña de la piña, Patri, David y Manuel, por ser como sois.

A Nacho, por ser el mejor compañero de tesis y de vida que se puede tener, por tu apoyo, comprensión y cariño todos estos años y por el que sé que me vas a seguir dando. Y sobre todo, gracias por tus sonrisas.





# Índice general





<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Inmunoglobulinas</b> .....	3
1.1. Características generales de las inmunoglobulinas .....	3
1.2. Isotipos y subclases de inmunoglobulinas .....	5
1.2.1. IgM .....	6
1.2.2. IgG y subclases de IgG .....	7
1.2.3. IgA y subclases de IgA .....	10
1.2.4. IgD .....	12
1.2.5. IgE.....	13
<b>2. Origen, características funcionales e inmunofenotipo de los linfocitos B</b> .....	13
2.1. Maduración B independiente de antígeno .....	14
2.2. Maduración B dependiente de antígeno .....	17
2.2.1. Respuesta B dependiente de linfocitos T.....	17
2.2.2. Respuesta B independiente de linfocitos T.....	21
2.3. Poblaciones de linfocitos B circulantes en sangre .....	23
<b>3. Desarrollo de la respuesta B a lo largo de la vida</b> .....	27
3.1. Desarrollo de los órganos linfoides .....	28
3.2. Niveles séricos de inmunoglobulinas .....	30
3.3. Ontogenia de los linfocitos B .....	32
3.4. Ontogenia de otros componentes del sistema inmune.....	34
<b>4. Inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos</b> .....	35
4.1. Deficiencia grave de todos los isotipos de inmunoglobulina con ausencia o reducción importante del número de linfocitos B (agammaglobulinemias) .....	36
4.2. Deficiencia grave de al menos dos isotipos de inmunoglobulina con número normal o bajo de linfocitos B (fenotipo de inmunodeficiencia variable común) .....	37
4.2.1. Diagnóstico de la inmunodeficiencia variable común .....	37
4.2.2. Epidemiología, características clínicas y tratamiento de la inmunodeficiencia variable común.....	40
4.2.3. Alteraciones genéticas en la inmunodeficiencia variable común.....	42
4.2.4. Alteraciones de poblaciones de células del sistema inmune en la inmunodeficiencia variable común.....	44
4.2.5. Alteraciones funcionales B asociadas a inmunodeficiencia variable común.....	49
4.3. Deficiencia grave de IgG e IgA con valores normales o elevados de IgM y normales de linfocitos B (síndromes híper-IgM).....	50
4.4. Deficiencia funcional B, de isotipo de cadenas pesadas o de cadenas ligeras de inmunoglobulina .....	52

4.4.1. Déficit selectivo de IgA.....	52
4.4.1.1. Diagnóstico del déficit selectivo de IgA.....	52
4.4.1.2. Epidemiología, características clínicas y tratamiento del déficit selectivo de IgA.....	53
4.4.1.3. Alteraciones genéticas asociadas al déficit selectivo de IgA.....	54
4.2.1.4. Alteraciones en poblaciones de células del sistema inmune en el déficit selectivo de IgA .....	56
4.2.1.5. Alteraciones funcionales asociadas a déficit selectivo de IgA.....	57
4.4.2. Déficit de subclases de IgG asociado o no a déficit de IgA .....	58
4.4.3. Otros déficits funcionales B, de isotipo IgM y de cadena ligera kappa .....	59
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>Artículo 1:</b> “Selección y validación de clones de anticuerpos dirigidos frente a subclases de IgA e IgG expresadas en linfocitos B de memoria y células plasmáticas que presentan cambio de isotipo” .....	75
<b>Artículo 2:</b> “Distribución en sangre de las distintas subpoblaciones de linfocitos B y de células plasmáticas normales a lo largo de la vida” .....	91
<b>Artículo 3:</b> “La disección de los defectos de las poblaciones de linfocitos B de memoria y células plasmáticas que expresan diferentes subclases de inmunoglobulinas proporciona una base sólida para una (nueva) re-clasificación de la IDVC y de los déficits de subclases de inmunoglobulinas” .....	109
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>175</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>185</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>227</b>

# Glosario de Abreviaturas

## A

**Ac:** anticuerpo.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**Ag:** antígeno.

**AHI1:** sitio de integración colaborador de la proteína Abelson tipo 1 (del inglés, *Abelson helper integration site 1*).

**AID:** deaminasa de citidina inducida por activación (del inglés, *activation-induced cytidine deaminase*).

**AMBRA1:** molécula activadora de la autofagia regulado por Beclin-1 (del inglés, *Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy*).

**APE:** endonucleasa apurínica/apirimidínica (del inglés, *apurinic/apyrimidinic endonuclease*).

**ATG13:** gen/proteína relacionada con la autofagia tipo 13 (del inglés, *Autophagy-related protein 13*).

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**ATP6AP1:** gen/proteína accesoria de la ATPasa transportadora de protones H<sup>+</sup> tipo 1 (del inglés, *ATPase H<sup>+</sup> transporting accessory protein 1*).

## B

**BAFF-R:** receptor del factor de activación B (del inglés, *B-cell activating factor receptor*).

**BCR:** receptor de la célula B (del inglés, *B-cell receptor*).

**BLK:** tirosina quinasa de célula B (del inglés, *B-cell lymphocyte kinase*).

**Blimp-1:** proteína inductora de maduración del linfocito B tipo 1 (del inglés, *B lymphocyte-induced maturation protein-1*).

**BLNK:** gen/proteína de unión a célula B (del inglés, *B-cell linker protein*).

**BTK:** gen/proteína quinasa de Bruton (del inglés, *Bruton's tyrosine kinase*).

## C

**CCR6:** receptor de quimiocinas tipo C-C 6.

**Ci:** citoplasmático.

**CD:** *cluster* (o grupo) de diferenciación (del inglés, *cluster of differentiation*).

**CDF:** célula dendrítica folicular.

**CP:** célula plasmática.

**CG:** centro germinal.

**CELC16A:** gen/proteína A de la familia 16 de proteínas con dominio tipo lectina C (del inglés, *C-type lectin domain family 16 member A*).

**CTLA-4:** antígeno del linfocito T citotóxico tipo 4 (del inglés, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*).

## D

**DCLRE1C:** gen/proteína de reparación de uniones de ADN tipo 1C (del inglés, *DNA cross-link repair 1C*).

## E

**EBF1:** factor de transcripción B temprano tipo 1 (del inglés, *early B-cell factor 1*)

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*).

**ELISpot:** ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunoSpot assay*).

## F

**Fc:** fragmento cristalizante de moléculas de inmunoglobulina.

**FcR:** receptor del fragmento cristalizante de inmunoglobulina.

**FcRn:** receptor neonatal del fragmento cristalizante de inmunoglobulina.

## H

**HLA:** antígeno leucocitario humano (del inglés, *human leukocyte antigen*).

## I

**ICOS:** gen/proteína inducible co-estimuladora de célula T (del inglés *inducible T-cell costimulator*).

**IDP-Ac:** inmunodeficiencia predominantemente de anticuerpos.

**IDP:** inmunodeficiencia primaria.

**IDVC:** inmunodeficiencia variable común.

**IFIH1:** gen/proteína con dominio helicasa C inducida por interferón tipo 1 (del inglés, *interferon induced with helicase C domain 1*).

**Ig:** inmunoglobulina.

**IGH:** cadena pesada de inmunoglobulina (del inglés, *immunoglobulin heavy chain*).

**IGHC:** región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (del inglés, *immunoglobulin heavy chain constant region*).

**IGL:** cadena ligera de inmunoglobulina (del inglés, *immunoglobulin light chain*).

**IKBA:** inhibidor alfa del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B).

**IL:** interleucina.

**IL2RG:** cadena gamma del receptor de la IL2 (del inglés, *interleukin 2 receptor subunit gamma*).

**IRF2BP2:** gen/proteína de unión tipo 2 al factor regulador de interferón tipo 2 (del inglés, *interferon regulatory factor 2 binding protein 2*).

**IRF-4:** factor regulador de interferón tipo 4 (del inglés, *Interferon regulatory factor 4*).

**IUIS:** Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (del inglés, *International Union of Immunological Societies*).

## J

**JAK3:** gen/proteína quinasa Janus tipo 3 (del inglés, *Janus Kinase 3*).

## L

**LLC:** leucemia linfática crónica.

**LRBA:** gen/proteína de anclaje sensible a lipopolisacárido (del inglés, *lipopolysaccharide (LPS)-responsive beige-like anchor protein*).

## M

**MALT:** tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés, *mucosa-associated lymphoid tissue*).

**MO:** médula ósea.

**MSH6:** homólogo de mutS tipo 6 (del inglés, *mutS homolog 6*).

## N

**NHEJ:** unión de extremos no homólogos de ADN (del inglés, *non-homologous end joining*).

**NEMO:** modulador esencial de NFκB (del inglés, *NF-kappa-B essential modulator*).

**NFκB:** factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

**NK:** células asesinas naturales (del inglés, *natural killer*).

**NLR:** receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos (del inglés, *nucleotide oligomerization domain-like receptor*).

**Nu:** nuclear.

## O

**OLS:** órgano linfoide secundario.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

## P

**Pax-5:** factor de transcripción tipo “caja-pareada” 5 (del inglés, *paired-box protein Pax-5*)

**pIgR:** receptor de inmunoglobulina polimérica.

**PIK3CD:** subunidad catalítica delta de la fosfoinositol 3-quinasa (del inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit delta*).

**PIK3R1:** subunidad reguladora 1 de la fosfoinositol 3-quinasa (del inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1*).

**PLCG2:** fosfolipasa C gamma 2 (del inglés, *phospholipase C gamma 2*).

**PRKCD:** subunidad tipo delta de la proteína quinasa C (del inglés, *protein kinase C delta type*).

## R

**RAC2:** sustrato de la toxina botulínica relacionada con Ras tipo 2 (del inglés, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*).

**RAG1:** gen/proteína activadora de recombinación tipo 1 (del inglés, *recombination activating gene 1*).

**RAG2:** gen/proteína activadora de recombinación tipo 2 (del inglés, *recombination activating gene 2*).

## S

**SEC61A1:** subunidad alfa 1 del complejo SEC61 (del inglés, *Sec61 Alpha-1*).

**SP:** sangre periférica.

**STAT3:** transductor de señal y activador de la transcripción tipo 3 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 3*).

## T

**TACI:** activador transmembrana modulador de calcio y ligando de la ciclofilina (del inglés, *transmembrane activator and CAML interactor*).

**TCR:** receptor del linfocito T (del inglés, *T-cell receptor*).

**TLR:** receptor tipo *toll* (del inglés, *Toll-like receptor*).

**THF:** linfocito T colaborador folicular (del inglés, *follicular helper T-cell*).

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *tumor necrosis factor alpha*).

**TRNT1:** transferasa de nucleótidos de ácido ribonucleico (ARN) de transferencia tipo 1 (del inglés, *tRNA nucleotidyl transferase 1*).

**TTC37:** dominio de repetición tetratricopéptido tipo 37 (del inglés, *tetratricopeptide repeat domain 37*).

**TWEAK:** inductor débil de apoptosis de tipo factor de necrosis tumoral (del inglés, *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*).

## U

**UNG:** N-glicosilasa de uracilo (del inglés, *uracil-N-glycosylase*).

## X

**XBP-1:** gen/proteína de unión a caja-X tipo 1 (del inglés, *X-box binding protein 1*).





# Introducción



## 1. Inmunoglobulinas

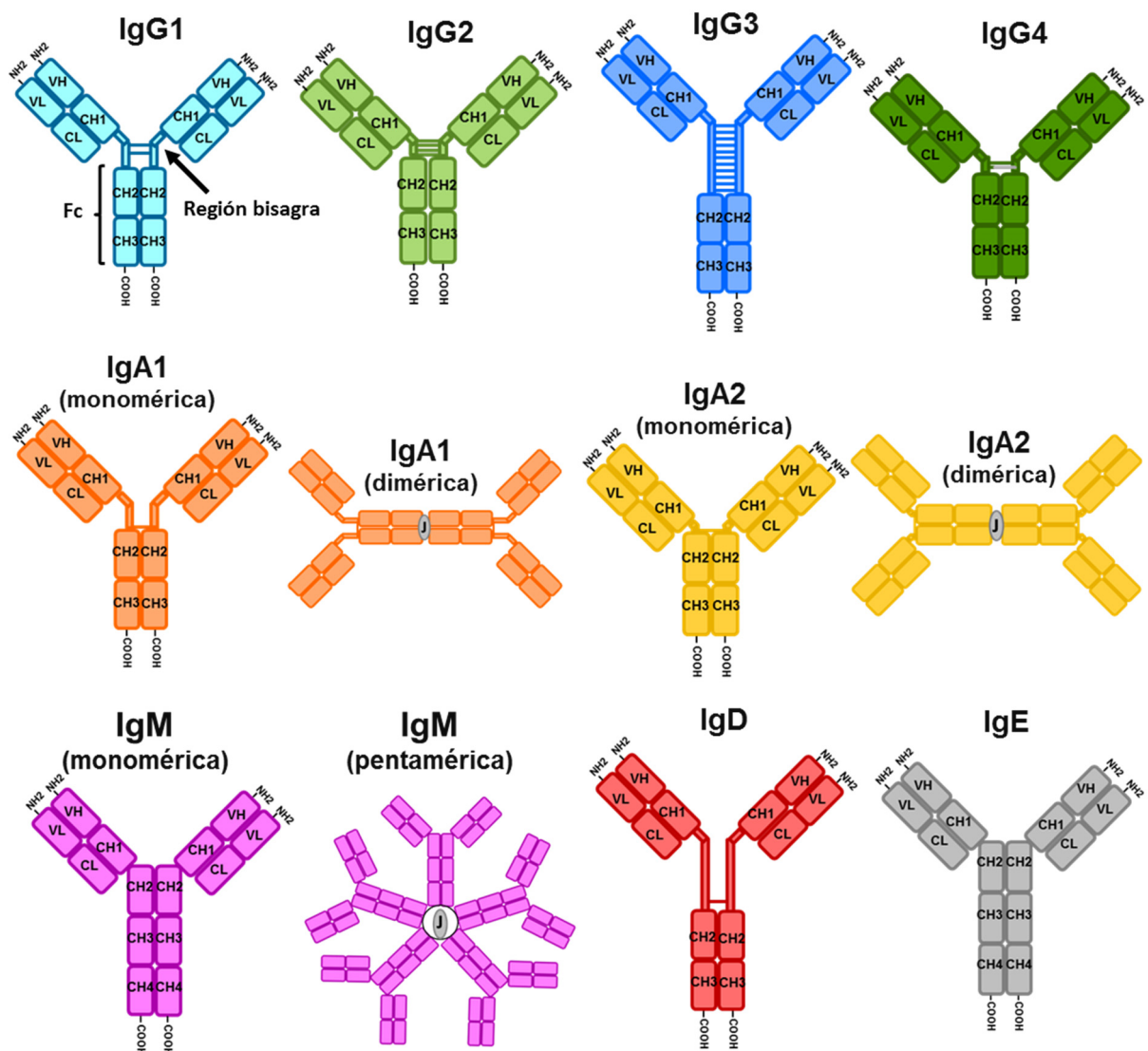
Las inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas producidas por los linfocitos B de animales vertebrados en respuesta a estructuras extrañas conocidas como antígenos (Ags)<sup>1</sup>. Las Igs pueden presentarse en dos formas: i) Igs solubles presentes en fluidos biológicos como la sangre, secreciones externas y líquido cefalorraquídeo, y denominadas anticuerpos (Acs); y ii) en la superficie del linfocito B como parte del receptor de la célula B para Ag (BCR; del inglés, *B-cell receptor*)<sup>1,2</sup>. Desde el punto de vista funcional estas moléculas muestran una elevada especificidad por un Ag concreto, lo que les permite reconocer, neutralizar y eliminar, dicho Ag<sup>3</sup>. En determinadas circunstancias pueden producirse Acs frente a Ags propios, lo que conduciría a respuestas inmunológicas frente al propio organismo (e.g. autoinmunidad)<sup>3,4</sup>.

### 1.1. Características generales de las inmunoglobulinas

La especificidad antigénica y la función de cada Ig dependen de su estructura. En su conjunto, una Ig está formada por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas dos a dos: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, divididas en dos regiones estructural y funcionalmente distintas (Figura 1): i) la región variable aminoterminal, que presenta una elevada heterogeneidad en su secuencia de aminoácidos y que es determinante de su especificidad por el Ag; y ii) la región constante carboxiterna, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas y que permite clasificar las Igs en subgrupos (isotipos y subclases) con distinta función efectora<sup>4,5</sup>. Ambas regiones, variable y constante, de las Igs se organizan en dominios estructurales que se estabilizan mediante la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína, confiriéndoles un aspecto globular<sup>4,5</sup>. Las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  contienen dos dominios globulares, uno variable (VL) y uno constante (CL), mientras que las cadenas pesadas poseen además de un dominio variable (VH), tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4), según el isotipo de Ig (Figura 1). En la mayoría de los isotipos, entre las regiones constantes CH1

y CH2, existe una zona funcional denominada región bisagra (Figura 1), que le permite a la proteína una mayor capacidad de rotación de la región variable, favoreciendo el acceso de la molécula al Ag. La existencia de esta región bisagra también provoca una mayor susceptibilidad a la ruptura proteolítica de la Ig<sup>6</sup>. Aunque en general la Ig se presenta como monómero, algunos isotipos de Ig pueden presentarse en forma de dímero (i.e. IgA) o pentámero (i.e. IgM)<sup>5</sup>. Además, esta estructura se ve modificada por cadenas de glúcidos que se unen a aminoácidos concretos y que modulan la función de la Ig<sup>5</sup>.

**Figura 1. Representación esquemática de la estructura de los distintos isotipos y subclases de Igs.**



Las Igs se componen de dos cadenas pesadas, con tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4) y uno variable (VH), y dos cadenas ligeras, con un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL). En todos los isotipos excepto en la IgM y la IgE existe una región bisagra, con características distintas en los diferentes isotipos. La IgA1 e IgA2 se representan en su forma monomérica y dimerica, y la IgM en su forma monomérica y pentamérica. Fc: fragmento cristalizante de la Ig.

## 1.2. Isotipos y subclases de inmunoglobulinas

Aunque existe un alto grado de homología entre los distintos subtipos de Igs, las variaciones en los aminoácidos que componen la región constante de la cadena pesada (IgH; del inglés, *immunoglobulin heavy chain*), permiten distinguir 5 isotipos de Igs (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), subdivididos a su vez en 4 subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2)<sup>5,7,8</sup>. Dichas diferencias se localizan fundamentalmente en el llamado fragmento cristalizante (Fc), que comprende todos los dominios CH, excepto CH1, y parte de la región bisagra; el Fc es el principal responsable de las funciones efectoras de los distintos isotipos y subclases de Igs<sup>5,9</sup>.

Hoy conocemos, de forma relativamente detallada la función de cada tipo de Ig soluble. En conjunto, los Acs presentan diferentes capacidades funcionales, entre las que merece destacar: la neutralización de Ag, la capacidad de opsonización de Ag y de formar inmunocomplejos, la activación del sistema del complemento y la unión y activación de células efectoras a través de receptores para los distintos Fc de las Igs (FcR). La composición y estructura del Fc de las Igs también condiciona la vida media del Ac, su posible transporte a través de la placenta (mediante el FcR neonatal –FcRn–) y la capacidad de atravesar las membranas mucosas (a través del receptor de Ig polimérica –pIgR–)<sup>5,7,8,10</sup>. Además, las variaciones en el Fc de la zona constante de las Igs también condicionan una distinta capacidad de respuesta a los diferentes tipos de Ags (i.e. proteínas, polisacáridos o alérgenos, entre otros)<sup>5,7,8,10</sup>.

Estas diferencias en la función (biológica) efectora de los distintos isotipos y subclases de Igs hacen que las alteraciones de los niveles séricos de cada Ig se traduzcan en distintos patrones de enfermedad, incluyendo: i) distintos perfiles de susceptibilidad a infecciones por diferentes microorganismos<sup>11–14</sup> y ii) en distintas localizaciones tisulares<sup>5</sup>, iii) diferentes patrones de respuesta patológica frente a Ags propios (e.g. citopenias, autoinmunidad sistémica y tisular)<sup>15,16</sup>, y iv) diferente impacto en la regulación de la respuesta inmune, por ejemplo, ante un estímulo crónico o tras inmunoterapia<sup>17,18</sup>.

**Tabla 1. Características de los isotipos y subclases de Igs.**

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgE
Concentración en suero <sup>a</sup>	40-320	0,7-13	490-1.010	170-785	11-85	3-200	75-330	7-115	<0.03
Vida media en suero (días)	5	3	21	21	7	21	6	6	3
Tamaño de región bisagra (Nº de aminoácidos)	0	64	15	12	62	12	22	9	0
Estructura	Monómero/ Pentámero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero/ Dímero <sup>b</sup>	Monómero/ Dímero <sup>b</sup>	Monómero
Transferencia a través de la placenta	+/- <sup>c</sup>	-	++++	++	++++	+++	+/- <sup>c</sup>	+/- <sup>c</sup>	-
Transferencia a través de la mucosa	++	+	+	+	+	+	++	+++	-
Actividad neutralizadora	+	+?	++	++	++	++	++	++	-
Activación del complemento (vía clásica)	++++	-	++	+	+++	-	-	-	-
Activación del complemento (vía alternativa)	-	-	-	-	-	-	+?	-	-
Capacidad de opsonización	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Unión a receptores FcR	-	-	FcγR I,II,III FcRn	FcγR II FcRn	FcγR I,II,III FcRn	FcγR I,II FcRn	FcαR	FcαR	FcεR I,II
Respuesta a proteínas	+	-	++	+/-	++	+/-	++	+	-
Respuesta a polisacáridos	++	-	+	+++	-	-	+	++	-
Respuesta a alérgenos	-	-	+	-	-	++	-	-	+++

a. Rango de referencia en suero de adultos sanos; concentración expresada en mg/dl.

b. Principalmente en mucosas.

c. Aunque clásicamente se ha considerado que no existiría transporte de IgA e IgM a través de la placenta, actualmente se cree que podría existir cierta capacidad de transferencia placentaria de ambos isotipos de Igs.

FcγR, receptor para el fragmento cristizable de IgG; FcαR, receptor para el fragmento cristizable de IgA; FcεR, receptor para el fragmento cristizable de IgE.

### 1.2.1. IgM

La IgM constituye el primer isotipo de Ig que se produce en respuesta a la estimulación antigénica<sup>1,2,5</sup>. Es la tercera Ig más abundante en suero (5-10% de los niveles globales de Igs séricos) con una concentración de 40-320 mg/dl<sup>4</sup>, y una vida media de ≈4 días<sup>1,19</sup> (Tabla 1). Los Acs de isotipo IgM, además de estar presentes en suero/plasma, se encuentran también en menor concentración en otros fluidos biológicos, como la saliva (0,6-6 mg/dl), la lágrima (0-1,8 mg/dl), el líquido cefalorraquídeo (0-1,3 mg/dl), la leche materna (5-34 mg/dl), el calostro (≈61 mg/dl) y las secreciones bronco-alveolares (≈0,02 mg/dl)<sup>20</sup> e intestinales (≈0,8 mg/dl)<sup>21</sup>. Su

estructura está formada por 4 dominios CH y no posee región bisagra, encontrándose habitualmente en forma de pentámero, con las moléculas de IgM unidas entre sí por la proteína “J”, a través de los dominios CH4<sup>5,22</sup> (Figura 1). Esta estructura pentamérica incrementa la avidéz de los Acs IgM por el Ag (especialmente cuando este último posee varios epítomos), pese a la menor afinidad por Ag de los Acs IgM respecto a otros isotipos de Igs<sup>2,5</sup>. Funcionalmente, los Acs de tipo IgM ejercen funciones efectoras basadas en la opsonización de microorganismos y la activación del complemento por la vía clásica<sup>5,22</sup>, mediante su unión a la proteína del complemento C1q; esta unión únicamente ocurre cuando la Ig está unida al Ag<sup>1,5</sup>, al cambiar su forma de “estrella” pentamérica a la denominada forma de “cangrejo”, en la que los múltiples Fc de las IgM quedan accesibles para unirse a la proteína C1q del sistema del complemento<sup>2</sup>.

### 1.2.2. IgG y subclases de IgG

Cuantitativamente la IgG representa el 85% de las Igs séricas (700-1600 mg/dl), debido a que es el isotipo producido en mayor cantidad por las células plasmáticas (CPs) de médula ósea (MO)<sup>23</sup> y que posee una vida media relativamente elevada (7-21 días)<sup>1,19</sup> (Tabla 1). Por el contrario, la IgG no suele ser el isotipo de Ig más abundante en otros fluidos biológicos. Así, en la saliva (2,6-4,2 mg/dl), en la lágrima (0-1,6 mg/dl) y en la secreción nasal (0,8-30 mg/dl), su concentración es inferior a la de la IgA<sup>21,24</sup>, mientras que en la leche materna (4-17 mg/dl), el calostro ( $\approx$ 10 mg/dl) y el fluido derivado de la secreción intestinal ( $\approx$ 0,4 mg/dl) su concentración es también inferior a la concentración de IgM<sup>21</sup>. Las únicas excepciones serían el fluido bronco-alveolar ( $\approx$ 0,4 mg/dl)<sup>20</sup> y el líquido cefalorraquídeo (0-5,5 mg/dl)<sup>24</sup>, donde los niveles de IgG son similares a los de la IgA y superiores a los de los demás isotipos de Igs, respectivamente.

En total, existen 4 subclases de IgG: IgG1-4. Desde el punto de vista estructural, cada una de las cadenas pesadas de las distintas subclases de IgG contienen un dominio variable y 3 dominios constantes, con una región bisagra de distinta longitud según la subclase de IgG; todas

las subclases de IgG están presentes de forma sistemática en los distintos fluidos corporales en forma de monómero (Figura 1).

Funcionalmente, los Acs de isotipo IgG pueden actuar de forma directa: i) activando la vía clásica del complemento; ii) neutralizando toxinas, microorganismos patógenos y otros Ags; iii) mediante la opsonización de Ag para su fagocitosis por células del sistema monocito-macrófago y los neutrófilos; y iv) promoviendo la degranulación y activación de células NK<sup>1,5,7,8</sup>. Estas dos últimas funciones son mediadas a través de la unión de la IgG unida a Ag, a los receptores para el Fc de IgG (FcγR) de alta (FcγRI o CD64), intermedia (FcγRII o CD32) y baja (FcγRIII o CD16) afinidad<sup>8,25</sup>. Además de por su grado de afinidad por la IgG, los FcγR se diferencian entre sí por su perfil de expresión celular. Así, CD32 se expresa en la mayoría de leucocitos incluyendo los linfocitos B, CD64 se expresa de forma constitutiva únicamente en los monocitos, macrófagos y granulocitos neutrófilos, y la expresión de CD16 está restringida a los granulocitos neutrófilos, una fracción de los monocitos y las células NK<sup>1,5-8</sup>. Cabe señalar que todas las subclases de IgG tienen capacidad de unirse también al FcRn, expresado en células epiteliales y células fagocíticas, y que es responsable del paso de la IgG a través de la placenta a la circulación fetal, y a través de las superficies mucosas a las secreciones externas<sup>5,8</sup>.

A pesar de que los Acs de isotipo IgG de distintas subclases presentan una homología estructural >90%, existen diferencias en los dominios funcionales, como la región bisagra y/o las zonas de unión a la proteína C1q y a los FcγR localizadas en CH2, que, además de contribuir a diferenciarlas, les confieren distintas funciones<sup>5,7,8</sup>.

**IgG1.** La IgG1 constituye la subclase de IgG mayoritaria en suero (60-75% de la IgG total; 400-1.100 mg/dl en adultos sanos)<sup>5,6,23</sup> con una vida media de aproximadamente 21 días<sup>1,8</sup>. En otros fluidos biológicos esta subclase de IgG se encuentra menos representada respecto al conjunto de las IgG, representando ≈47% del total de Acs IgG en la leche materna, ≈46% en el calostro, ≈30% en saliva<sup>26</sup> y ≈52% en líquido cefalorraquídeo<sup>27</sup>. La IgG1 posee una región bisagra de 15 aminoácidos que le proporciona gran flexibilidad<sup>8</sup>. Tiene además una alta capacidad para



ser transferida a la circulación fetal a través de la placenta, de activar el complemento y de unirse a todos los tipos de FcγR<sup>1,2</sup>. Los Acs de tipo IgG1 se producen principalmente en respuesta a Ags proteicos (bacterianos y víricos), y en menor medida también, en respuesta a alérgenos y polisacáridos<sup>8</sup>. Además, con relativa frecuencia, los Acs producidos frente a Ags propios (auto-Acs), son también de tipo IgG1<sup>16</sup>.

IgG2. La IgG2 es la segunda subclase de IgG más representada en suero (20-25% de toda la IgG; 170-785 mg/dl en adultos sanos)<sup>2,4</sup> con una vida media de 21 días, similar a la de la IgG1<sup>1,5,8</sup>. En otros fluidos biológicos podemos encontrar niveles de IgG2 similares (o incluso superiores) a los niveles de IgG1, representando ≈43% de todos los Acs IgG en la leche materna y el calostro, ≈51% en saliva<sup>26</sup> y ≈37% en líquido cefalorraquídeo<sup>27</sup>. Su región bisagra está compuesta únicamente por 12 aminoácidos, lo que junto a la presencia de una hélice de poliprolinas, le hace mucho menos flexible que las demás subclases de IgG<sup>8</sup>. La capacidad de los Acs de tipo IgG2 de transferencia placentaria y de activar complemento es significativamente inferior a la de IgG1<sup>8</sup>; además, la IgG2 solamente es capaz de unirse a algunas isoformas de FcγRII y siempre de forma más débil que la IgG1<sup>5,8</sup>. Desde el punto de vista funcional, la IgG2 tiene un papel clave en la respuesta inmune humoral frente a Ags polisacáridicos de origen bacteriano<sup>4,8</sup>.

IgG3. La IgG3 supone únicamente el 5-10% de toda la IgG presente en suero (11-85 mg/dl en adultos)<sup>2,4</sup>, donde tiene una vida media de 7 días, significativamente menor a la de las demás subclases de IgG<sup>4,8</sup>. Además, esta subclase de IgG no se detecta en otros fluidos corporales como la leche materna, el calostro y la saliva<sup>26</sup>, estando presente en líquido cefalorraquídeo en niveles relativamente muy bajos (≈7% de toda la IgG)<sup>27</sup>. Debido a que se trata de una Ig capaz de generar una potente respuesta pro-inflamatoria, su baja vida media probablemente responda a la necesidad de limitar respuestas inflamatorias excesivas<sup>8</sup>. La región bisagra de la IgG3 es más extensa que la de otras subclases de IgG (62 aminoácidos), lo que le proporciona una gran flexibilidad para unirse a epítomos de distintos Ags. Sin embargo, esto va

asociado también a un mayor peso molecular y una mayor susceptibilidad a la rotura por enzimas proteolíticas, posible responsable último de su corta vida media en suero<sup>8</sup>. Los Acs de tipo IgG3 tienen una elevada capacidad para atravesar la placenta, activar el complemento y unirse a todos los FcγR, superando la capacidad funcional de la IgG1<sup>4,8</sup>. Al igual que ocurre con la IgG1, la producción de IgG3 se induce principalmente en respuesta a Ags proteicos (bacterianos y víricos), detectándose en suero en el curso de una infección antes que la IgG1<sup>8</sup>; con relativa frecuencia esta subclase de IgG está también involucrada en autoinmunidad<sup>16</sup>.

**IgG4.** IgG4 es la subclase de IgG minoritaria en suero (<5% de la IgG total, 3-200 mg/dl en suero de adultos)<sup>2,4</sup>, donde presenta una vida media de 21 días<sup>4,8</sup>. Además, está presente en pequeñas concentraciones en la leche materna (≈6% de la IgG total), el calostro (≈6%), la saliva (≈3,7%)<sup>26</sup> y el líquido cefalorraquídeo (≈4%)<sup>27</sup>. Su región bisagra es de pequeño tamaño (similar al de la IgG2) con solo 12 aminoácidos, pero una flexibilidad intermedia entre la de la IgG1 y la de la IgG2<sup>8</sup>. A pesar de no ser capaz de activar complemento, los Acs de tipo IgG4 pueden unirse a los FcγRI y II, aunque de forma más débil que la IgG1 e IgG3. A diferencia de las demás subclases de IgG, la IgG4 suele producirse en respuesta a exposiciones repetidas (o de larga duración) a Ag, como por ejemplo, en individuos alérgicos bajo tratamiento con inmunoterapia alérgeno-específica<sup>28</sup>. Esto, unido a su baja efectividad para llevar a cabo una respuesta efectora, ha inducido a algunos autores a sugerir que esta subclase de IgG pueda tener una función tolerogénica, privando del Ag a otros Acs pro-inflamatorios mucho más potentes<sup>28</sup>.

### **1.2.3. IgA y subclases de IgA**

Aunque la concentración de IgA en suero es inferior a la de IgG (7-15% del total de las Igs; 100-400 mg/dl), la IgA es la Ig predominante en las secreciones externas (Tabla 1)<sup>5,21,29,30</sup>. Así, su concentración en lágrima (8-40 mg/dl), saliva (10-21 mg/dl), leche materna (47-163 mg/dl), calostro (1.234-5.380 mg/dl) y las secreciones intestinales (≈17mg/dl) y nasales (7-85 mg/dl), es muy superior a la de los demás isotipos de Igs<sup>21</sup>. Por el contrario, su concentración en el líquido

cefalorraquídeo es menor que la de IgG e IgM, y prácticamente indetectable (0-0,06 mg/dl). A pesar de que la vida media de los Acs de isotipo IgA es relativamente corta (6 días)<sup>4</sup>, la elevada producción de IgA en las mucosas le confiere un papel clave en la prevención de infecciones gastrointestinales y respiratorias<sup>29,31</sup>. En suero, la IgA suele estar en su mayor parte (≈85%) en forma monomérica<sup>32</sup>, mientras que en las secreciones externas el 50-96% de los Acs de tipo IgA están en forma de dímero (e incluso en ocasiones formando trímeros y/o tetrámeros<sup>5,30</sup>) gracias a la unión de dos (o más) moléculas IgA a la cadena “J” a través de sus dominios CH3<sup>29-31</sup>. La IgA dimerica es capaz de unirse al pIgR que se expresa en la superficie basolateral de las células epiteliales de las membranas mucosas, a través de uno de sus dos dominios CH2; mediante una vacuola de endocitosis, la IgA es transportada hasta la superficie apical de dichas células epiteliales. Posteriormente, el dímero de IgA se separa del pIgR; no obstante, en esta separación quedará unido a la IgA un fragmento (polipéptido) de dicho receptor llamado fragmento secretor, que pasará a formar parte de la IgA secretada<sup>2,29,30,33</sup>.

La principal función de la IgA es la neutralización directa de microorganismos patógenos (virus, bacterias y parásitos) y de sus productos (toxinas) antes de que entren al organismo<sup>34</sup>; además, la IgA desarrolla un importante papel en la regulación de las bacterias comensales presentes en el intestino<sup>34,35</sup>. Así mismo, se ha sugerido que la IgA podría desarrollar otras funciones relacionadas con la activación de la respuesta mediada por su unión al receptor FcαR (CD89)<sup>29,36</sup>, y/o la activación del complemento por la vía alternativa<sup>3,6,37,38</sup>; sin embargo, hasta el momento, no se han podido confirmar estas funciones de la IgA de forma definitiva<sup>1,30</sup>. Existen dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2.

IgA1. La IgA1 constituye la subclase de IgA mayoritaria, tanto en suero (85-90% del total de la IgA; 75-330 mg/dl en adultos)<sup>5,39</sup> como en secreciones externas, representando ≈59% de la IgA total en lágrima, ≈63% en saliva, 52%-65% en leche y ≈70% en secreciones intestinales<sup>21</sup>. Estructuralmente, la IgA1 se caracteriza por presentar una región bisagra extendida, que le permite unirse simultáneamente a dos Acs relativamente separados en el espacio<sup>33,34</sup>. Sin

embargo, esta característica también hace que la IgA1 sea mucho más vulnerable a ser degradada por enzimas proteolíticas de los propios patógenos<sup>29,30</sup>. Aunque se detectan Acs de tipo IgA1 en respuesta a Ags polisacáridicos, esta subclase de Ig se produce predominantemente frente a Ags proteicos<sup>40,41</sup>.

IgA2. Esta subclase de IgA se encuentra mayoritariamente en las secreciones mucosas, aunque también está presente en suero (10-15% de la IgA sérica; 7-115 mg/dl)<sup>5,30,39</sup>. A diferencia de la IgA1 contiene una pequeña región bisagra, que le permite ser más resistente frente a proteasas bacterianas<sup>5,29,33,35</sup>; esto contribuye a explicar su mayor representación en las secreciones mucosas: ≈41% de la IgA presente en lágrima, ≈37% en saliva, entre 35% y 48% en leche materna y ≈30% en secreciones intestinales<sup>5,21,35</sup>. Al contrario de la IgA1, la IgA2 predomina en la respuesta inmune frente a polisacáridos, aunque puede producirse también en respuesta a Ags proteicos<sup>40,41</sup>.

#### **1.2.4. IgD**

La IgD únicamente representa ≈0,3% del conjunto de todas las Igs séricas (0,7-13 mg/dl en adultos) con una vida media corta, de alrededor de 6 días<sup>4,42</sup>, probablemente relacionada con el tamaño relativamente grande de su región bisagra (64 aminoácidos) que provoca una mayor sensibilidad a la proteólisis<sup>5,19,43</sup> (Tabla 1); además, los Acs de tipo IgD también están presentes en saliva (0,0005-0,06 mg/dl) y secreciones nasales (0,003-0,712 mg/dl)<sup>44</sup>. Actualmente, seguimos sin conocer cuál es el verdadero papel funcional de la IgD, aunque de acuerdo con los síntomas que presentan pacientes con síndrome hiper-IgD, se ha sugerido que los Acs de tipo IgD podrían favorecer la liberación de mediadores proinflamatorios<sup>45</sup>. La ausencia de un papel funcional bien definido y de un receptor específico para la IgD<sup>35,46</sup>, también han llevado a sugerir que esta Ig (por su capacidad para unirse y neutralizar a bacterias patógenas como *M. catarrhalis* y *H. influenzae* y a sus factores virulentos) podría proteger la mucosa respiratoria<sup>45,47</sup>. Este desconocimiento sobre el verdadero papel funcional de la IgD hace que hoy por hoy en la clínica,

no se determinen sus niveles séricos de forma rutinaria, lo cual a su vez dificulta el avance en el conocimiento de su posible función.

### 1.2.5. IgE

La IgE se encuentra presente en cantidades extremadamente bajas en suero (0,02% del conjunto de las Igs séricas; <0.03 mg/dl en adultos sin patología alérgica)<sup>19</sup> con una vida media corta de 3 días<sup>4,19</sup> (Tabla 1). En términos generales, la IgE tan solo se identifica en mucosas y otros fluidos de pacientes alérgicos<sup>48</sup>. Estructuralmente, posee tres dominios constantes, en ausencia de zona bisagra<sup>49</sup>. A pesar de su baja concentración, la IgE muestra gran actividad en reacciones de hipersensibilidad, así como en la respuesta inmune frente a parásitos<sup>5</sup>. La IgE puede unirse a su receptor de alta afinidad (FcεRI) expresado de forma constitutiva en mastocitos y basófilos, y en eosinófilos activados. Así, cuando se produce el reconocimiento antigénico por parte de Acs IgE presentes en la superficie de estas células, se produce su degranulación con la liberación de múltiples y diversos factores pro-inflamatorios (TNFα, histamina, prostaglandinas y leucotrienos, entre otros)<sup>50</sup> responsables de los síntomas característicos de la alergia de tipo I, estimulando además la expresión de más FcεRI en la célula diana<sup>5</sup>. Además de FcεRI, existe otro receptor de IgE de baja afinidad (FcεRII o CD23) con dos isoformas y una función en gran medida desconocida aún: i) CD23a expresado de forma constitutiva en linfocitos B naïve, y ii) CD23b expresado en monocitos, eosinófilos, plaquetas y células dendríticas<sup>49</sup>.

## 2. Origen, características funcionales e inmunofenotipo de los linfocitos B

Los linfocitos B son las células del sistema inmune adaptativo responsables de la producción de Igs en respuesta a estímulos antigénicos<sup>51</sup>. Dentro del conjunto de todas las células B, habitualmente se diferencian distintos estadios madurativos y subpoblaciones

funcionales, que corresponden a dos fases de maduración bien diferenciadas: i) la maduración B independiente de Ag, que se produce fundamentalmente en MO<sup>52,53</sup>; y ii) la maduración B dependiente de Ag, que ocurre predominantemente en los órganos linfoides secundarios (OLS), incluidos los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT; del inglés, *mucosa-associated lymphoid tissue*)<sup>54</sup>.

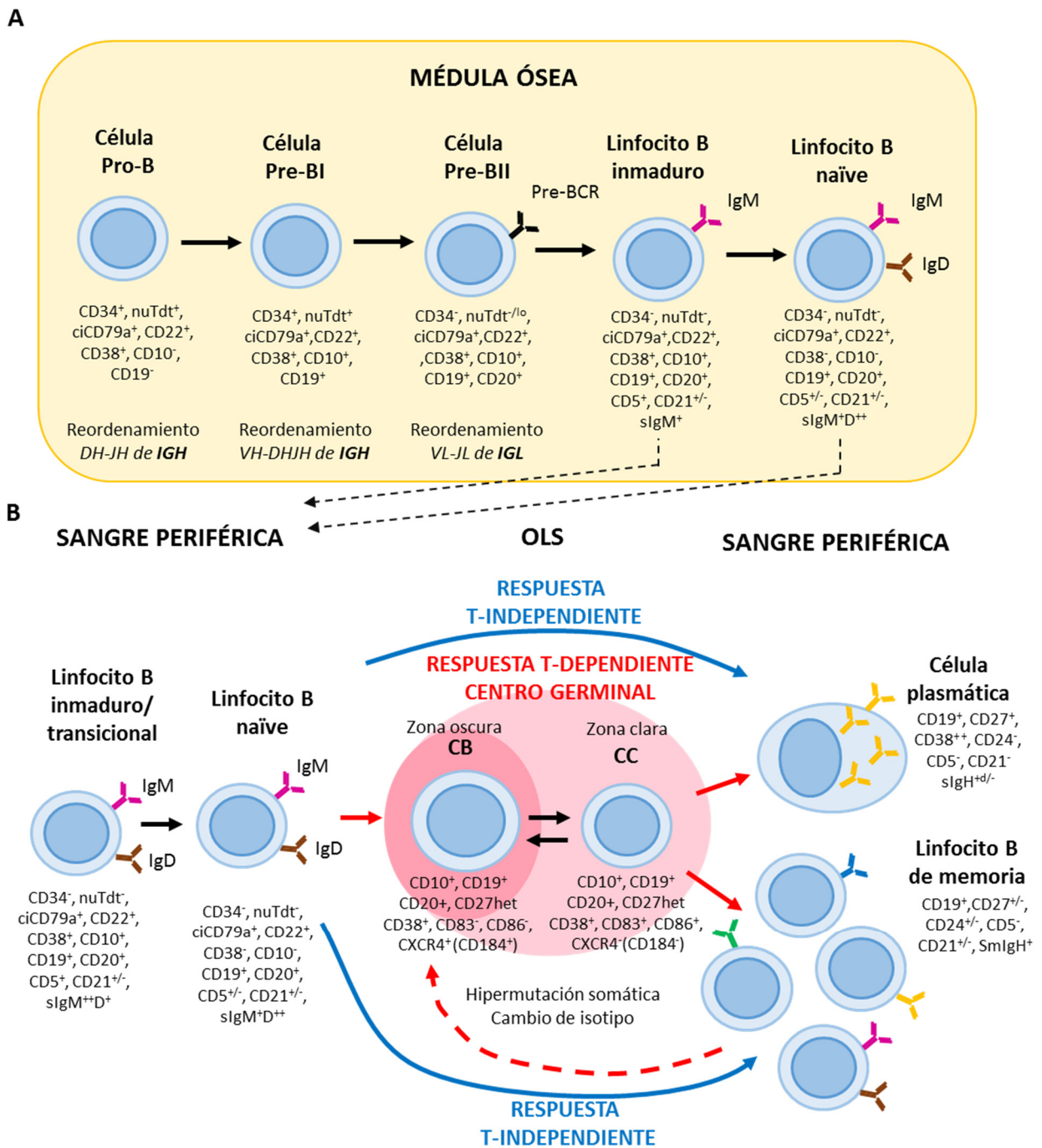
## 2.1. Maduración B independiente de antígeno

Tras el nacimiento, la maduración B independiente de Ag tiene lugar en la MO. Su objetivo es producir linfocitos B inmunocompetentes, es decir, capaces de reconocer y responder frente a Ags extraños, y al mismo tiempo, ser autotolerantes (i.e. linfocitos B naïve). Durante este proceso de maduración de los linfocitos B en MO<sup>2,55</sup> se producirá el reordenamiento de los segmentos génicos que forman el dominio variable (*VH*, *DH* y *JH*) del gen *IGH* que codifica para la cadena pesada de Ig, y de los segmentos del dominio variable (*VL* y *JL*) del gen *IGL* que codifica para la cadena ligera de la Ig. Este proceso de recombinación somática V(D)J de *IGH* y VJ de *IGL*, genera una elevada diversidad de repertorio de Igs expresadas por el conjunto de los linfocitos B naïve producidos, con  $\approx 10^{14}$  versiones diferentes del BCR<sup>56</sup>.

Actualmente se definen 5 estadios madurativos principales en la maduración de los precursores B de MO, en función de su fenotipo y del estado del reordenamiento de los genes *IGH* e *IGL*: i) célula pro-B, ii) pre-BI, y iii) pre-BII, iv) linfocito B inmaduro y v) linfocito B naïve (Figura 2A). La célula **pro-B** se origina a partir de un precursor linfoide común B y T/NK<sup>57,58</sup> por la inducción de la expresión de los factores de transcripción E2A, EBF, y Pax5<sup>1,57</sup>. Mediante la acción de estos factores de transcripción, la célula **Pro-B** pone en marcha la síntesis de las proteínas y enzimas responsables del reordenamiento de los genes de *IG* (e.g. TdT y rag1/rag2, entre otras proteínas) y se pone en marcha el reordenamiento de los genes *IGH*. Este comienza por el reordenamiento de los segmentos *DH* y *JH* de la cadena pesada<sup>56,59,60</sup>. Fenotípicamente, las células pro-B mantienen la expresión de marcadores de célula precursora hematopoyética (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>),

aunque muestran ya positividad para las primeras proteínas características del precursor linfoide comprometido a línea B (Tdt nuclear –nuTdt–, CD22 y CD79a citoplasmático –ciCD79a–), en ausencia aún del marcador pan-B CD19<sup>59</sup>. En la etapa madurativa siguiente, la célula **pre-BI** ya expresa CD19 junto con CD34, CD22, CD38, nuTdt y ciCD79a; además, en ella se produce el reordenamiento entre el segmento *VH* y el segmento *DH-JH* ya reordenado, completándose así el reordenamiento de la región variable del gen *IGH*<sup>59</sup>. Una vez reordenado el gen *IGH*, el precursor **pre-BII** expresa en su superficie el pre-BCR, formado por la cadena pesada Igμ, y las cadenas ligeras subrogadas VpreB (CD179a) y λ5 (CD179b), junto a los correceptores Igα/Igβ (CD79a/CD79b)<sup>53,56,61</sup>. La señalización a través del pre-BCR activa la proliferación del precursor B y pone en marcha el reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras de Ig<sup>1,56,62</sup>, eliminándose en esta etapa los precursores B que no han sido capaces de generar un reordenamiento *IGH* funcional (selección positiva); en paralelo, la señalización vía pre-BCR bloquea el reordenamiento del segundo alelo de *IGH*, evitando la expresión en la misma célula, de dos Igs con distinta especificidad (exclusión alélica)<sup>56</sup>. Las células pre-BII pierden expresión de nuTdt y CD34<sup>63,64</sup>, pero mantienen positividad para CD10, CD19, CD22, y CD38<sup>++</sup>, con expresión heterogénea de CD20<sup>+/+</sup>. Una vez se haya realizado el reordenamiento funcional de los genes de la cadena ligera, el **linfocito B inmaduro/transicional** expresa un BCR con una IgM completa, al reemplazarse las cadenas subrogadas por las cadenas ligeras reordenadas. Junto con el BCR, estas células tienen expresión homogénea e intensa de CD20 y CD38, junto a positividad para CD5 y CD24, expresión débil de CD10 y reactividad variable para CD21<sup>53,63–65</sup>. Estos linfocitos B inmaduros son expuestos a Ags propios con el fin de eliminar por apoptosis, o de inducir anergia, en aquellas células que presenten un BCR autorreactivo (selección negativa), dándoles también la posibilidad de reordenar de nuevo los genes de cadena ligera (edición del receptor)<sup>61,66–68</sup>. Tras pasar esta fase de “selección negativa”, el linfocito B inmaduro se diferencia a **linfocito B naïve** inmunocompetente y autotolerante, con fenotipo CD5<sup>+/-</sup> CD10<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>++</sup> CD22<sup>+</sup> CD24<sup>+d</sup> CD38<sup>-/lo</sup> IgM<sup>+D</sup><sup>++</sup> <sup>63,64</sup>.

Figura 2. Representación esquemática de la maduración B antígeno-independiente (A) y antígeno-dependiente (B).



(A) La maduración independiente de Ag tiene lugar en MO, distinguiéndose 5 estadios principales que se diferencian en el estado de reordenamiento de los genes de cadena pesada y cadena ligera de la Ig, así como en la expresión de distintas proteínas (inmunofenotipo). (B) La maduración dependiente de Ag tiene lugar en los OLS cuando el linfocito B naïve reconoce a su Ag de forma específica, y puede ser T-dependiente, con la formación de centros germinales, o T-independiente. Ambos procesos dan como resultado la formación de células efectoras (linfocitos B de memoria y CPs). Las CPs emigran a MO y las mucosas donde producirán Acs de distinto isotipo y subclase, mientras que los linfocitos B de memoria podrían realizar uno o varios ciclos de respuesta en el centro germinal dando lugar a nuevas CPs y linfocitos B de memoria. CC, centrocito; CB, centroblasto; OLS, órgano linfoide secundario; ci, citoplasmático; nu, nuclear.



## 2.2. Maduración B dependiente de antígeno

La maduración del linfocito B dependiente de Ag se produce en respuesta a un Ag específico, con el objetivo de generar: i) **CPs** productoras de Acs<sup>19,69</sup>; y ii) **linfocitos B de memoria** responsables de la respuesta secundaria en sucesivos encuentros con el Ag<sup>70,71</sup>(Figura 2A).

### 2.2.1. Respuesta B dependiente de linfocitos T

La mayoría de linfocitos B que abandonan la MO presentan un fenotipo naïve, aunque una pequeña fracción tienen características de célula inmadura/transicional<sup>53,65,72</sup>. Los linfocitos B naïve recirculan a través de la SP y los OLS, y se activan tras el reconocimiento del Ag –bien en forma soluble o bien retenido por las células dendríticas foliculares (CDFs)–, o mueren por apoptosis al cabo de unas semanas<sup>53</sup>.

El reconocimiento del Ag a través de BCR genera una cascada de señales que inducen la activación del linfocito B naïve<sup>73,74</sup>. Junto con el BCR, el linfocito B naïve expresa otros receptores que contribuyen a amplificar o a inhibir la señal derivada de la unión BCR-Ag, facilitando que se alcance una intensidad superior al umbral de respuesta requerido. Estos receptores incluyen el correceptor activador de célula B CD19-CD21-CD81-CD225, capaz de unirse a inmunocomplejos de C3d/Ag, además de CD20 y CD45<sup>73-77</sup> o las moléculas inhibitoras CD5 y CD22<sup>78-80</sup>. Una vez activado, el linfocito B interactúa con linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores foliculares (linfocitos TFH; del inglés, *follicular helper T-cells*) que le proporcionan las señales adicionales responsables de inducir su proliferación masiva y maduración funcional. En esta interacción B-T participan de forma activa las moléculas membrana CD80/CD86-CD28, CD40-CD40L, ICOSL-ICOS, HLA-TCR y CD27-CD70, además de citocinas secretadas en forma soluble por parte del linfocito T como la IL-2, la IL-4 y la IL-21<sup>54,81</sup>. Para una adecuada interacción B-T, se requiere la formación de una estructura altamente especializada –el centro germinal (CG)– en el OLS donde ocurre la respuesta<sup>54,82-85</sup>. Desde hace tiempo, se conoce la existencia de dos zonas bien diferenciadas en

el CG: la zona oscura y la zona clara<sup>54,84,85</sup>. En la zona oscura del CG se encuentran las células B en proliferación, denominadas **centroblastos** (CBs), con fenotipo CD10<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>het</sup> CD38<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup> CD83<sup>-</sup> CD86<sup>-</sup> y CXCR4 (CD184)<sup>+</sup><sup>84-86</sup>; al proliferar, estos CBs sufren mutaciones aleatorias en la secuencia de los genes *VH* (hipermutación somática; HMS), inducidas por la enzima AID (deaminasa de citidina inducida por activación; del inglés, *activation-induced cytidine deaminase*), que en última instancia van a modificar la afinidad de su BCR por el Ag. Así, tras varias rondas de proliferación-HMS, estas células pasan desde la zona oscura a la zona clara del CG, donde adquieren la forma de células pequeñas (centrocitos; CCs) que siguen expresando CD10<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>het</sup> CD38<sup>+</sup> y CD44<sup>lo</sup>, ahora en ausencia de positividad por CXCR4 (CD184) y siendo CD83<sup>+</sup> y CD86<sup>+84-86</sup> (Figura 2B). El CC interactuará nuevamente con el Ag retenido en la superficie de las CDFs, seleccionándose positivamente aquellos CCs que lo hayan hecho y por lo tanto, que hayan ganado afinidad por el Ag como consecuencia de la HMS (maduración de afinidad)<sup>87</sup>. Tras este proceso, se estima que 10-30% de los CCs volverán a la zona oscura para realizar nuevas rondas de HMS, mientras que los demás CCs morirán por apoptosis al no lograr reconocer de nuevo al Ag.

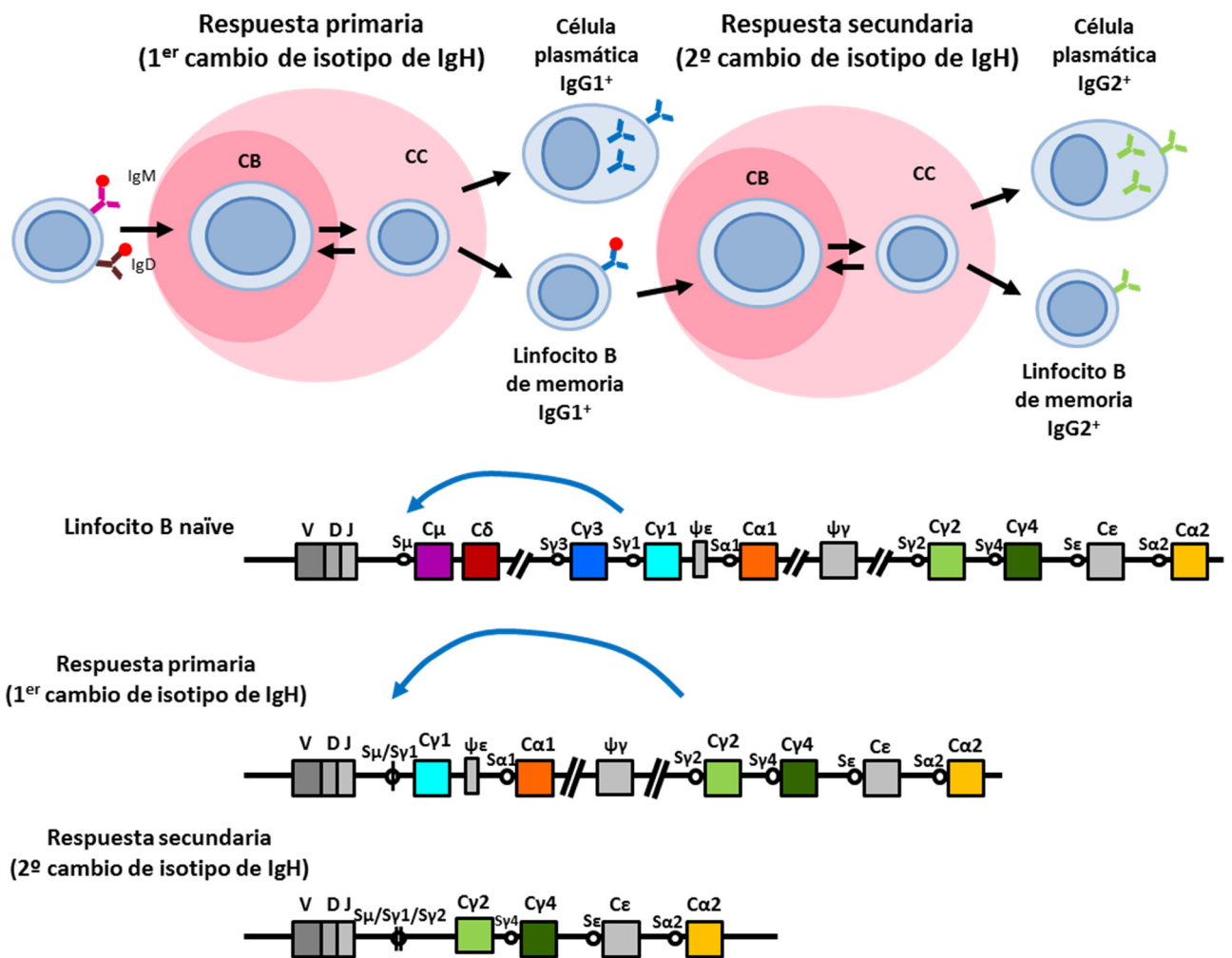
Tras esta respuesta B frente a Ag (por inmunización o infección), parte de las células B IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> activadas, cambiarán el isotipo de la IgH que producen. El nuevo isotipo de IgH puede ser una subclase de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), de IgA (IgA1 o IgA2) o IgE. Este cambio de isotipo modifica la función efectora de la Ig que será producida por la futura CP, sin alterar su especificidad, traduciéndose habitualmente en una mejora de la capacidad de los futuros Acs para eliminar el patógeno que ha desencadenado la respuesta B<sup>102</sup>.

El cambio de isotipo se produce por la unión de la región V(D)J del gen de la cadena pesada con un segmento C distinto de C $\mu$  (y de C $\delta$ ) situado distalmente a nivel del gen *IGHC*, eliminándose del ADN correspondiente a dicho gen, los segmentos intermedios (Figura 3). En este proceso juegan un papel fundamental las enzimas AID, UNG (N-glicosilasa de uracilos; del inglés, *uracil-N-glycosylase*) y APE (endonucleasaapurínica/apirimidínica; del inglés, *apurinic*

*apyrimidinic/endonuclease*). Cada región CH del gen *IGH* (excepto C $\delta$ ) está precedida de secuencias repetitivas ricas en citosina denominadas regiones S (de cambio de isotipo de Ig; del inglés, *Ig class-switch*). La enzima AID, cuya transcripción es inducida por NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas; del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), cambia citosinas por uracilos en estas regiones S de los dominios CH involucrados en el reordenamiento *IGHC*<sup>88-90</sup>. A su vez, los uracilos, al no ser nucleótidos característicos del ADN humano, son eliminados por la proteína UNG, lo cual implica la generación de sitios abásicos (sin nucleótido), provocando que las enzimas APE1/2 generen rupturas en la secuencia del ADN. Una vez se han generado estas rupturas en el ADN de las regiones S de los dos segmentos CH implicados en el reordenamiento, se produce la recombinación del ADN de estas regiones S mediante la acción de las proteínas implicadas en la reparación del ADN mediante mecanismos de recombinación no homóloga *NHEJ* (unión de extremos no homólogos de ADN; del inglés, *non-homologous and end joining*), eliminándose círculos de ADN que contienen los segmentos eliminados de la secuencia inicial de ADN, situados entre ambas regiones S (e.g. C $\mu$  y C $\delta$  si se expresa la siguiente región del gen *IGHC*, C $\gamma$ 3)<sup>88,89</sup>. El isotipo final de Ig producido por una célula B que ha llevado a cabo el cambio de isotipo, depende de factores del microambiente en el que se reconozca el Ag y, en cierta medida también, del propio Ag. Así, las citocinas producidas por los linfocitos TFH tienen un papel clave a la hora de determinar el isotipo de Ig que producirán los linfocitos B activados. En este sentido, la producción de IL-10 se ha asociado con los isotipos IgG1 e IgG3<sup>91</sup>, TGF- $\beta$  con IgA<sup>92</sup> y la IL-13 con la producción de IgG4/IgE<sup>93</sup>. Recientemente, se ha propuesto que los isotipos de Igs podrían producirse (al menos en parte) de forma consecutiva, siguiendo la secuencia en la que se encuentran codificados en el gen *IGHC*<sup>94-98</sup> (Figura 3). Así, se ha observado la existencia de una mayor tasa de HMS en los isotipos que se encuentran codificados por los segmentos de ADN localizados al final del gen *IGHC*<sup>96,97</sup>, sugiriendo que estas células habrían pasado por un mayor número de rondas de reconocimiento de Ag en el CG. En este mismo sentido, un estudio reciente

ha demostrado que en las regiones de unión  $S\mu$ - $Sy2$  del 24% de las células B con cambio de isotipo a IgG2 se observaban remanentes de secuencias  $Sy1$ ,  $Sy3$  y  $S\alpha1$ , mientras que en el 9% de las que presentaban isotipo IgG1, las regiones de unión  $S\mu$ - $Sy1$  tenían remanentes de reordenamiento  $S\mu$ - $Sy3$ , confirmando la existencia de dos o más cambios de isotipo consecutivos en la misma célula B.

**Figura 3. Modelo hipotético que explica el cambio consecutivo de isotipo de Ig en células B activadas.**



Tras el reconocimiento antigénico, el linfocito B naïve  $IgM^+D^{++}$  pueden realizar el cambio de isotipo de Ig, normalmente a isotipos que se encuentran más cercanos a la región V(D)J (e.g. a IgG3 o IgG1), en paralelo con los procesos de HMS y diferenciación a linfocito B de memoria y CP (respuesta primaria, primer cambio de isotipo). Si las células B de memoria vuelven a entrar en contacto con ese mismo Ag, podrían volver a sufrir un segundo cambio de isotipo a un isotipo que se encuentre más alejado de V(D)J (e.g. a IgG2).

En un principio se sugirió que este modelo de reordenamiento con cambio a > 1 isotipo tendría lugar únicamente en el curso de una misma respuesta a Ag<sup>95,96</sup>. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el modelo secuencial podría ocurrir también, en respuestas posteriores, tras sucesivos encuentros con un mismo Ag, a lo largo de la vida<sup>97,98</sup>.

En paralelo con estos cambios en el gen *IGH*, se producen cambios fenotípicos y funcionales en la célula B, característicos de la diferenciación a CP productora de Acs o a linfocito B de memoria, células que pasarán de nuevo a la circulación sanguínea<sup>53</sup>. La mayoría de las CPs generadas en respuesta a Ag y que pasarán a SP, se eliminarán por apoptosis pasados unos días<sup>99</sup>. Sin embargo, una minoría es capaz de instalarse en nichos que inducen su supervivencia, principalmente en MO y MALT, donde a través de factores de supervivencia se convierten en CPs de vida larga<sup>69,100-103</sup> capaces de producir y secretar al exterior varios miles de moléculas de Igs por segundo<sup>19</sup>. Las células B de memoria permanecen durante más tiempo (incluso varias décadas)<sup>104,105</sup> recirculando entre la SP y los OLS<sup>70</sup>, de forma que si se encuentran de nuevo con su Ag, podrían sufrir un nuevo ciclo de proliferación en el CG con HMS y cambio de isotipo, con diferenciación a CP y/o a una nueva célula B de memoria<sup>106</sup>.

### **2.2.2. Respuesta B independiente de linfocitos T**

Aunque la señal inducida por la mayoría de los Ags es insuficiente para desencadenar por sí sola una respuesta B, algunos Ags producen una estimulación lo suficientemente potente para que el linfocito B responda, en ausencia de colaboración por parte de los linfocitos T<sup>106</sup>. Por un lado, estas respuestas independientes de células T pueden estar mediadas por receptores diferentes de BCR presentes en los linfocitos B, como es el caso de los receptores TLR (receptores tipo Toll; del inglés, *Toll-like receptor*) o NLR (receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos; del inglés, *nucleotide-oligomerization domain-like receptor*) capaces de unirse a diferentes componentes de microorganismos, como por ejemplo, el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas y los ácidos nucleicos de origen vírico o bacteriano (respuesta B

independiente de células T tipo 1)<sup>107,108</sup>. Por otra parte, la respuesta B puede llevarse a cabo también a través de BCR de forma independiente de linfocitos T, cuando el linfocito B reconoce Ags que presentan varias copias de un mismo epítipo (Ag multivalente); esto ocurre con algunos Ags repetitivos de la pared de bacterias encapsuladas, o cuando un Ag está presente en concentraciones elevadas en el entorno del linfocito B capaz de reconocerle, permitiendo la interacción simultánea del Ag con múltiples moléculas de BCR en el mismo linfocito B (respuesta independiente de células T de tipo 2)<sup>107,108</sup>. En la Tabla 2 se resumen las características principales de los tres tipos de respuesta B, dependiente de linfocitos T e independiente de linfocitos T tipo 1 y 2.

**Tabla 2. Características principales de las respuestas de linfocitos B dependientes e independientes de linfocitos T**

Características	Tipo de respuesta B		
	Dependiente de linfocitos T	Independiente de linfocitos T tipo 1	Independiente de linfocitos T tipo 2
<b>Tipo de receptor</b>	BCR	No BCR (e.g. TLR, NLR, CD21)	BCR
<b>Tipo de estímulo</b>	Ags comunes (e.g. proteínas)	Lipopolisacárido bacteriano o virus de Epstein-Barr	Ags repetitivos (e.g. pared de bacterias encapsuladas) o en alta concentración
<b>Naturaleza de la respuesta</b>	Monoclonal	Policlonal	Monoclonal
<b>Cambio de isotipo de Ig</b>	Si	Minoritario	Minoritario
<b>Maduración de afinidad</b>	Si	No	No
<b>Generación de Memoria</b>	Si	Minoritaria	Minoritaria

Ag, antígeno; BCR, receptor de célula B; TLR, receptor tipo toll; NLR: receptor tipo dominio de oligomerización de nucleótidos.

Clásicamente, la activación de linfocitos B independiente de células T se ha relacionado con la generación de CPs productoras de Igs de baja afinidad y de tipo IgM y, en menor medida también de otros isotipos, con frecuencia poliespecíficas (solo en el caso de respuestas T-independientes de tipo 1), sin que dicha respuesta conlleve producción de células B de memoria

específicas de Ag<sup>106,109</sup>. No obstante, cabe señalar que se han identificado linfocitos B con cambio de isotipo y menor frecuencia de HMS, en pacientes con defectos en la señalización mediada por CD40-CD40L, lo cual sugiere que podrían existir linfocitos B de memoria T-independientes<sup>110,111</sup>, tal como se discute más adelante en esta introducción (capítulos 2.3 y 4.3).

### 2.3. Poblaciones de linfocitos B circulantes en sangre

El desarrollo tecnológico ocurrido en las últimas décadas, especialmente en el campo de la citometría de flujo, ha permitido aumentar nuestro conocimiento acerca de las poblaciones de linfocitos B circulantes en la sangre humana<sup>53,112</sup>. Así, en términos generales, en SP podemos identificar 4 subpoblaciones mayoritarias de linfocitos B de acuerdo a su estadio madurativo: linfocitos B inmaduros/transicionales, linfocitos B naïve, linfocitos B de memoria y CPs; todos ellos comparten como característica fenotípica común la expresión del marcador pan-B CD19. De acuerdo con lo comentado en el apartado anterior de esta introducción, las dos primeras poblaciones incluyen linfocitos B pre-CG, mientras que las dos últimas corresponden a células B que ya han entrado en contacto con Ag y han respondido frente al mismo.

Los **linfocitos B inmaduros/transicionales** de SP representan alrededor del 1-4% de todos los linfocitos B de SP de adultos sanos. Fenotípicamente, muestran características prácticamente idénticas a las de los linfocitos B inmaduros de MO, con una expresión relativamente alta de IgM, CD38, CD24 y CD81, y positividad para CD5, CD9, CD10, CD20, CD22, CD200 y *ciTCL1*<sup>53,72,113,114</sup>. Por el contrario, muestran expresión variable de las proteínas CD21, CD23, CD44 y CD62L, y son CD27<sup>-</sup><sup>72,113,115</sup>. Además, expresan niveles bajos de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CXCR5<sup>72,113</sup>, lo que se ha sugerido favorecería una menor capacidad de migración *in vitro* mediada por CXCL12, CXCL13 y CCL21, respecto a la de las células B naïve<sup>113</sup>. Esto, unido a la expresión (relativamente) baja de moléculas de adhesión como CD44 y CD62L, podría estar relacionado con la escasa presencia de estos linfocitos B inmaduros en los OLS<sup>113</sup>. Desde el punto de vista funcional, el linfocito B inmaduro muestra una capacidad de proliferar y

diferenciarse *in vitro* tras estimulación mediada por BCR y CD40 relativamente limitada, asociada a una menor supervivencia en cultivo, respecto a la del linfocito B naïve<sup>72,113</sup>.

Los **linfocitos B naïve**, representan aproximadamente el 60-70% de todas las células B de la SP de adultos sanos<sup>53</sup>. Al igual que el linfocito B inmaduro, el linfocito B naïve no presenta signos de HMS y muestra un fenotipo CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD22<sup>+</sup> CD200<sup>+</sup> cITCL1<sup>+</sup><sup>53,116</sup>. Sin embargo, se diferencia de él por presentar menor expresión de CD24, CD38 y CD81, y tener mayor positividad para CD23, CD62L, CD22, CD44, CXCR4 y CXCR5<sup>53,72,113,114</sup>. Además, a diferencia del linfocito B inmaduro, el linfocito B naïve carece de expresión de CD9 y CD10 en su superficie y muestra mayor expresión de IgD que de IgM<sup>72,117</sup>. Aunque la mayoría de los linfocitos B naïve presentan menor expresión de CD5 que la observada en los linfocitos B inmaduros/transicionales, el 3-16% de las células B naïve expresan CD5 en ausencia de otros marcadores de inmadurez, manteniendo también una capacidad funcional intermedia entre la del linfocito B naïve y la del linfocito B inmaduro<sup>114,118</sup>. De forma similar, aunque la mayoría de linfocitos B naïve son CD21<sup>+</sup>, se ha descrito una población de células B naïve CD21<sup>-</sup> (≈3% del conjunto de todos los linfocitos B naïve), que se caracteriza por una expresión más elevada de las moléculas CD11c, CD19, CD20, CD22 y CD95<sup>53,119,120</sup>.

Los **linfocitos B de memoria** constituyen el 20-30% de todas las células B de SP de adultos sanos; suelen presentar HMS, y aproximadamente la mitad de ellos han sufrido cambio de isotipo de Ig<sup>106,121,122</sup>. Aunque los linfocitos B de memoria se encuentran circulantes en SP, estos están presentes también en los órganos linfoides, como los ganglios linfáticos, el bazo, el MALT y la MO<sup>53,70,71</sup>. La gran mayoría (>80%) de los linfocitos B de memoria de SP presenta un fenotipo CD5<sup>-</sup> CD10<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD22<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup> CD25<sup>+d</sup> CD38<sup>-</sup> CD200<sup>-</sup> cITCL1<sup>-</sup>, y CD27<sup>+53,106,116,117,121,122</sup>, constituyendo esta última proteína un marcador clásico, utilizado para identificar las células B de memoria<sup>121</sup>. Sin embargo, cabe señalar que existe también una población de linfocitos B memoria con cambio de isotipo que son CD27<sup>-106,111,123-125</sup>. Estas células presentan menos antecedentes de replicación, menor frecuencia de HMS y menor expresión de



moléculas asociadas a la cooperación entre los linfocitos T y B (e.g. HLADR y CD40)<sup>111,123,125</sup>, cuando comparamos sus características con las de los linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup>. Todo ello, unido a la presencia de linfocitos B de memoria CD27<sup>-</sup> en pacientes con defectos en la señalización de CD40-CD40L<sup>110,111</sup>, sugiere un origen T-independiente de las células B de memoria CD27<sup>-</sup><sup>106,111,123,124</sup>. A pesar de su baja frecuencia en donantes sanos (<10% de todas las células B)<sup>124</sup>, estas células B de memoria CD27<sup>-</sup> se encuentran aumentadas en enfermedades autoinmunes (e.g. lupus eritematoso sistémico) y en infecciones víricas crónicas (e.g. en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana)<sup>124,126</sup>. De forma similar, existe una pequeña fracción de linfocitos B de memoria de SP que es CD21<sup>-</sup> (≈4% de los linfocitos B de memoria); estas células B de memoria CD21<sup>-</sup> presentan una expresión más elevada de CD11c, CD19, CD22 y CD95<sup>120,127,128</sup>. En los últimos años se ha descrito un aumento de estos linfocitos B de memoria CD21<sup>-</sup> en distintas enfermedades infecciosas (e.g. en la malaria o la hepatitis C), autoinmunes (e.g. la artritis reumatoide) y en inmunodeficiencias primarias (e.g. en la inmunodeficiencia variable común; IDVC), por lo que se ha sugerido podrían estar relacionados con procesos de estimulación crónica<sup>127-129</sup>.

Las células B de memoria en su conjunto, pueden expresar distintos isotipos de Igs. En términos generales, ≈21%±9% de los linfocitos B de memoria expresan IgA y ≈23%±10% IgG, mientras que el restante ≈50% son IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup><sup>53</sup>. El verdadero origen de los linfocitos B de memoria que no presentan cambio de isotipo (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) ha sido objeto de intenso debate en el pasado, debate que se prolonga hasta el día de hoy. Actualmente se cree que se trata de una población de células B heterogénea constituida tanto por linfocitos B derivados de respuestas dependientes de célula T del CG, como por linfocitos B diferenciados en la zona marginal del bazo –y potencialmente también en otros tejidos (e.g. MALT)– de forma independiente de las señales derivadas de los linfocitos T<sup>106,130</sup>. Los estudios en los que se analiza la distribución de linfocitos B de SP según la subclases de IgG o IgA que expresan, ya sea por citometría de flujo<sup>131</sup> o a nivel de ARNm<sup>123</sup>, son muy limitados. No obstante, en ellos se sugiere una mayor abundancia

de IgG1, seguida de IgG2 e IgG3 y más raramente IgG4, aunque el número de individuos analizados es pequeño. Esta distribución varía según la expresión de CD27, con un mayor uso de *IGHG3* en la población CD27<sup>-</sup> y de *IGHG2* en la CD27<sup>+97,98,106,111,123,131</sup>. Respecto a las células B de memoria IgA<sup>+</sup> de SP, existiría un predominio de *IGHA1* vs. *IGHA2*<sup>132</sup>. En paralelo, se ha identificado la presencia en SP de adultos sanos (≈10%) de células de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, que suponen menos del 0.5% de todas las células B de SP<sup>106</sup>. Estas células B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> se caracterizan por mostrar una mayor frecuencia de HMS que otros linfocitos B de memoria, junto a una expresión preferencial de cadenas ligeras lambda y de determinadas familias V(D)J<sup>133</sup>. Todo ello, unido a la capacidad de la IgD de unirse a bacterias como *M. catarrhalis* y *H. influenzae*<sup>134</sup>, y su alta prevalencia en amigdalitis recurrentes y en tejido de adenoides hiperplásicas<sup>135</sup>, ha llevado a algunos autores a sugerir que en su origen, estas células B de memoria podrían estar relacionadas con la respuesta a Ags bacterianos y de otro tipo, característicos de las vías respiratorias altas<sup>133</sup>.

Finalmente, en los últimos años se ha demostrado que las **CPs** también están presentes de forma sistemática en la SP de adultos sanos, aunque en frecuencias muy inferiores (1-3% de las células B) a las de las demás poblaciones de células B, lo que ha dificultado enormemente su estudio<sup>53,117,136,137</sup>. Fenotípicamente, las CPs de SP se caracterizan por presentar expresión elevada de CD38 y CD27, positividad débil para CD19 e Ig de superficie, junto a expresión parcial de CD20 y CD138, en ausencia de CD5, CD21, CD22, CD23, CD24, CD200, y cITCL1<sup>53,117,138,139</sup>. Aunque el fenotipo de las CPs residentes en MO es similar al de las CPs circulantes en sangre, estas últimas muestran menor expresión de CD38, positividad constante para CD19, expresión débil de Ig de superficie y positividad parcial para CD20<sup>-/+</sup>. Además, mientras que las CPs de MO se caracterizan por una expresión fuerte de CD138 y positividad heterogénea para HLADR y CD45, las CPs de SP muestran una expresión parcial de CD138<sup>-/+</sup>, y son (todas) CD45<sup>+</sup> y HLADR<sup>+117</sup>. Estas diferencias sugieren un fenotipo más inmaduro para las CPs de SP vs. MO. De hecho, actualmente se considera que la gran mayoría de las CPs de SP, son células recién generadas en

los OLS, tras una respuesta inmune, ya que 6-7 días tras vacunación se puede detectar una oleada de CPs específicas del Ag inoculado en SP<sup>139,140</sup>. Sin embargo, se ha sugerido también que las CPs alojadas en MO podrían recircular en SP, al observarse tras la vacunación un aumento en SP de CPs con especificidades antigénicas diferentes a las inducidas por la vacuna, asociada a fenotipos típicos de CP de MO (e.g. menor expresión de HLADR)<sup>139,140</sup>. Esto ha llevado a plantear la posibilidad de que, tras la activación B y la respuesta inmune, las CPs de MO competirían con las CPs recién generadas procedentes de SP, por los nichos medulares de supervivencia, pudiendo en este caso abandonar la MO en búsqueda de nuevos nichos<sup>117,138,139</sup>. Respecto a la expresión de distintos isotipos de Igs, cabe señalar que la mayoría de las CPs de SP expresan IgA (49%±12%), seguida de IgM (18%±12%) e IgG (13%±11%), y solo una minoría carece de expresión de Ig de superficie (14%±12%)<sup>53,117</sup>. Esta mayor proporción de CPs IgA<sup>+</sup> en SP podría deberse a la existencia de una estimulación antigénica continuada en el MALT, especialmente en el intestino, en respuesta a bacterias comensales<sup>53,138,141</sup>.

### 3. Desarrollo de la respuesta B a lo largo de la vida

Actualmente se cree que en la variabilidad inmunológica observada entre distintos individuos sanos están implicados múltiples factores, la mayoría de los cuales (50-75%) serían de índole no genética o ambiental. De todos ellos, la edad se considera uno de los más importantes a la hora de explicar dicha variabilidad<sup>142-144</sup>.

Desde el momento del nacimiento, el sistema inmune se desarrolla y madura de forma progresiva, influenciado por la interacción con los Ags del entorno del individuo, modulando su capacidad de respuesta<sup>145</sup>. Así, durante la infancia temprana, los niños son más vulnerables a infecciones, debido fundamentalmente a la inmadurez del sistema inmune, que provoca que las respuestas generadas sean débiles y de corta duración. Posteriormente, el sistema inmune va madurando a lo largo de la infancia y en adultos jóvenes la frecuencia de infecciones es menor<sup>145</sup>. En contraposición, en adultos de edades avanzadas, se observa un mayor riesgo de infecciones

agudas de origen vírico y bacteriano, asociado a una mayor mortalidad por causas infecciosas, y otros trastornos relacionados con una disfuncionalidad de la respuesta inmune o una respuesta inmune inadecuada (enfermedades autoinmunes y cáncer); esta mayor disfunción inmune se ha asociado a un deterioro progresivo de la respuesta inmune (“inmunosenescencia”) en las fases más avanzadas de la vida (la vejez)<sup>145-147</sup>.

En conjunto, estos cambios en el sistema inmune y en la respuesta inmune “provocados” por la edad afectan de forma preferente a la inmunidad adaptativa<sup>145</sup>. En este capítulo nos centraremos en descubrir los cambios que ocurren a lo largo de la vida en los órganos linfoides y en los elementos solubles y celulares que integran la respuesta B.

### **3.1 Desarrollo de los órganos linfoides**

La estructura (y función) de los órganos linfoides, tanto primarios como secundarios, se modifica de forma importante a lo largo de la vida. Así, hoy se conoce que la producción de linfocitos B comienza en etapas embrionarias en el saco vitelino, desplazándose posteriormente (entre las semanas 8 y 10 de desarrollo) a tejidos blandos como el hígado fetal y el bazo; a partir de las semanas 12-15 de gestación la linfopoyesis B se establece en la MO, permaneciendo la MO como única fuente de producción de linfocitos B humanos, desde la semana 23-25 de gestación<sup>148,149</sup>, aunque algunos autores han sugerido la posibilidad de que exista hematopoyesis residual en el hígado de niños y adultos<sup>150,151</sup>.

En los primeros años de vida, la mayoría de los huesos contienen médula hematopoyética en la que se producen de forma activa células B, junto a otras células del sistema inmune y de la sangre. En adultos, el acúmulo de (depósitos de) grasa reduce el componente hematopoyético de la MO que progresivamente queda restringido a las vértebras, esternón, cráneo, costillas y los extremos de los huesos largos<sup>152,153</sup>. Así, el número de precursores de célula B en MO alcanza su máximo entre los 6 y 20 meses de vida (≈15-20% de la celularidad global de MO), para descender bruscamente hasta los dos años (≈4%) y de manera

más gradual hasta los  $\approx 14$  años y la edad adulta ( $\approx 0.8\%$ )<sup>154</sup>. Además de su papel como órgano linfoide primario, la MO es responsable también de alojar las CPs de larga vida y de mantener una producción estable de Acs séricos<sup>19,53,100</sup>. La capacidad de la MO para alojar estas CPs sería menor en niños, tanto por la inmadurez del microambiente medular en edades tempranas de la vida<sup>145,155,156</sup>, como por la sobreocupación de la MO por precursores hematopoyéticos<sup>154</sup>.

Al igual que ocurre con la MO, los OLS también sufren modificaciones a lo largo de la vida, especialmente en lo que hace referencia a los CGs<sup>157-159</sup>. Así, estudios morfológicos e histológicos realizados en muestras de ganglios de distintas localizaciones anatómicas y en bazos de fetos y de recién nacidos, han demostrado que de forma sistemática, los CGs están ausentes en OLS de fetos, de niños prematuros y de recién nacidos menores de 15 días<sup>157,158</sup>. Posteriormente, aparecen los CGs, y durante el primer año de vida alcanzan mayor número, para la mayoría de las localizaciones analizadas<sup>157</sup>. A partir de los 40-60 años, el componente linfoide de estos tejidos (bazo, ganglios) se reduce, debido al aumento de focos de lipomatosis, hialinización y fibrosis<sup>157,160,161</sup>, así como por la reducción en el número, tamaño y celularidad de los CGs<sup>157,161</sup>. De igual modo, el MALT también se modifica con la edad, lo cual es debido fundamentalmente a la colonización del tracto gastrointestinal por parte de microorganismos comensales (*B. fragilli*, *C. difficile* y especies de *Bifidobacterius* y *Lactobacilli*) durante los primeros meses tras el nacimiento, detectables en ocasiones ya en la primera semana de vida<sup>162,163</sup>. Las fuentes predominantes de estos microorganismos son la microbiota materna, variable según un parto se haya producido de forma natural o mediante cesárea (en cuyo caso el contacto será con diferentes microorganismos)<sup>164-166</sup>, y la dieta (leche materna vs. otra fuente externa de leche)<sup>166,167</sup>, pudiendo influir en su constitución y desarrollo otros factores como el uso de antibióticos y/o la edad gestacional<sup>166,167</sup>. Tanto el grado de colonización de la mucosa intestinal como el tipo de microorganismos que integran la flora del aparato digestivo, están directamente relacionados con cambios concretos en la respuesta desarrollada por parte de las células B<sup>162,163</sup>. Estos cambios en los tejidos linfoides asociados a la edad, influyen lógicamente

en la composición y distribución de los Acs séricos (y de las secreciones externas) y consecuentemente también, de los linfocitos B presentes en SP y en los OLS.

### 3.2 Niveles séricos de inmunoglobulinas

De forma previa al contacto con patógenos ambientales, el neonato ya dispone de Igs séricas<sup>19</sup>, debido fundamentalmente a la transferencia de IgG de origen materno a través de la placenta, proceso que se inicia alrededor de la semana 20-22 de gestación<sup>5,19,168</sup>. Estos Acs de isotipo IgG de origen materno, protegen inicialmente al recién nacido de infecciones con las que haya estado en contacto su madre, incluso 20-30 años atrás<sup>145</sup>. Los niveles de IgG sérica del recién nacido son cuantitativamente comparables a los de su madre, tanto en términos globales (426-2.080 mg/dl), como en relación a su distribución por isotipo –IgG1 (240-1.066 mg/dl), IgG2 (60-410 mg/dl), IgG3 (10-50 mg/dl) e IgG4 (4-56 mg/dl)<sup>168-171</sup>–, si bien el grado de transferencia de Acs IgG a través de la placenta depende directamente del tiempo de gestación<sup>168,172-174</sup>. Además se ha sugerido que en condiciones normales, en ausencia de inflamación y/o infección, existiría también transferencia de Acs de isotipo IgA e IgM<sup>175,176</sup>, aunque los niveles de estas Igs en neonatos son mucho más bajos (IgA, 0-11 mg/dl; e IgM, 5-30 mg/dl)<sup>168,176-178</sup>. Además, el transporte de IgG, IgA e IgM a través de la placenta aumenta en aquellos casos en los que coexisten procesos inflamatorios y/o infecciosos (e.g. rubeola o parotiditis)<sup>170,175</sup>. Así mismo, es posible que al menos parte de las Igs presentes en el suero fetal y del recién nacido, sean de origen fetal, ya que se ha demostrado la presencia de IgA e IgM en recién nacidos de madres que carecen de estos isotipos de Igs, debido a que son portadoras de déficits selectivos de IgA y/o presentan hipogammaglobulinemia<sup>169,176</sup>, habiéndose demostrado también la presencia de linfocitos B IgA<sup>+</sup> en tejidos fetales<sup>175,179</sup>. Pocos días/semanas después del nacimiento, los Acs transferidos a través de la placenta comienzan a degradarse y desaparecer<sup>152</sup>, siendo parcialmente sustituidos por Igs principalmente de tipo IgA, transferidas a través de la leche materna<sup>19,169</sup>, y por las Igs producidas por las propias células B del neonato, que se incrementan

de forma progresiva durante la infancia<sup>170</sup>. La baja capacidad proteolítica del tracto gastrointestinal del neonato, previene la degradación de la IgA materna, lo cual alarga su vida media<sup>19</sup>. Durante los primeros meses de vida, los niveles séricos de IgM aumentan considerablemente, alcanzando alrededor de los 4 meses el 50% del valor observado en adultos, y entre el primer y segundo año de vida, cifras idénticas a las detectadas en adultos sanos<sup>170,180</sup>. A su vez, los niveles de IgG decaen tras el nacimiento, (IgG total  $\approx$ 350 mg/dl) situándose su nadir a los 4 meses de vida; a partir de esa edad, las cifras de IgG sérica se recuperan parcialmente al final del primer año ( $\approx$ 800 mg/dl), no alcanzándose valores séricos comparables a los de adultos sanos hasta los 7 años de vida<sup>170,180</sup>. Este patrón de comportamiento global de los Acs IgG varía para las diferentes subclases de IgG; así, mientras que tanto la IgG1 como la IgG3 alcanzan su valor máximo en la edad pediátrica, la IgG2 aumenta más lentamente y solo alcanza su nivel máximo en suero, en la edad adulta<sup>181,182</sup>. De forma similar, los niveles de IgG4 séricos alcanzan valores máximos en edades más avanzadas que la IgG1 e IgG3, aunque su concentración en suero es mucho más variable entre distintos individuos<sup>182</sup>.

En términos globales, los niveles de IgA aumentan más lentamente en suero que los de IgG, observándose también diferencias entre las subclases de IgA: mientras que la IgA1 alcanza sus valores máximos en torno a los 20 años, la IgA2 continúa aumentando progresivamente sus niveles séricos durante la edad adulta<sup>183</sup>. Por el contrario, tanto la IgD como la IgE muestran concentraciones muy bajas en suero<sup>5</sup>, alcanzando ambas sus cifras más elevadas en torno a la adolescencia<sup>184,185</sup>. Pese a todos los cambios antes referidos, cabe señalar que los niveles de Igs son relativamente estables en la edad adulta, observándose concentraciones similares de todos los isotipos entre adultos jóvenes y personas mayores<sup>170,183,186,187</sup>, a pesar de la mayor susceptibilidad de estos últimos a padecer infecciones y tumores<sup>152</sup>.

### 3.3. Ontogenia de los linfocitos B

Durante los primeros días tras el nacimiento, el número de linfocitos B totales en SP se mantiene relativamente bajo, aunque aumenta rápidamente a partir de la primera semana, duplicando sus cifras a los dos meses de edad<sup>188</sup>, y alcanzan su valor máximo en torno a los dos años de vida. A partir de esta edad, la cifra de células B en SP desciende progresivamente hasta la edad adulta<sup>189-192</sup>. En adultos, el número de linfocitos B permanece relativamente estable<sup>117</sup>.

Pese a este patrón global, la cinética de las subpoblaciones de linfocitos B en SP varía significativamente según su estadio madurativo. Así, la expansión global de linfocitos B observada durante los primeros años de vida, es debida fundamentalmente a una producción y liberación masiva de linfocitos B inmaduros y naïve (poblaciones mayoritarias a lo largo de la infancia) a SP, subpoblaciones de células B que alcanzan sus valores máximos en SP entre los 6 meses y el año de vida<sup>189,190</sup>. Posteriormente, el número, tanto de linfocitos B inmaduros como de linfocitos B naïve, desciende paulatinamente hasta la edad adulta<sup>136</sup>, manteniéndose sus cifras estables a partir de ahí, incluso en sujetos de edad avanzada (>60 años)<sup>117</sup>. Esta elevada proporción de linfocitos B naïve e inmaduros existente en los primeros años de vida ( $\approx 95\%$  en el primer mes)<sup>193</sup> explicaría, al menos en parte, la existencia de una menor capacidad de respuesta frente a patógenos y vacunas en la infancia<sup>152</sup>. Además, se ha sugerido que los linfocitos B naïve neonatales, podrían tener algunas diferencias fenotípicas con los linfocitos B naïve del adulto, incluyendo una menor expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40, si bien estas diferencias no han podido ser confirmadas por el momento<sup>152,194,195</sup>.

En contraposición con el elevado número de células B pre-CG presentes en SP durante los primeros meses de vida, las células B de memoria se encuentran en SP en cifras muy bajas en el recién nacido, aumentando de forma exponencial hasta los 5 años; a partir de ahí, comienzan a descender progresivamente hasta los valores normales observados en adultos<sup>136,144,189,190</sup>. Los adultos a su vez, mantienen niveles estables de linfocitos B de memoria en SP hasta alrededor de los 60 años, edad a partir de la cual, estos vuelven a disminuir de forma



paulatina<sup>53,117</sup>. Algunos estudios han sugerido que los linfocitos B de memoria que no presentan cambio de isotipo, podrían producirse de forma más rápida que los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo de Ig<sup>136,190</sup>; sin embargo, estos hallazgos no han podido ser corroborados por otros autores, que no observan diferencias en la distribución de ambos subtipos de células B de memoria con la edad<sup>192</sup>. Estudios más detallados de la distribución de linfocitos B de memoria con diferente isotipo de Ig han demostrado la presencia, ya en sangre de cordón umbilical, de células B de memoria IgG<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>, en su mayoría CD27<sup>+</sup>, aunque en concentraciones muy bajas<sup>196</sup>. Sin embargo, a partir del nacimiento, los linfocitos B de memoria IgG<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> aumentan significativamente a lo largo de los primeros años de vida y alcanzan su pico máximo antes de los 5 años, edad a partir de la cual sus cifras descienden significativamente<sup>144,190,196</sup>. En adultos jóvenes (20-60 años), las cifras de linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup> se mantienen estables, disminuyendo gradualmente las IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup> a partir de los 60 años<sup>53,117</sup>. Aunque no existe información acerca de la distribución de las subclases de IgG e IgA analizadas por citometría de flujo, los datos obtenidos por biología molecular sugieren que prevalecería el uso de IgG2/IgG4 *versus* IgG1/IgG3 en adultos jóvenes frente a niños<sup>97</sup>, así como el de IgA2 sobre IgA1 y el de IgG2 sobre IgG1/IgG3 en adultos de más edad<sup>132,197</sup>. El origen de estas variaciones en la distribución de los compartimentos de células B que expresan diferentes isotipos a lo largo de la vida, podría estar relacionado con la existencia de cambios consecutivos de isotipo de Ig, debido a la ocurrencia a lo largo de la vida, de contactos consecutivos/repetitivos con Ag por parte de los linfocitos B de memoria de los CGs<sup>97</sup> (Figura 3).

Finalmente, apenas existe información acerca de la cinética de las CPs de SP en la infancia, debido a que se trata de una población celular minoritaria y a que la mayoría de estudios realizados en niños no alcanzan la sensibilidad necesaria para su identificación y recuento<sup>136,144,189</sup>. Sin embargo, si se ha observado que, al igual que las células B de memoria en adultos, las CPs IgM<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>, e IgA<sup>+</sup> se mantienen en cifras relativamente estables hasta los 60 años, edad a partir de la cual las tres poblaciones de CPs descienden gradualmente<sup>53,117</sup>.

### 3.4. Ontogenia de otros componentes del sistema inmune

El desarrollo del compartimento B depende de otros componentes de la respuesta inmune, y en particular de los linfocitos T; esto es debido a que la mayoría de las respuestas B frente a Ag son dependientes de linfocitos T, incluyendo la respuesta B frente a Ags bacterianos de naturaleza proteica, polisacáridos y conjugados de proteína-polisacárido. En este sentido, hoy se sabe que tras el nacimiento, las cifras de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en sangre aumentan exponencialmente durante los primeros meses de vida, debido también a la producción masiva de linfocitos T naïve, que empieza a declinar progresivamente en niños de corta edad (1-2 años)<sup>198</sup>, disminuyendo en paralelo tanto el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como el de linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>190,191</sup>. Este aumento temprano del número de linfocitos T de SP en los primeros meses/años de vida, permitirá rellenar los OLS con estas células y habilitar así, la generación progresiva de folículos linfoides con sus respectivos CGs. Al contrario de lo que ocurre con el compartimento B, la involución del timo es continua, de forma que, en adultos >60 años el número de linfocitos T naïve en sangre es cerca de 6 veces menor que en niños de 1-2 años (1.000-2.900 células/ $\mu$ l)<sup>198,199</sup>. Paralelamente a la disminución de las células T CD4<sup>+</sup> naïve, se produce un aumento del número de las células T de memoria y de las células T efectoras de patrones T<sub>h1</sub>, T<sub>h2</sub> y T<sub>h17</sub>, altamente específicas de los patógenos encontrados, hasta igualar en número a las células T naïve<sup>145,190,198,200-202</sup>. Con la edad, no solo se observan cambios en el número de linfocitos T y sus poblaciones, sino que además se modifica su capacidad para expresar moléculas relevantes para la respuesta B, como CD40L<sup>203,204</sup>.

Al igual que ocurre con los linfocitos T y B, durante los primeros (3-12) meses de vida otros elementos celulares (e.g. los neutrófilos y los monocitos) y solubles (e.g. las proteínas del sistema del complemento) de la respuesta inmune innata se encuentran también reducidos en número y capacidad funcional (e.g. fagocítica/oxidativa, quimiotaxis y capacidad de adhesión y bactericida)<sup>205-208</sup>. A diferencia de lo descrito para el compartimento linfoide, no se han

observado cambios significativos en la respuesta inmune innata a partir del primer año de vida<sup>145</sup>.

#### 4. Inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos

Las inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos (IDP-Ac)<sup>209</sup> constituyen el grupo más prevalente (>50%) de inmunodeficiencias primarias (IDP)<sup>210,211</sup>, e incluyen distintas entidades clínicas relativamente heterogéneas que presentan en común un defecto en la producción de uno, varios o todos los subtipos de Acs séricos<sup>211</sup>. Debido a que los Acs tienen un papel fundamental en la primera línea de defensa frente a patógenos, la principal manifestación clínica de este conjunto de enfermedades son las infecciones recurrentes, y en especial las infecciones respiratorias, junto a otras complicaciones reflejo de la alteración subyacente del sistema inmune, como autoinmunidad, linfoproliferación y cáncer. Dependiendo de la gravedad del defecto de la respuesta humoral, y de las manifestaciones clínicas asociadas al mismo, esto conlleva, no solo una mayor morbilidad con reducción de la calidad de vida, sino que con frecuencia también, una esperanza de vida significativamente más corta<sup>212,213</sup>. Actualmente, las IDP-Ac se clasifican según la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (*International Union of Immunological Societies; IUIS*) en 4 grupos mayoritarios<sup>209</sup> asociados con distinto comportamiento clínico, según la cantidad y tipo de Acs séricos (y de linfocitos B) afectados<sup>211-214</sup>: i) IDP-Ac con reducción severa de todos los isotipos de Igs en suero asociado a ausencia o descenso marcado de linfocitos B (i.e. agammaglobulinemia); ii) IDP-Ac con descenso grave de al menos dos isotipos de Igs en suero, y un número normal o bajo de linfocitos B (fenotipo de inmunodeficiencia variable común; IDVC); iii) IDP-Ac con reducción severa de los niveles de IgG e IgA en suero con IgM normal/elevada y un número normal de linfocitos B, (síndromes hiper-IgM); y iv) déficits de un isotipo de Ig, de cadenas ligeras o déficits funcionales B, habitualmente asociados con un número normal de linfocitos B en sangre. A continuación, resumiremos de forma breve las características de cada uno de estos cuatro subgrupos principales de IDP-Ac.

#### **4.1. Deficiencia grave de todos los isotipos de inmunoglobulina con ausencia o reducción importante del número de linfocitos B (agammaglobulinemias)**

Las agammaglobulinemias se caracterizan por un descenso severo de los niveles de Igs séricas de todos los isotipos, en ausencia (o con una reducción muy significativa del número) de linfocitos B circulantes en sangre. En conjunto, afectan a 1:100.000-200.000 individuos<sup>214</sup> y su diagnóstico suele realizarse en edades tempranas de la vida ( $\approx 50\%$  antes del primer año de vida y  $\approx 90\%$  antes de los 5 años<sup>215</sup>). En  $\approx 95\%$ <sup>216,217</sup> de los pacientes que presentan agammaglobulinemia, es posible identificar el defecto genético, que en la gran mayoría ( $\approx 85\%$ ) corresponde a alteraciones genéticas asociadas al cromosoma X, especialmente a mutaciones en el gen que codifica para la proteína Btk (abreviado del inglés, *Bruton's tyrosine kinase*), necesaria para la cascada de señalización mediada por el pre-BCR; este defecto se traduce en un bloqueo de la diferenciación de célula pro-B a célula pre-BI<sup>214,216-219</sup>. En las demás agammaglobulinemias, las alteraciones genéticas subyacentes causantes de la enfermedad suelen ser debidas a mutaciones autosómicas recesivas ( $10\%$ )<sup>216</sup> que afectan a la expresión o señalización del pre-BCR, como mutaciones en los genes que codifican para Ig $\mu$  ( $\approx 5\%$  de los pacientes)<sup>220</sup>, para las cadenas ligeras subrogadas ( $\leq 1\%$ )<sup>221</sup>, CD79a ( $\leq 1\%$ )<sup>222</sup>, CD79b ( $\leq 1\%$ )<sup>223</sup> o BLNK ( $\leq 1\%$ )<sup>224</sup>.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes que presentan agammaglobulinemia se caracterizan por mostrar infecciones bacterianas graves y recurrentes, que en ocasiones, ponen en riesgo la vida del paciente<sup>214,216,217,225</sup>. Aunque en algunos casos se ha realizado con éxito trasplante de progenitores hematopoyéticos, e incluso procedimientos de terapia génica, al tratarse de un defecto restringido al compartimento B, el tratamiento temprano con Igs de sustitución permite a estos pacientes sobrevivir hasta la edad adulta, siendo el daño pulmonar permanente la principal causa de defunción asociada a este subgrupo de IDP<sup>214,216,226-229</sup>.

## **4.2. Deficiencia grave de al menos dos isotipos de inmunoglobulina con número normal o bajo de linfocitos B (fenotipo de inmunodeficiencia variable común)**

El término “inmunodeficiencia variable común” fue acuñado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1971, con el objetivo de separar estos síndromes con déficit de Acs séricos de significado incierto, de los que muestran una descripción clínica más homogénea asociada a una herencia mendeliana bien definida<sup>180,230</sup>. De hecho, actualmente sigue sin existir una definición y/o unos criterios diagnósticos universalmente aceptados para este grupo de enfermedades, que a su vez muestran un espectro de alteraciones inmunológicas y clínicas muy variable<sup>231-235</sup>.

### **4.2.1. Diagnóstico de la inmunodeficiencia variable común**

A pesar de los esfuerzos realizados, actualmente no existe un test genético o inmunológico definitivo para el diagnóstico de la gran mayoría ( $\approx 90\%$ ) de las IDVC<sup>214</sup>; esto hace que habitualmente, el diagnóstico de IDVC sea más un diagnóstico de exclusión de otras entidades<sup>234,236</sup>. Hasta 2014, los criterios diagnósticos más utilizados para IDVC eran los criterios propuestos en 1999 por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (*European Society for Immunodeficiencies*; ESID) junto con el Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias (*Pan American Group for Immunodeficiencies*; PAGID)<sup>237</sup>, y que incluían: i) la existencia de un marcado descenso de los niveles de IgG e IgA o IgM en suero; ii) el inicio de la inmunodeficiencia a partir de los 2 años de vida; iii) la demostración de la existencia de una respuesta a vacunación deficitaria o ausencia de isohemaglutininas; una vez iv) se hubieran excluido otras causas de hipogammaglobulinemia. A partir de entonces se han propuesto otras clasificaciones basadas en la combinación de estos y otros criterios diagnósticos; las principales diferencias entre la primera clasificación y estas últimas clasificaciones, se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Principales diferencias entre los criterios propuestos por diferentes grupos para el diagnóstico de IDVC.**

	<b>Criterios diagnósticos</b>				
	<b>ESID/PAGID (1999)</b>	<b>ESID (2017)</b>	<b>Ameratunga (2013)</b>	<b>DEFI (2015)</b>	<b>ICON (2015)</b>
<b>Niveles séricos de Ig</b>	IgG↓ (<2DS según edad) ↓IgA o IgM	IgG e IgA↓, con o sin ↓ de IgM (<2DS según edad)	IgG<5 g/l ↓ de IgA o IgM no requerido (apoya el diagnóstico)	IgG e IgA↓, con o sin ↓ de IgM (<2DS según edad)	IgG↓ según edad ↓ de IgA o IgM
<b>Edad (mínima)</b>	≥2 años	≥4 años	≥4 años	≥4 años	≥4 años
<b>Características clínicas</b>	No requerido	≥1 de 5 criterios: –Susceptibilidad a infecciones –Autoinmunidad –Enfermedad granulomatosa –Linfoproliferación policlonal –Antecedentes familiares	1) ≥1 de 6 criterios: –Infecciones recurrentes, inusuales o graves –Pobre respuesta a antibióticos –Infecciones a pesar del uso de antibióticos profilácticos –Infecciones a pesar de vacunación –Bronquiectasias o enfermedad pulmonar crónica. –Enfermedades autoinflamatorias o autoinmunidad  2) Alteraciones histológicas (e.g. hiperplasia, granulomas)	No requerido	Presencia de ≥1 manifestaciones clínicas: –Infección –Autoinmunidad –Linfoproliferación  No es obligado si se cumplen los demás criterios (especialmente en casos con antecedentes familiares)
<b>Características biológicas</b>	≥1 de 2 criterios: –Pobre respuesta a vacunación –Ausencia de isohemaglutininas	≥1 de 3 criterios: –Pobre respuesta a vacunación –Ausencia de isohemaglutininas –Células B de memoria con cambio de isotipo <70% del valor normal según edad	≥3 de 8 criterios: –IgA<80mg/dl y/o IgM<40mg/dl –IgG3<20 mg/dl –↓células B de memoria con cambio de isotipo o ↑células B CD21 <sup>+</sup> –Respuesta pobre a vacunación – Respuesta transitoria a vacunación –Ausencia de isohemaglutininas. –Presencia de auto-Ac –Variantes en genes asociados con IDVC.	<10% de células B de memoria con cambio de isotipo	≥1 de 2 criterios: –Pobre respuesta a vacunación –Ausencia de isohemaglutininas
<b>Criterios de exclusión</b>	ID secundaria a otra causa	1) ID secundaria 2) Defecto en células T (≥2 de 3 criterios): –Células CD4/μl: <300 (2–6 años), <250 (6–12 años), <200 (>12 años) –% T CD4 naïve: <25% (2–6 años), <20% (6–16 años), <10% (>16 años) –Proliferación de linfocitos T ausente	ID secundaria a otra causa	1) ID secundaria 2) Defecto en células T (≥1 de 2 criterios): –<20 T CD4+ naïve/μl –Infecciones oportunistas	ID secundaria a otra causa

↑, aumento; ↓, descenso; DS, desviación estándar. Información modificada de Conley *et al.* 1999<sup>237</sup>, Abinun *et al.* 2017<sup>11</sup>, Ameratunga *et al.* 2013<sup>238</sup>, Bertinchamp *et al.* 2016<sup>233</sup> y Bonilla *et al.* 2016<sup>231</sup>. Ameratunga *et al.* establece como criterios necesarios para el diagnóstico de IDVC la existencia de ≥1 criterio clínico, junto con alteraciones histológicas o ≥3 criterios biológicos. ESID, Sociedad Europea de Inmunodeficiencias; PAGID, Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias; DEFI, grupo de estudio francés de adultos con hipogammaglobulinemia; ICON, consenso internacional para la definición de IDVC.

En términos generales, uno de los criterios diagnósticos de IDVC más controvertidos, es la evaluación de la respuesta deficitaria a vacunación, ya que ninguna clasificación especifica cuáles son las vacunas y/o los criterios concretos que deben emplearse para establecer dicho déficit (Tabla 3)<sup>231,233,238,239</sup>. No obstante lo anterior, si existen algunas guías para evaluar la respuesta deficitaria a vacunas<sup>240-242</sup>, sin que sin embargo exista consenso sobre (algún o algunos) criterios que puedan ser uniformes y objetivos, a emplear<sup>236</sup>. Además, la interpretación de los resultados obtenidos puede resultar problemática, debido fundamentalmente a i) diferencias en la respuesta inmune en función de la edad y/o la administración previa de vacunas y ii) la incapacidad de lograr respuestas consideradas adecuadas, en donantes sanos con elevados niveles basales de Acs<sup>238</sup>. Por todo ello, algunos autores han sugerido que la respuesta a la vacunación pase a constituir un criterio de apoyo al diagnóstico, y que no sea un criterio de obligado cumplimiento<sup>238</sup>. De hecho, actualmente la ESID reconoce que el descenso en el número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en SP evaluado por citometría de flujo, podría constituir una alternativa válida a la evaluación de la respuesta a vacunación<sup>11,239</sup>.

Por otro lado, no existe un único criterio para establecer un diagnóstico diferencial fiable y robusto entre IDVC y otras IDP con déficit de Acs séricos. En este sentido, aunque todas las clasificaciones propuestas hasta la fecha incluyen como criterio obligatorio el descenso de IgG, el punto de corte establecido varía según la clasificación<sup>231,233,238,239</sup> (Tabla 3); además, solo en algunas clasificaciones se establece como criterio diagnóstico obligatorio el descenso de IgM y/o IgA<sup>231,233,238,239</sup>. Recientemente se ha sugerido que aquellos pacientes que presentan un déficit marcado en el número de linfocitos T en SP deberían ser tratados como una inmunodeficiencia combinada, aunque el criterio para establecer dicho descenso tampoco es unánime<sup>11,233</sup> (Tabla 3). Además, la mayoría de clasificaciones incluyen entre los criterios diagnósticos propuestos la presencia de manifestaciones clínicas características de la enfermedad, aspecto que según otros autores no debería ser considerado, al sostener que el diagnóstico de IDVC podría y debería basarse exclusivamente en los hallazgos de laboratorio<sup>233</sup>, especialmente en aquellos pacientes

que presentan antecedentes familiares<sup>231</sup>. Finalmente, debido a la existencia de una hipogammaglobulinemia transitoria durante la infancia<sup>236,243</sup>, la edad mínima de diagnóstico se ha establecido en los 4 años, a pesar de que en aquellos pacientes pediátricos que manifiestan una clínica severa, deben tomarse decisiones terapéuticas inmediatas, antes de poder confirmar el diagnóstico de IDVC<sup>235</sup>.

Ante esta situación, y la ausencia de unos criterios diagnóstico definitivos de IDVC, se estima que existe un retraso en el diagnóstico de la enfermedad que podría oscilar entre 4 y 9 años<sup>236,244,245</sup>, lo cual aumenta considerablemente la morbilidad y mortalidad asociada a la misma.

#### **4.2.2. Epidemiología, características clínicas y tratamiento de inmunodeficiencia variable común**

La IDVC es la IDP-Ac sintomática más frecuente con una prevalencia de 1:25.000 a 1:50.000 casos por habitantes, en países occidentales<sup>236,246</sup>. Aunque puede manifestarse a cualquier edad, la mayoría de los pacientes se diagnostican entre los 20 y 40 años de vida<sup>246-248</sup>.

Los pacientes con IDVC presentan un gran abanico de manifestaciones clínicas, que pueden producir daño permanente en algunos tejidos, aumentando el riesgo global de muerte de estos pacientes respecto a la población sana de la misma edad; así, tras 40 años de seguimiento, se han observado tasas de supervivencia en hombres y en mujeres de 58% y de 51% vs. 68% y 80% en donantes sanos de edad similar, respectivamente<sup>247</sup>. Las infecciones respiratorias constituyen la manifestación clínica más habitual (>90% de los pacientes)<sup>247-253</sup>; con relativa frecuencia son debidas a infecciones por microorganismos como *H. influenzae*, seguido de *M. catarrhalis* y *S. pneumoniae*<sup>216,236</sup>, y se manifiestan en forma de neumonía, bronquitis, sinusitis y otitis de repetición<sup>246</sup>. De hecho, debido a la elevada prevalencia y gravedad de estas infecciones respiratorias de repetición, entre el 11% y el 25% de los pacientes con IDVC padecen bronquiectasias<sup>244,248,249,251</sup>, sobre todo aquellos casos en los que ocurre un



mayor retraso en el diagnóstico de la enfermedad<sup>244,254</sup>. Las manifestaciones gastrointestinales de origen infeccioso, constituyen también uno de los síntomas más frecuentes (20-60%) en pacientes con IDVC, correspondiendo con relativa frecuencia a procesos infecciosos causados por *G. lamblia*<sup>255</sup>.

Alrededor de dos tercios de los pacientes diagnosticados de IDVC (68-71%) presentan además una gran variedad de complicaciones no infecciosas de distinta índole<sup>234,247,253</sup>. Así, muestran, entre otras manifestaciones, signos de linfoproliferación (policlonal), reflejada en forma de organomegalias persistentes –esplenomegalia (26-38%)<sup>244,249,251,252</sup>, hepatomegalia (7-15%)<sup>249,256</sup> y/o linfadenopatía (14-26%)<sup>249,250</sup>– y/o o granulomas (8-9%)<sup>244,248,249</sup>. La desregulación de la respuesta inmune en estos sujetos se ve reflejada también, en una mayor frecuencia de procesos autoinmunes (20-29%), que se traducen tanto en citopenias autoinmunes (sobre todo trombocitopenia y anemia autoinmune), como en autoinmunidad específica de órgano y/o sistémica (e.g. enfermedad de Crohn, vitíligo y/o psoriasis)<sup>249,257</sup>. Otras manifestaciones clínicas asociadas a la IDVC incluyen la enteropatía (6-24%)<sup>249,253,256</sup> y el desarrollo de tumores malignos, tanto de origen hematológico (2-8%; fundamentalmente linfomas) como tumores sólidos (3-7%; principalmente cáncer colorrectal, gástrico y cáncer de mama)<sup>244,247,249,251</sup>. En su conjunto, la presencia de complicaciones no infecciosas se ha asociado con una supervivencia ≈11 veces menor en pacientes con IDVC (respecto a los sujetos que solamente tienen infecciones)<sup>247</sup>, en especial en aquellos casos que presentan linfoproliferación policlonal asociada a granulomas, linfadenopatía, hepatomegalia y neumonía intersticial linfocítica, citopenias autoinmunes, y/o enteropatía persistente e inexplicable<sup>256</sup>.

Debido a que no existe un tratamiento curativo para la IDVC, los pacientes con esta enfermedad habitualmente requieren de terapia continuada con Igs de sustitución, con lo que se previenen las infecciones y se reduce el daño irreversible de distintos tejidos. Sin embargo, no existe una recomendación clara respecto al uso de Igs de sustitución en aquellos pacientes que presentan un descenso de los niveles de Igs séricas, pero en los que todavía no se ha

confirmado el diagnóstico de IDVC<sup>258</sup>. Además, tampoco disponemos de parámetros validados que permitan predecir el comportamiento clínico y la evolución de estos pacientes, lo que hace que, con relativa frecuencia, en el momento de iniciar el tratamiento exista ya daño tisular irreversible (e.g. bronquiectasias)<sup>259</sup>. La dosis de Igs requerida en cada paciente puede variar, aunque la mayoría de guías sugiere empezar con 0,4-0,5 g/kg/mes, cuando la vía de administración es intravenosa, y con 0,4-0,6 g/kg/mes, cuando esta se administra por vía subcutánea<sup>260</sup>. Además, en aquellos pacientes que padecen bronquiectasias, esplenomegalia o enteropatía, se ha sugerido la utilización de dosis más elevadas (0,6-0,8 g/kg/mes),<sup>244,251,256</sup> dado que el uso de dosis más bajas se ha relacionado con una mayor frecuencia de infecciones respiratorias y peor pronóstico<sup>244,261,262</sup>. En este contexto, cabe señalar que la terapia con Igs de sustitución dificulta la monitorización de los pacientes una vez tratados, ya que los niveles séricos de Acs, y por tanto también la evaluación de la respuesta a vacunación, se ven enmascarados por el tratamiento administrado.

#### **4.2.3. Alteraciones genéticas en la inmunodeficiencia variable común**

Aunque la mayor parte de los pacientes diagnosticados de IDVC carecen de antecedentes familiares de inmunodeficiencia (IDVC esporádica) se estima que el 10-20% de los casos se asocian con un patrón de herencia familiar<sup>263-265</sup>. Sin embargo, solo se han conseguido identificar defectos monogénicos en el 2-10% de los pacientes diagnosticados de IDVC, muchas veces en familias consanguíneas con varios miembros afectados, mientras que en la mayoría de casos ( $\geq 90\%$ ) sigue sin encontrarse una alteración genética recurrente que pueda contribuir a explicar el fenotipo característico de la IDVC<sup>231,265,266</sup>.

Globalmente, los defectos monogénicos identificados se encuentran en genes relacionados con i) el estímulo antigénico mediado por BCR (e.g. *CD19*, *CD81* o *CD21*), ii) los mecanismos involucrados en el cambio de isotipo y la HMS (e.g. *ICOS*, *CD27* o *NF- $\kappa$ B1* y 2), iii) la supervivencia de los linfocitos B (*BAFF-R*) y iv) la función de linfocitos T (*CTLA-4* o *LRBA*)<sup>217,265</sup>,

entre otros (Tabla Suplementaria 1 del Anexo I). Además de las mutaciones genéticas específicas de IDVC, se han observado también en pacientes con IDVC, alteraciones genéticas asociadas a otras enfermedades, entre las que se incluyen la ganancia de función de *STAT3*, asociada habitualmente a la enfermedad poli-autoinmune de inicio temprano<sup>267</sup>, o mutaciones hipomórficas en genes relacionados con defectos combinados T-B, como *RAG1*<sup>268</sup>, *JAK3*<sup>269</sup>, *IL2RG*<sup>270</sup> o *DCLRE1C*<sup>271</sup>, y que se ha demostrado podrían originar también un fenotipo (clínico) de IDVC.

Aunque algunas de estas alteraciones monogénicas se asocian a un fenotipo clínico característico (e.g. *ICOS*, *CD19* o *CD27*), otras (e.g. *TACI*, *BAFF-R*, *NFKB1* o *CTLA-4*) también se han detectado posteriormente en familiares con otras IDP-Ac, e incluso en familiares asintomáticos (Tabla Suplementaria 1 del Anexo 1), lo que sugiere podrían tener una penetrancia parcial<sup>265,272-274</sup>. De hecho, el retraso en el comienzo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad<sup>231,236</sup>, hace más plausible la posibilidad de que se trate de una enfermedad de origen poligénico o multifactorial que consecuencia de una alteración genética única<sup>234,265,266</sup>. Así, el empleo de técnicas de secuenciación masiva ha logrado identificar múltiples regiones genómicas asociadas con el desarrollo de IDCV (e.g. *HLA*, *MSH5*, *ADAM*), apoyando la naturaleza poligénica de la enfermedad<sup>275,276</sup>. De hecho, en un estudio realizado sobre 31 pacientes sin antecedentes familiares de inmunodeficiencia, se identificaron una media de 9,4 variantes genéticas por paciente, de las que el 84% eran compartidas entre  $\geq 2$  casos, involucrando genes previamente relacionados con IDVC (e.g. *TACI*, *BAFF-R*, *IL21R*) o con otras inmunodeficiencias (e.g. *RAG2*, *NHEJ1*, *ATM*), y en genes que codificaban para proteínas que tienen un importante papel en vías de transducción y en funciones celulares relevantes para el linfocito B (e.g. *CD79a*)<sup>277</sup>. Finalmente se ha sugerido que en la patogenia de la IDVC podrían estar involucrados también otros factores, como la existencia de alteraciones en el patrón de metilación de genes clave para la función de los linfocitos B<sup>278</sup>.

#### 4.2.4. Alteraciones de poblaciones de células del sistema inmune en la inmunodeficiencia variable común

La gran heterogeneidad clínica y biológica de la IDVC, junto a la información relativamente limitada que proporcionan los niveles séricos de Igs, y la ausencia de marcadores genéticos bien definidos en la mayoría de los casos, ha favorecido el uso de la citometría de flujo como herramienta de apoyo al diagnóstico y la clasificación de la IDVC. En este sentido, diferentes estudios muestran una reducción significativa del número global de linfocitos B circulantes de SP en el 10-18% de los pacientes con IDVC<sup>250,279-281</sup>, descenso que se relaciona con un mayor riesgo de padecer esplenomegalia (80% vs. 39%)<sup>279</sup>, granulomas (33% vs. 6%)<sup>280</sup> y enteropatía (56% vs. 16%)<sup>280</sup>, tanto en niños como en adultos<sup>284-286</sup>. Este descenso anormal del número de linfocitos B de SP se ha relacionado, al menos en parte, con un defecto en la maduración de los linfocitos B en MO,<sup>282,283</sup> al demostrarse que habitualmente se debe a una disminución de células naïve B (11-15% de los casos) y/o de linfocitos B inmaduros/transicionales (22-25%)<sup>284,285</sup>.

No obstante lo anterior, la alteración más frecuentemente detectada (58%) en las series más largas de pacientes con IDVC referidos en la bibliografía, como es el caso del estudio EUROclass basado en el análisis de 303 pacientes con IDVC, es la reducción significativa del número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (linfocitos B CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), asociado a su vez, con una mayor frecuencia de esplenomegalia (52% vs. 24%) y granulomas (17% vs. 4%)<sup>250</sup>. Estas asociaciones coinciden con otras observaciones en series más cortas de pacientes, en las que 56-81% de los adultos<sup>286-290</sup> y 20-53% de los niños<sup>291,292</sup> presentaban un descenso anormal del número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en SP, y en los que se describe un mayor abanico de manifestaciones clínicas potencialmente asociadas con esta alteración<sup>253,289,292</sup>: citopenias autoinmunes (21% vs. 0%; n=45 niños)<sup>292</sup>, enfermedad pulmonar (32% vs. 0%, n=41 pacientes >15 años)<sup>289</sup> y enteropatía (35% vs. 0%; n=41 pacientes >15 años)<sup>289</sup>. Pese a estos hallazgos, solo en algunos estudios se han analizado en más detalle estas

subpoblaciones de células B de memoria con cambio de isotipo, subdividiéndolas según el tipo de Ig (IgG o IgA) que expresan; así, se ha observado que, aunque existe una disminución significativa de las células B de memoria que expresan ambos isotipos<sup>196,285</sup>, el porcentaje de pacientes con este defecto es claramente superior cuando el análisis se restringe a las poblaciones CD27<sup>+</sup> frente a los linfocitos CD27<sup>-</sup> (80% vs. 60% para IgG<sup>+</sup>; 65% vs. 10% para IgA<sup>+</sup>)<sup>196</sup>.

Finalmente, los linfocitos B de memoria que no han realizado cambio de isotipo (linfocitos B CD27<sup>+</sup> IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup>) también se encuentran reducidos en casi un tercio de los pacientes con IDVC (25-32%), aunque siempre que existe alteración de estos linfocitos B, esta se asocia a un descenso simultáneo de los linfocitos B de memoria que presentan cambio de isotipo<sup>284,285</sup>.

Otras poblaciones de linfocitos B que se ha descrito están alteradas en la SP de pacientes con IDVC incluyen los linfocitos B inmaduros y los linfocitos B CD21<sup>-</sup>, numéricamente aumentados en el 26-53% de los pacientes<sup>250,279,286,293-295</sup>, principalmente en aquellos casos que presentan mayor frecuencia de citopenias autoinmunes (60-64% de pacientes con números de CD21<sup>-</sup> aumentados vs. 5-20% de pacientes con números de CD21<sup>-</sup> normales)<sup>286,295,296</sup>, esplenomegalia (50-100% vs. 10-30%)<sup>250,286,293,295</sup> y granulomas (18-28% vs. 0-9%)<sup>250,295</sup>. Otras asociaciones, como la mayor frecuencia de adenopatías en pacientes que presentan un aumento relativo en el número de linfocitos B inmaduros (57% vs. 22%)<sup>250</sup>, se ha comprobado posteriormente son realmente debidas a un descenso en el número absoluto de las demás poblaciones de células B<sup>284</sup>.

La reducción del número de linfocitos B de memoria en SP, estaría también asociada con una peor respuesta a vacunación frente a Ags proteicos y polisacáridicos<sup>290,297</sup>. Así, en un estudio realizado sobre 18 pacientes con IDVC, se observó que más de la mitad (61%) respondían (aunque habitualmente de forma débil y/o transitoria) a alguno de los Ags polipeptídicos evaluados (proteicos: hepatitis B y C, difteria y tétanos; polisacárido+proteico: *H. influenzae b* conjugado), siendo este porcentaje del 100% (3/3) en aquellos pacientes que no presentaban alteraciones en los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo y solamente del 53% (8/15)

en pacientes con defectos en esta población B de SP<sup>306</sup>. En este mismo sentido, cabe señalar que de los tres pacientes que mostraron además respuesta de tipo IgG frente a polisacáridos de neumococo, dos pertenecían al grupo que mostraba cifras normales en SP de linfocitos B memoria con cambio de isotipo<sup>297</sup>. De acuerdo con estos hallazgos, en otro estudio se demostró que los pacientes en los que no existía un descenso del número total de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, poseían títulos protectores de Acs frente un mayor número de serotipos de neumococo, que aquellos que mostraban déficits numéricos de estas células B (mediana de 3 vs. 0.5 serotipos)<sup>290</sup>.

Algunos autores han observado una disminución en el número de CPs presentes en SP<sup>284</sup>, MO<sup>283</sup>, y ganglio linfático<sup>298</sup> de pacientes con IDVC respecto a donantes sanos; no obstante, la baja frecuencia de estas células no ha permitido hacer estudios más detallados de las mismas. De acuerdo con estos hallazgos, se ha referido previamente también, que tanto las CPs como los linfocitos B de memoria, podrían estar reducidos levemente en la SP de familiares asintomáticos de pacientes con IDVC, apoyando de este modo el posible origen poligénico de la enfermedad<sup>285</sup>. En la Tabla 4 se muestran las alteraciones del compartimento B más comúnmente observadas en los principales subtipos de IDP-Ac.

Basándose en las alteraciones existentes en las poblaciones de linfocitos B de SP de pacientes con IDVC, especialmente en los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, a lo largo de los años se han propuesto varias clasificaciones para estos pacientes, destacando por su amplia utilización las clasificaciones de Friburgo<sup>286</sup>, París<sup>287</sup>, EUROClass<sup>250</sup> y Rotterdam<sup>284</sup>. En la Figura 4 se muestra un resumen de los criterios de subclasificación de IDVC empleados en cada una de ellas.

**Tabla 4. Niveles de poblaciones de células B según su estadio de maduración en los principales subtipos de IDP-Ac.**

Subtipo de IDP-Ac	Subpoblaciones de células B				
	Célula B inmaduras	Linfocito B naïve	Linfocito B de memoria IgM <sup>++</sup> D <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	Linfocito B de memoria IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>	Célula plasmática
Agammaglobulinemia	↓	↓	↓	↓	↓
IDVC	N/↓	N/↓	N/↓	N/↓	↓
Síndromes híper-IgM Déficit de CD40L	N <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	N/↓	↓ (IgA <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> : N)	ND
Síndromes híper-IgM Déficit de AID	N <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	N	↓	ND
Déficit de IgA	N	N	N	N <sup>b</sup>	N/↓
Déficit de subclases de IgG (con o sin déficit de IgA)	N <sup>c</sup>	N <sup>c</sup>	N/↓	N/↓	N

↓ disminuido. N: normal; ND: datos no disponibles. <sup>a</sup>Cifras normales de células pre-centro germinal sin información disponible sobre linfocitos B inmaduros y naïve por separado. <sup>b</sup>Se han referido niveles deficitarios en <15% de los pacientes. <sup>c</sup>Se han referido niveles deficitarios en <10% de los pacientes.

Finalmente, se han descrito también en pacientes con IDVC, alteraciones numéricas que afectan a otras poblaciones de células de la respuesta inmune, además de los linfocitos B y las CPs. Así, en una serie de 473 pacientes con IDVC, se demostró que las células T CD4<sup>+</sup> estaban disminuidas en casi un tercio (29%) de los casos<sup>247</sup>; este hallazgo se ha confirmado en series más cortas de pacientes<sup>137,253</sup>, en las que se ha asociado también a un descenso de las células T naïve CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup><sup>253,284,299</sup>, especialmente en aquellos casos en los que se observan más manifestaciones clínicas asociadas a inmunodeficiencia (i.e. linfoproliferación, citopenias y enteropatía)<sup>253</sup>. Otras alteraciones descritas en los linfocitos de SP de pacientes con IDVC incluyen: el descenso del número de células T reguladoras<sup>300,301</sup>, el aumento del número de células T foliculares de patrón tipo T<sub>h1</sub> (asociado a aumento de linfocitos B CD21<sup>-</sup>)<sup>302</sup>, y el descenso significativo del número de células NK, asociado esta última alteración con un menor número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve, T CD8<sup>+</sup> y de linfocitos B, y con una mayor frecuencia de infecciones bacterianas severas y granuloma<sup>303</sup>. Además, otras poblaciones celulares que desarrollan funciones importantes en la respuesta inmune, como las células dendríticas, también se ha descrito se encuentran disminuidas en estos pacientes<sup>285</sup>, aunque no serán objeto de estudio en esta tesis doctoral.

**Figura 4. Esquema de las principales clasificaciones de pacientes con IDVC basadas en las alteraciones de las poblaciones de linfocitos B de SP.**

CLASIFICACIÓN	CRITERIOS	ASOCIACIONES CLÍNICAS
<b>1. Clasificación de Friburgo</b>		
	<b>Grupo I:</b> % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup> <0,4% de los linfocitos	
	<b>Grupo Ia:</b> linfocitos B CD21 <sup>-</sup> >20%	→ ↑ esplenomegalia
	<b>Grupo Ib:</b> linfocitos B CD21 <sup>-</sup> <20%	→ ↑ citopenias autoinmunes
	<b>Grupo II:</b> % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup> >0,4% de los linfocitos	
<b>2. Clasificación de París</b>		
	<b>Grupo MB0:</b> % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> <11%	→ ↑ esplenomegalia
	<b>Grupo MB1:</b> % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup> ≤8% (con % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> >11%)	→ ↑ granuloma
	<b>Grupo MB2:</b> no alteraciones	→ ↑ linfoproliferación
<b>3. Clasificación de EUROclass</b>		
	<b>Grupo B+:</b> >1% de linfocitos B de los linfocitos	
	<b>Grupo smB+:</b> % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup> >2%	
	<b>Grupo smB+ 21<sup>norm</sup>:</b> linfocitos B CD21 <sup>-</sup> <10%	
	<b>Grupo smB+ 21<sup>lo</sup>:</b> linfocitos B CD21 <sup>-</sup> ≥10%	→ ↑ esplenomegalia
	<b>Grupo smB-:</b> % linfocitos B CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup> ≤2%	→ ↑ granuloma
A	<b>Grupo smB+ 21<sup>norm</sup>:</b> linfocitos B CD21 <sup>-</sup> <10%	→
	<b>Grupo smB+ 21<sup>lo</sup>:</b> linfocitos B CD21 <sup>-</sup> ≥10%	→
B	<b>Grupo smB- tr<sup>hi</sup>:</b> linfocitos B inmaduros ≥9%	→ ↑ linfadenopatías
	<b>Grupo smB- tr<sup>norm</sup>:</b> linfocitos B inmaduros <9%	
	<b>Grupo B-:</b> <1% de linfocitos B de los linfocitos (excluidos del estudio)	
<b>4. Clasificación de Rotterdam</b>		
	<b>Grupo 1:</b> ↓ inmaduras y ↓ linfocitos B de memoria CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup>	→ ↑ esplenomegalia
	<b>Grupo 2:</b> ↓ naïve y ↓ linfocitos B de memoria CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> D <sup>+</sup> y CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup>	
	<b>Grupo 3:</b> ↓ linfocitos B de memoria CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> D <sup>+</sup> y CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup>	
	<b>Grupo 4:</b> ↓ linfocitos B de memoria CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> D <sup>-</sup>	
	<b>Grupo 5:</b> No alteraciones en pre-CG ni memoria	

Los grupos establecidos por las clasificaciones de Friburgo<sup>286</sup>, París<sup>287</sup> y EUROClass<sup>250</sup> se basan en el descenso en SP de los números relativos de distintas poblaciones de linfocitos B respecto a puntos de corte establecidos para cada población celular. La clasificación de Rotterdam se basa en el descenso en los números absolutos de cada población de células B por debajo del percentil 5% de donantes agrupados por edad (5-10 años; 10-16 años; >16 años)<sup>284</sup>.



#### 4.2.5. Alteraciones funcionales B asociadas a inmunodeficiencia variable común

Las alteraciones detectadas en los distintos compartimentos madurativos de células B de SP en pacientes con IDVC, no se restringen a alteraciones numéricas, sino que, con relativa frecuencia, reflejan alteraciones funcionales. De este modo, Bryant *et al.* identificaron tres grupos de pacientes con IDVC en función de la capacidad que presentaban para producir Acs de tipo IgG e IgM tras estimulación *in vitro* con estímulos capaces de generar respuesta B independiente de linfocitos T<sup>304</sup>. En el grupo A, incluyeron pacientes incapaces de sintetizar IgM o IgG *in vitro*, mientras que en el grupo B, estaba constituido por pacientes capaces de sintetizar IgM (>4000 ng/μl) pero no IgG y en el grupo C, se incluían sujetos con IDVC capaces de sintetizar IgM e IgG (>500 ng/μl)<sup>286,304</sup>. Posteriormente, Warnatz *et al.* mostraron que aquellos pacientes que presentaban en SP un número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo dentro del rango normal pertenecían al grupo C, mientras que aquellos que mostraban un número reducido de estas células B, correspondían a pacientes de los grupos A y B<sup>286</sup>. Más recientemente, se ha observado mediante técnica de ELISpot (ensayo de puntos por inmunoadsorción ligado a enzimas; del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*) que en general, los pacientes con IDVC presentan un defecto funcional de las células B con un número reducido de CPs productoras de Igs *ex vivo*, asociado a un defecto en la diferenciación a CP tras estimulación *in vitro* con Ags T-independientes<sup>305</sup>. En este estudio se demostró además la existencia de una relación directa entre esta alteración funcional y el descenso en SP del número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo. Así, aquellos pacientes con un defecto en estas células tenían menos CPs productoras de Igs *ex vivo* e *in vitro* que aquellos que mostraban cifras normales de linfocitos B de memoria con cambio isotípico circulantes, a pesar de que dentro de este último grupo existían tanto casos con respuestas funcionales indetectables como normales<sup>305</sup>. Sin embargo, estas clasificaciones funcionales de la IDVC han tenido menor aceptación en la práctica clínica que aquellas que están basadas en los hallazgos de la citometría de flujo, debido

fundamentalmente a que se trata de técnicas más laboriosas y difíciles de estandarizar para su aplicación en la rutina diagnóstica<sup>286</sup>.

### **4.3. Deficiencia grave de IgG e IgA con valores normales o elevados de IgM y normales de linfocitos B (síndromes híper-IgM)**

Los síndromes híper-IgM son un conjunto de inmunodeficiencias caracterizadas por la ausencia o descenso severo de IgG e IgA, con cifras normales o elevadas de IgM, debido a un defecto en el cambio de isotipo de Ig<sup>11,209,306,307</sup>. Hoy se conoce que estos defectos se asocian a mutaciones en: i) proteínas que participan en la HMS y/o cambio de isotipo (*AID*, *UNG*, *MSH6*, *INO80*)<sup>306,308,309</sup>; ii) proteínas coestimuladoras expresadas por parte de los linfocitos T activados (*CD40L*) o por los linfocitos B (*CD40*); y iii) genes implicados en la señalización a través de NF- $\kappa$ B (*NEMO*, *IKBA*)<sup>310,311</sup>. Globalmente, la incidencia de síndromes híper-IgM es superior en varones que en mujeres, debido a que las formas más frecuentes de estos síndromes se relacionan con genes codificados en el cromosoma X (*CD40L* y *NEMO*)<sup>306</sup>, mientras que las formas autosómicas recesivas (*AID*<sup>312,313</sup>, *UNG*<sup>314</sup>, *CD40*<sup>315</sup>, *MSH6*<sup>308</sup>, *INO80*<sup>309</sup>) y dominantes (*IKBA*<sup>316</sup>) son menos frecuentes.

En general, la prevalencia de los síndromes híper-IgM es extremadamente baja, oscilando entre 1-2/10<sup>6</sup> nacimientos (*CD40L*, *AID*)<sup>317</sup> a  $\leq 100$  pacientes descritos a nivel mundial para la mayoría de los subtipos genéticos: *NEMO* (n $\approx$ 100 casos), *CD40* (n=16), *IKBA* (n=14), *MSH6* (n=8), *UNG* (n=3) e *INO80* (n=2)<sup>216,308,309,314,316,318</sup>. En la mayoría de los casos, el diagnóstico se realiza antes de los 5 años de edad, caracterizándose habitualmente estos pacientes por presentar infecciones respiratorias y gastrointestinales de repetición, si bien las manifestaciones clínicas varían de forma importante en función del defecto genético concreto subyacente<sup>306,307</sup>. Así, las deficiencias de *CD40L* y *CD40* afectan además de a la producción de Acs de tipo IgG, IgA e IgE, a la inmunidad celular<sup>306</sup>, por lo que suelen tener una clínica más severa, incluyendo citopenias de distintas líneas (sobre todo neutropenia) asociadas a infecciones oportunistas<sup>317,319</sup>. De igual

modo, las mutaciones en *NEMO* e *IKBA* también se caracterizan por asociarse a infecciones por gérmenes oportunistas, además de alteraciones en la piel (e.g. displasia ectodérmica), el pelo y los dientes (e.g. dientes cónicos)<sup>306,307,310</sup>. Por el contrario, en los síndromes hiper-IgM asociados a mutaciones en los genes *AID* y *UNG*, las alteraciones que afectan a células del sistema inmune están restringidas a los linfocitos B, asociándose clínicamente a infecciones respiratorias recurrentes, linfadenopatía y autoinmunidad, siendo las infecciones por gérmenes oportunistas y la neutropenia mucho menos frecuentes<sup>307,320</sup>. Finalmente, los dos pacientes identificados hasta la fecha que presentaban mutaciones en *INO80* se caracterizaban por presentar infecciones bacterianas, mientras que los defectos en el gen *MSH6* se han relacionado con una historia personal y/o familiar de cáncer<sup>307</sup>.

El tratamiento habitual en pacientes con síndromes hiper-IgM es la terapia con Igs de sustitución, y en función del grado de gravedad de las infecciones, el uso profiláctico de antibióticos; no obstante, estudios más recientes sugieren que el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas podría mejorar de forma significativa la supervivencia global de estos pacientes, especialmente si se realiza antes de los 5 años<sup>319,321,322</sup>.

Fenotípicamente, los pacientes con síndrome hiper-IgM se caracterizan por presentar un número absoluto de linfocitos B en SP dentro de los valores normales, pero cifras muy reducidas de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> con cambio de isotipo<sup>323</sup>. La distribución de las demás subpoblaciones de linfocitos B de memoria varía según el defecto genético. Así, mientras que los pacientes con deficiencia de *AID* tienen cifras globales de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> normales<sup>320</sup>, aquellos casos que presentan mutaciones en *CD40L* generalmente muestran valores reducidos de todas las subpoblaciones de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup>, con y sin cambio de isotipo; no obstante, en algunos pacientes con mutaciones en *CD40L* se han descrito cifras normales de linfocitos B de memoria IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup><sup>324</sup>, y en general también presentan cifras normales de linfocitos B de memoria CD27<sup>-</sup> IgA<sup>+110,111</sup>.

#### **4.4. Deficiencia funcional B, de isotipo de cadenas pesadas o de cadenas ligeras de inmunoglobulina**

Dentro de este grupo de IDP-Ac se engloban defectos restringidos a un isotipo y/o subclase concreta de Ig, una cadena ligera de Ig en particular, o a Acs específicos de un determinado patógeno, siendo las manifestaciones clínicas generalmente menos severas que las descritas anteriormente para otros subtipos de IDP-Ac. Habitualmente, en estos subgrupos de pacientes el número de linfocitos B circulantes y sus principales compartimentos madurativos, están dentro de los límites de la normalidad.

##### **4.4.1. Déficit selectivo de IgA**

El déficit selectivo de IgA fue descrito por primera vez en 1961 en dos individuos clínicamente asintomáticos, lo que llevó a la conclusión de que la IgA podría no ser necesaria en algunos individuos<sup>216,325</sup>. Sin embargo, el análisis de una serie más amplia de pacientes en 1971, mostró que estos presentaban mayor incidencia de infecciones<sup>216,326</sup> y de enfermedades autoinmunes<sup>216,327</sup>.

###### **4.4.1.1. Diagnóstico del déficit selectivo de IgA**

La ESID establece como criterios para el diagnóstico del déficit selectivo de IgA i) la presencia de mayor susceptibilidad a infecciones y/o autoinmunidad, o la existencia de un familiar afectado por una inmunodeficiencia similar, ii) niveles de IgA sérica <7 mg/dl con concentraciones normales en suero de IgG e IgM asociados a iii) una respuesta adecuada a vacunación, y iv) edad  $\geq 4$  años, v) una vez se hayan excluido otras posibles causas de hipogammaglobulinemia<sup>11</sup>. Sin embargo, aunque estos pacientes pueden tener asociado un aumento de las infecciones bacterianas y de las enfermedades autoinmunes, gran parte de ellos son, al menos aparentemente, asintomáticos<sup>13,328,329</sup>. Así, a diferencia de la ESID, la IUIS no establece como requisito para el diagnóstico de déficit selectivo de IgA la existencia de manifestaciones clínicas o antecedentes familiares, si bien reconoce que ambos pueden estar

relacionados con la enfermedad<sup>209,330</sup>. En la Tabla 5 se muestran las principales diferencias entre los criterios propuestos por la ESID y la IUIS para el diagnóstico de déficit selectivo de IgA.

**Tabla 5. Principales diferencias entre los criterios propuestos por la ESID y por la IUIS para el diagnóstico de déficit selectivo de IgA.**

<b>Criterios diagnósticos</b>		
	<b>ESID (2017)</b>	<b>IUIS (2017)</b>
<b>Niveles séricos de Ig</b>	IgA <7 mg/dl IgM e IgG y sus subclases normales	IgA indetectable (<7 mg/dl) o baja IgM e IgG y sus subclases normales
<b>Edad (mínima)</b>	≥4 años	No establece
	≥1 de 3 criterios:	
<b>Características clínicas</b>	-Susceptibilidad a infecciones -Autoinmunidad -Antecedentes familiares	No requerido
<b>Características biológicas</b>	Respuesta a vacunación normal	Respuesta a vacunación normal
<b>Criterios de exclusión</b>	ID secundaria a otra causa	ID secundaria a otra causa

Información modificada de Picard et al.<sup>209</sup> y Abinun et al.<sup>11</sup>. ESID, Sociedad Europea de Inmunodeficiencias; IUIS, Unión internacional de Sociedades de Inmunología.

#### 4.4.1.2. Epidemiología, características clínicas y tratamiento del déficit selectivo de IgA

El déficit selectivo de IgA es la IDP más común en los países occidentales, afectando aproximadamente a 1 de cada 600 individuos, aunque la prevalencia varía entre diferentes grupos étnicos, desde 1:18.550 sujetos en Japón<sup>331,332</sup> hasta 1:163 en España<sup>332,333</sup>. En este sentido, hay que tener en cuenta además que, debido a que muchos casos son clínicamente asintomáticos y no existen programas de rastreo diagnóstico a nivel poblacional, la prevalencia podría ser aún mayor<sup>13</sup>. En términos globales, se estima que hasta dos tercios de los sujetos que presentan ausencia de IgA en suero son asintomáticos, lo cual resulta difícil de explicar de acuerdo con el papel de los Acs de tipo IgA en la defensa (inmune) en mucosas. Sin embargo, esto podría deberse a que, en estos sujetos, existe una producción residual de IgA a nivel de las mucosas<sup>13,326,334</sup>, o bien, a un mecanismo compensatorio mediado por IgM<sup>329</sup>. De hecho, varios estudios han demostrado la existencia de un incremento de IgM e IgG en el tejido intestinal<sup>335-</sup>

<sup>337</sup>, las secreciones nasales<sup>44,338,339</sup>, la saliva<sup>44,340</sup> y el calostro<sup>341</sup> de pacientes con déficit selectivo de IgA, si bien dicho incremento no se ha podido confirmar que esté relacionado con la ausencia de manifestaciones clínicas<sup>338-340,342</sup>.

Las infecciones respiratorias son la manifestación clínica más frecuente entre los pacientes con déficit selectivo de IgA<sup>329,343-345</sup>, estando presentes en 40-90% de los casos sintomáticos<sup>13</sup>; frecuentemente, estas infecciones están causadas por *H. influenzae* y *S. pneumoniae* y suelen resolverse sin complicaciones serias, si bien en algunos casos pueden provocar lesión tisular (i.e. bronquiectasias)<sup>346-348</sup>. Así mismo, los pacientes con déficit de IgA presentan también con relativa frecuencia otras infecciones<sup>344,349</sup>, especialmente infecciones gastrointestinales causadas por *G. lamblia*<sup>350</sup>. Recientemente, en un estudio retrospectivo llevado a cabo en Suecia sobre 2.100 pacientes con déficit selectivo de IgA y 18.653 donantes sanos, se observó que, además de las infecciones respiratorias y gastrointestinales<sup>351</sup>, estos pacientes presentaban también una mayor frecuencia de infecciones cutáneas (4,1% vs. 2,2%), genitourinarias (6,1% vs. 3,4%) y de sepsis (1,5% vs. 0,45%)<sup>351</sup>. Otras patologías relacionadas con la desregulación del sistema inmune también se detectan en una frecuencia alta, como son la alergia (13-43%)<sup>343-345,352</sup> y la autoinmunidad (11-27%)<sup>343-345,352</sup>, especialmente enfermedad celíaca, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad inflamatoria intestinal, tiroiditis y/o vitíligo<sup>353</sup>. El tratamiento de los pacientes con déficit selectivo de IgA es exclusivamente sintomático<sup>13</sup>, pero se recomienda el seguimiento aproximadamente cada 6 meses<sup>13</sup>, con el objetivo de evaluar las posibles complicaciones, así como la (posible) evolución a IDVC, observada en un número reducido de casos<sup>354-356</sup>.

#### **4.4.1.3. Alteraciones genéticas asociadas al déficit selectivo de IgA**

A pesar de que la mayoría de los pacientes que presentan déficit selectivo de IgA no refieren antecedentes familiares (déficit selectivo de IgA esporádico), se estima que en

alrededor del 20% de los casos la enfermedad sería heredable, siendo el riesgo de padecer la enfermedad 50 veces superior cuando existen antecedentes familiares<sup>357-360</sup>.

Hasta la fecha, no se ha identificado una causa genética única para el déficit selectivo de IgA. Sin embargo, se han definido algunos loci relacionados con una mayor o menor susceptibilidad a padecer la enfermedad, destacando la asociación descrita entre déficit selectivo de IgA y genes *HLA*<sup>361-364</sup>. En este sentido, Ferreira et al.<sup>365</sup> observaron en una serie de 772 pacientes y 1.976 donantes sanos procedentes de España, Islandia, Suecia y Finlandia, que los haplotipos *HLA-DQB1\*0201*, *HLA-DRB1\*0301* y *HLA-DRB1\*0701* confieren un mayor riesgo de padecer déficit selectivo de IgA, mientras que el haplotipo *HLA-DRB1\*1501* tiene un efecto protector. Curiosamente, estos haplotipos también se han relacionado con enfermedades autoinmunes (frecuentemente) asociadas a déficit selectivo de IgA<sup>357,366</sup>. Además, en los últimos años se han identificado variantes en otros genes a parte de los genes *HLA*, relacionadas con déficit selectivo de IgA; entre ellos se incluyen los genes *ATG13-AMBRA1* y *AHI1*, asociados a mayor riesgo de padecer la enfermedad, y *IFIH1*, *PVT1* y *CLEC16A*, con un efecto protector<sup>367,368</sup>. Todos estos genes, excepto *ATG13-AMBRA1*, se han relacionado también con una mayor o menor susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades autoinmunes<sup>367</sup>.

Al igual que en la IDVC, se han identificado en un subgrupo de pacientes, mutaciones en *TACI*<sup>369,370</sup>, considerándose actualmente que este constituye un gen cuya alteración favorece una mayor susceptibilidad a padecer déficit selectivo de IgA<sup>371</sup>. De hecho, en el caso del déficit selectivo de IgA, el papel de las mutaciones de *TACI* es muy controvertido, ya que se cree que podría estar presente únicamente en aquellos casos que evolucionarán a IDVC<sup>357,372</sup>. Además de las mutaciones en *TACI*, se han identificado mutaciones en otros genes relacionadas con otras inmunodeficiencias, como los genes *RAG1*<sup>373</sup>, *CD27*<sup>371</sup> y *LRBA*<sup>374</sup>; no obstante, el seguimiento clínico de estos casos ha demostrado que muchos de ellos, en realidad correspondían a IDP-Ac más severas (e.g. IDVC) que debutaban como un déficit de IgA a nivel sérico. Ante estos hallazgos podemos concluir que, aunque se han descrito algunas mutaciones en genes asociados a otras

inmunodeficiencias en pacientes que aparentemente presentan déficit selectivo de IgA, es posible que en muchos casos un seguimiento clínico más estrecho termine por demostrar que se trata de una IDP-Ac más severa, quedando por establecer el verdadero mecanismo (poli)génico de esta enfermedad.

#### **4.4.1.4. Alteraciones en poblaciones de células del sistema inmune en el déficit selectivo de IgA**

La información existente hasta el momento de iniciar este trabajo acerca de las alteraciones recurrentes en las distintas poblaciones de linfocitos B de SP de pacientes con déficit selectivo de IgA, era muy limitada y con frecuencia controvertida. Así, en ninguno de los estudios realizados (sobre un total de 286 pacientes) se han observado alteraciones en los linfocitos B inmaduros/transicionales o naïve<sup>375-380</sup>, ni en los linfocitos B de memoria IgM<sup>++</sup>D<sup>+375-380</sup>. Por el contrario, varios estudios han referido la existencia de una reducción en el número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, en una proporción variable, pero minoritaria (6%-25%)<sup>378,379</sup> de los casos, y claramente inferior a la observada entre pacientes con IDVC (56-81%)<sup>286-290</sup>. Esta alteración se ha relacionado en una serie limitada de pacientes (n=28) con un comportamiento clínico más grave, incluyendo una mayor frecuencia de neumonía (3,3% vs. 0,5%), bronquiectasias (57% vs. 5%), esplenomegalia (43% vs. 0%), adenopatías (71% vs. 9%), autoinmunidad (57% vs. 14%), y evolución a IDVC<sup>379</sup>; sin embargo, 3 de los 7 casos con números reducidos de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo estudiados en este trabajo presentaban también cifras séricas reducidas de algunas subclases de IgG<sup>379</sup>, y no todos los autores han podido confirmar estas asociaciones<sup>378</sup>. En un estudio más reciente, se ha mostrado además que este descenso podría deberse a una reducción preferencial de linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup>, que según estos autores solo estarían presentes en <10% de los pacientes<sup>380</sup>. Además, en los pacientes con déficit selectivo de IgA también se han observado otras alteraciones celulares descritas en la IDVC, como la reducción en SP del número de CPs con



cambio de isotipo ( $\approx 0,3\%$  vs.  $\approx 0,5\%$  del total de linfocitos B en donantes sanos) o el aumento del número de linfocitos B CD21<sup>-</sup> circulantes ( $\approx 9\%$  vs.  $\approx 6\%$  del total de linfocitos B en donantes sanos)<sup>378</sup>. No obstante, dichas alteraciones siempre serían menos significativas que las observadas en pacientes con IDVC, que de forma sistemática (94% de los casos) carecerían de CPs circulantes con cambio de isotipo y que mostrarían un incremento relativo mayor de linfocitos B CD21<sup>-</sup> ( $\approx 18\%$  del total de linfocitos B)<sup>378</sup>.

Al igual que ocurre con las alteraciones en los linfocitos B, la información disponible acerca del estado y de las alteraciones de otras poblaciones leucocitarias en pacientes con déficit selectivo de IgA, es de momento muy limitada. Aunque algunos autores no han identificado alteraciones en los linfocitos T de SP de pacientes con déficit selectivo de IgA<sup>381</sup>, otros han descrito un descenso del número de células T CD4<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> naïve<sup>300,375</sup> y/o un aumento de las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de memoria terminalmente diferenciadas<sup>300</sup>. De forma similar a lo descrito en la IDVC, también se ha observado que los pacientes con déficit selectivo de IgA pueden presentar un descenso en el número de células T reguladoras, especialmente en aquellos casos en los que existen manifestaciones clínicas de autoinmunidad<sup>382</sup>; sin embargo, estos hallazgos no han podido ser confirmados por otros autores, que incluso refieren un aumento de estas células<sup>300,381</sup>.

#### **4.4.1.5. Alteraciones funcionales asociadas a déficit selectivo de IgA**

Desde el punto de vista funcional, los linfocitos B de pacientes con déficit selectivo de IgA muestran una menor respuesta tras estimulación *in vitro* con CpG y/o CD40L, consistente en: i) menor capacidad de diferenciación a CP; ii) menor respuesta proliferativa; y iii) menor producción *in vitro* de Acs de isotipo IgA<sup>380,383</sup>. Sin embargo, se ha demostrado también que los linfocitos B de individuos asintomáticos con déficit selectivo de IgA serían capaces de producir niveles de IgA similares a los de los linfocitos B de donantes sanos, tras estimulación *in vitro*<sup>383</sup>.

#### 4.4.2. Déficit de subclases de IgG asociado o no a déficit de IgA

El déficit de subclases de IgG se describió por primera vez en 1970, en un grupo de pacientes con infecciones recurrentes y niveles normales de IgG<sup>384</sup>. Según la ESID, para el diagnóstico de este subtipo de IDP-Ac deben cumplirse los siguientes criterios<sup>11</sup>: i) presencia de infecciones recurrentes; ii) niveles séricos bajos de una o más subclases de IgG; iii) niveles séricos de IgG total e IgM normales; y iv) respuesta IgG normal a (algunas) vacunas; v) una vez se hayan excluido defectos en células T. Sin embargo, al igual que ocurre con el déficit selectivo de IgA, algunos sujetos que presentan déficit de subclases de IgG son totalmente asintomáticos<sup>214,385</sup>. En este sentido, cabe señalar que dado que existen cambios en los niveles séricos de las distintas subclases de IgG con la edad (tal como hemos revisado anteriormente en esta introducción), la utilización de valores de referencia según la edad resulta especialmente relevante y necesaria en este grupo de pacientes<sup>214,386</sup>.

En términos generales, el déficit de subclases de IgG puede estar asociado o no a un déficit de IgA<sup>387</sup>, considerándose actualmente ambas entidades, tanto por parte de la ESID<sup>11</sup> como de la IUIS<sup>209</sup>, como dos entidades distintas, a pesar de ser clínicamente similares: a) déficit aislado de subclases de IgG y b) déficit de IgA asociado a déficit de subclases de IgG. Aunque no se conoce la prevalencia exacta del déficit de subclases de IgG, se estima que el 15-20% de los déficits de IgA tienen asociado un déficit en una o más subclases de IgG<sup>387,388</sup>. En este sentido merece destacar que el déficit en subclases de IgG, además de estar frecuentemente asociado al déficit de IgA, puede afectar a más de una subclase de IgG<sup>388</sup>. De todas las subclases de IgG la que se ve afectada con mayor frecuencia es la IgG4 ( $\approx$ 41%), seguida de la IgG2 ( $\approx$ 28%) y la IgG3 ( $\approx$ 17%)<sup>214</sup>, siendo el déficit aislado de IgG1, por definición, menos prevalente, debido a que un déficit de esta subclase suele provocar un déficit global de los niveles de IgG total<sup>214</sup>. En la mayoría de individuos sintomáticos que presentan déficit de subclases de IgG existe un defecto de IgG2 (combinado o no con déficit de IgA), que se asocia con infecciones respiratorias (87-100%), causadas principalmente por *H.influenza* y/o *S.pneumoniae*<sup>389-391</sup>, debido al importante

papel de la IgG2 en la defensa frente a polisacáridos; además, estos pacientes también padecen con relativa frecuencia infecciones cutáneas (6-9%)<sup>392,393</sup> y gastrointestinales (5-9%)<sup>392,393</sup>, además de enfermedades autoinmunes (12-37%)<sup>285,394,395</sup>.

Aunque en casos aislados de déficit de subclases de IgG se han encontrado delecciones en las regiones correspondientes del gen *IGHC*<sup>396,397</sup>, en la actualidad seguimos sin conocer el origen de esta inmunodeficiencia, debido en parte, al escaso número de estudios inmunológicos realizados y su prevalencia relativamente baja. Aun así, recientemente se han descrito alteraciones en las poblaciones de linfocitos B similares a las observados en la IDVC (descenso de células pre-CG y de linfocitos B de memoria con y sin cambio de isotipo) en 7/21 casos analizados (30% vs. 80% de los pacientes con IDVC)<sup>285</sup>. Otras células del sistema inmune, como las células NK y las células dendríticas también parece que podrían estar afectadas, al menos en parte de los pacientes que presentan déficit de subclases de IgG<sup>285</sup>.

En aquellos casos que tienen infecciones recurrentes se recomienda el uso profiláctico de antibióticos<sup>385</sup>, mientras que la terapia con Igs de sustitución solo está indicada cuando las manifestaciones clínicas son muy severas/graves. Además, debe realizarse un seguimiento estrecho de todos estos pacientes, debido a la posibilidad de que evolucionen a IDVC<sup>385</sup>.

#### **4.4.3. Otros déficits funcionales B, de isotipo IgM y de cadena ligera kappa**

Dentro de las IDP-Ac, además de los subtipos principales de enfermedades descritas en apartados anteriores de esta introducción, se incluyen otras entidades menos prevalentes y/o de significado clínico menos relevante, entre las que merece destacar el déficit de cadena ligera kappa, el déficit de Acs específicos, la hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia y el déficit selectivo de Ig, que revisaremos de forma breve a continuación.

**Déficit de cadena ligera kappa.** Se trata de una inmunodeficiencia en la que se observa un uso restringido de la cadena ligera lambda, debido a una alteración genética de tipo

autosómica recesiva en la región constante de la cadena ligera kappa de las Igs<sup>398,399</sup>. En general, los pacientes con déficit de cadena ligera kappa son pacientes asintomáticos, aunque en ocasiones esta alteración se asocia con otros defectos inmunológicos, como déficit selectivo de IgA y/o autoinmunidad<sup>399,400</sup>.

**Déficit de anticuerpos específicos.** Los pacientes que presentan deficiencias de Acs específicos muestran habitualmente cifras normales de todas las Igs séricas, asociadas a un defecto en la respuesta Ag-específica, generalmente frente a polisacáridos<sup>388,401</sup>, lo cual provoca que padezcan infecciones recurrentes, habitualmente en forma de infecciones respiratorias de tipo bacterianas. En ocasiones esta inmunodeficiencia se resuelve con el tiempo, especialmente cuando se diagnostica en niños<sup>401</sup>.

**Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia.** Esta entidad se define por la existencia de cifras bajas de IgG e IgA séricas en niños a partir de los 6 meses de edad y que suelen recuperarse hasta alcanzar valores normales, alrededor de los 2 años de vida<sup>402</sup>. La mayoría de estos niños presentan una respuesta a vacunación normal y son asintomáticos, aunque en ocasiones se han descrito infecciones recurrentes, especialmente infecciones de tipo respiratorio<sup>403</sup>. A pesar de que son muy limitados los estudios fenotípicos realizados en estos niños, en ellos no se han descrito alteraciones claras en los distintos compartimentos celulares analizados, compatibles con IDVC<sup>377</sup>. Por ello, ante la sospecha (o el diagnóstico) de hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, debe hacerse un seguimiento estrecho del niño, con el fin de descartar pueda evolucionar a otras inmunodeficiencias como un déficit selectivo de IgA o una IDVC<sup>214,388,402</sup>.

**Déficit selectivo de IgM.** Los pacientes con déficit selectivo de IgM se caracterizan por mostrar cifras séricas bajas o ausentes de IgM, con niveles normales de IgA e IgG. Aunque algunos pacientes son asintomáticos, en general presentan mayor incidencia de infecciones bacterianas, especialmente de infecciones respiratorias<sup>404,405</sup>, asociadas a una reducción

significativa del número de los linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup>, sin que existan alteraciones importantes en el compartimento de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo<sup>377,404</sup>.



# Hipótesis de trabajo y objetivos





Las IDP-Ac son un grupo heterogéneo y relativamente numeroso de enfermedades caracterizadas por la existencia de distintas alteraciones en la respuesta de los linfocitos B. En conjunto, constituyen >50% de las IDP, siendo la IDVC el subtipo de IDP-Ac más importante desde el punto de vista clínico, y el déficit selectivo de IgA la entidad más prevalente. En países occidentales, la IDVC afecta a 1:25.000-50.000 individuos y se caracteriza por un descenso en los niveles séricos de IgG e IgA, acompañados o no de descenso de IgM<sup>11,231,236,246</sup>. Este déficit de Igs séricas se asocia a infecciones recurrentes, además de otras complicaciones debidas entre otros trastornos a autoinmunidad, organomegalias, granulomas y enteropatía, que terminan por condicionar una menor calidad de vida y una supervivencia significativamente acortada<sup>231,236,247,256</sup>. A su vez, el déficit selectivo de IgA, se estima afecta a 1:600 individuos en países occidentales y se define por la existencia de un descenso en los niveles séricos de IgA, en ausencia de alteraciones en los demás isotipos o subclases de Ig<sup>11,13</sup>. Aunque una parte importante de los individuos que presentan déficit selectivo de IgA permanecen asintomáticos, otros sufren infecciones recurrentes y autoinmunidad, pudiendo en ocasiones evolucionar a IDVC<sup>13,329,332,343-345,354,355</sup>. Con menor frecuencia, se observan pacientes con IDP-Ac en los que existe un descenso selectivo de una o más subclases de IgG1-4, con niveles normales de IgG total (déficit de subclases de IgG)<sup>11,213,388</sup>; este déficit de subclases de IgG puede ocurrir de forma aislada o asociado a un déficit de IgA, estimándose que el 15-20% de todos los déficits de IgA tienen asociado un déficit de una o más subclases de IgG<sup>12</sup>. Aunque en algunos pacientes el déficit de subclases de IgG cursa de forma asintomática, de forma similar a lo que ocurre en el déficit selectivo de IgA, otros presentan infecciones (especialmente respiratorias) y autoinmunidad<sup>385,389,391,394,395</sup>.

De lo anteriormente expuesto se deduce que, en la actualidad, la determinación de los niveles séricos de Acs constituye un marcador de referencia para el diagnóstico y clasificación de los tres subtipos más prevalentes y/o clínicamente relevantes de IDP-Ac antes referidos, además de proporcionar información clínicamente relevante para el manejo de otras

enfermedades relacionadas con la respuesta inmune como infecciones, autoinmunidad, alergia, neoplasias de CPs e inmunodeficiencias secundarias<sup>406,407,16</sup>. No obstante, los niveles séricos de Acs pueden no reflejar de forma adecuada el estado actual de la respuesta B y la capacidad funcional de los linfocitos B. Por un lado, la mayoría de los Acs séricos son producto de las CPs de vida larga acumuladas, en ocasiones durante décadas, en los nichos de supervivencia de la MO y el MALT<sup>53,19,408,409</sup>. Además, tradicionalmente estas CPs son meras fábricas de Acs y no responden frente a un nuevo contacto con el Ag, por lo que no reflejan la capacidad del compartimento B del sistema inmune de responder frente a nuevos Ags o frente a Ags con los que ya ha contactado previamente, funciones que recaen sobre los linfocitos B naïve y linfocitos B de memoria, respectivamente<sup>53,106</sup>. De hecho, estas limitaciones de los niveles de Acs séricos se extienden desde el punto de vista clínico a las IDP-Ac, ya que no permiten predecir con precisión el comportamiento clínico de los pacientes que, aun presentando los mismos defectos séricos, muestran manifestaciones clínicas muy distintas<sup>328,13,236,249,231</sup>. Precisamente por este motivo, se ha investigado la posible utilidad de otros parámetros para mejorar el diagnóstico y sobre todo la clasificación de pacientes con IDP-Ac, como la presencia de mutaciones genéticas y/o de alteraciones funcionales detectadas *in vitro*. No obstante, estas solo son aplicables a un número reducido de casos (<10%) y/o requieren de técnicas de laboratorio laboriosas y complejas, cuyos resultados no han podido ser validados clínicamente<sup>231,305,213,265,250</sup>.

En los últimos años, diferentes trabajos han demostrado la existencia de alteraciones que afectan a las poblaciones de linfocitos B circulantes de pacientes con IDVC, y en menor medida con déficit selectivo de IgA, detectables mediante citometría de flujo convencional<sup>137,196,250,281,284-288,290,292,378,379,410</sup>. Dichas anomalías incluyen sobre todo defectos numéricos en las poblaciones de células B en distintos estadios madurativos, especialmente en los linfocitos B de memoria que presentan cambio de isotipo<sup>137,250,284-288,378,379</sup>. Así, se ha demostrado que aquellos pacientes con IDP-Ac que muestran algún defecto en las distintas poblaciones de linfocitos B de SP presentan con mayor frecuencia manifestaciones clínicas,

entre las que se incluyen autoinmunidad, adenopatías, organomegalias y granulomas<sup>250,286,287,379</sup>. Sin embargo, los análisis realizados en estos estudios se han restringido a unos pocos compartimentos de linfocitos B, que incluyen los linfocitos inmaduros/transicionales y naïve, y los linfocitos B de memoria con y sin cambio de isotipo, además de los linfocitos B CD21<sup>+</sup>, siendo la sensibilidad de las técnicas empleadas limitada ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ )<sup>250,285-287,378-380</sup>. Así mismo, en la gran mayoría de trabajos referidos hasta la fecha en la literatura no se han utilizado valores de referencia por (grupo de) edad<sup>250,286,287,378,379</sup>, a pesar de que hay evidencias inequívocas sobre la existencia de importantes oscilaciones en el número de células B totales y sus distintas poblaciones madurativas a lo largo de la vida<sup>53,117,137,144,188,190,191,280</sup>.

De acuerdo con estos antecedentes, nos planteamos como **hipótesis** de trabajo de esta tesis doctoral que la determinación específica y sensible de un elevado número de subpoblaciones de linfocitos B identificadas por citometría de flujo, no solo según su estadio madurativo, sino también por el isotipo y subclase de Ig expresada, además de por otros marcadores funcionales, podría proporcionar información novedosa y útil acerca de las alteraciones de la respuesta B presentes en pacientes con IDP-Ac, complementaria a la derivada del estudio de los niveles séricos de Acs, y potencialmente útil para un diagnóstico y clasificación más precisos de las IDP-Ac.

De acuerdo con esta hipótesis, nos planteamos como **objetivo general** del presente trabajo desarrollar una metodología que permitiera analizar en profundidad el compartimento de linfocitos B de SP de individuos sanos a lo largo de la vida, incluyendo la distribución de las subpoblaciones de células B que expresan diferente isotipo y subclase de Ig, de cara a establecer con mayor precisión las posibles alteraciones de las células B y su utilidad en el diagnóstico y clasificación de este grupo de IDP. Para ello, planteamos tres **objetivos concretos**:

1.- Seleccionar y validar un amplio panel de Acs monoclonales para la detección específica y sensible mediante citometría de flujo, de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs de SP y otros tejidos humanos, que expresan diferentes subclases de IgG e IgA.

2.- Analizar la distribución en sangre de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs, además de los compartimentos de linfocitos B inmaduros/transicionales y naïve, a lo largo de la vida, desde el momento del nacimiento hasta la vejez.

3.- Definir las posibles alteraciones que afectan a las distintas poblaciones de linfocitos B y CPs de SP, incluyendo las definidas en base al isotipo y subclase de Ig expresada, en pacientes con IDVC, déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA y déficit selectivo de IgA, y evaluar su posible utilidad en el diagnóstico y clasificación de estos subtipos de IDP-Ac.





# Materiales, métodos y resultados





En esta sección de la memoria se describen las muestras (pacientes y donantes sanos), materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo doctoral, mediante la inclusión de los artículos originales publicados y en revisión, en relación con los objetivos planteados. Cada uno de los artículos viene precedido de un resumen redactado en castellano para facilitar una revisión rápida de la información contenida en los mismos. Los artículos incluidos en el presente apartado son:

1.- En relación con la selección y validación de un amplio panel de Acs monoclonales para la detección específica y sensible mediante citometría de flujo, de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs de SP y otros tejidos humanos, que expresan diferentes subclases de IgG e IgA (**Objetivo 1**):

**Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells.**

Elena Blanco, Martin Perez-Andres, Luzalba Sanoja-Flores, Marjolein Wentink, Ondrej Pelak, Marta Martín-Ayuso, Georgiana Grigore, Juan Torres-Canizales, Eduardo López-Granados, Tomas Kalina, Mirjam van der Burg, Sonia Arriba-Méndez, Santiago Santa Cruz, Noemí Puig, Jacques J.M. van Dongen, Alberto Orfao, on behalf of the EuroFlow PID group. *Journal of Immunological Methods*. 2017 Sep 28. doi: 10.1016/j.jim.2017.09.008.

2.- En relación con el análisis de la distribución en sangre a lo largo de la vida, de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs, además de los compartimentos de linfocitos B inmaduros/transicionales y naïve (**Objetivo 2**):

**Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood.**

Elena Blanco, Martín Pérez-Andrés, Sonia Arriba-Méndez, Teresa Contreras-Sanfeliciano, Ignacio Criado, Ondrej Pelak, Ana Serra-Caetano, Alfonso Romero, Noemí Puig, Ana Remesal, Juan Torres Canizales, Eduardo López-Granados, Tomas Kalina, Ana E. Sousa, Menno Van Zelm,

Mirjam Van der Burg, Jacques J.M. van Dongen, Alberto Orfao, on behalf of the EuroFlow PID group. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 2018 Mar 2. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.017.

3.- En relación con la identificación de las posibles alteraciones que afectan a las distintas poblaciones de linfocitos B y CPs de SP, incluyendo las definidas en base al isotipo y subclase de Ig expresada, en pacientes con IDVC, déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA y déficit selectivo de IgA, y su posible utilidad en el diagnóstico y clasificación de estos subtipos de IDP-

Ac (**Objetivo 3**):

**Dissection of defects in memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin subclasses provides basis for (new) re-classification of CVID and Ig-subclass deficiencies.**

Elena Blanco, Martín Pérez-Andrés, Sonia Arriba-Méndez, Cristina Serrano, Lucía del Pino-Molina, Susana Silva, Ignacio Criado, Ignacio Madruga, Ana Serra Caetano, Teresa Contreras-Sanfeliciano, Francisco Sala, Alejandro Martín, José María Bastida, Félix Lorente, Carlos Prieto, Ignacio Dávila, Miguel Marcos, Tomas Kalina, Marcela Vlkova, Carolien Bonroy, Jan Philippé, Eduardo López-Granados, Ana E. de Sousa, Mirjam van der Burg, Jacques J.M. van Dongen, Alberto Orfao, on behalf of the EuroFlow PID group. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (sometido para publicación y en revisión).

# Artículo 1

## **Selección y validación de clones de anticuerpos dirigidos frente a subclases de IgA e IgG expresadas en linfocitos B de memoria y células plasmáticas que presentan cambio de isotipo**

Elena Blanco<sup>1</sup>, Martín Perez-Andres<sup>1</sup>, Luzalba Sanoja-Flores<sup>1</sup>, Marjolein Wentink<sup>2</sup>, Ondrej Pelak<sup>3</sup>, Marta Martín-Ayuso<sup>4</sup>, Georgiana Grigore<sup>4</sup>, Juan Torres-Canizales<sup>5</sup>, Eduardo López-Granados<sup>5</sup>, Tomas Kalina<sup>3</sup>, Mirjam van der Burg<sup>2</sup>, Sonia Arriba-Méndez<sup>6</sup>, Santiago Santa Cruz<sup>7</sup>, Noemí Puig<sup>8</sup>, Jacques J.M. van Dongen<sup>9</sup>, Alberto Orfao<sup>1</sup>, por el grupo de inmunodeficiencias primarias de EuroFlow (EuroFlow PID).

<sup>1</sup>Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España.

<sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Centro Médico de la Universidad Erasmus, Rotterdam, Países Bajos.

<sup>3</sup>Departamento de Hematología/Oncología, 2ª Facultad de Medicina, Universidad Charles, Praga, República Checa.

<sup>4</sup>Cytognos S.L., Salamanca, España.

<sup>5</sup>Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario La Paz, Grupo de Fisiopatología de Inmunodeficiencias, Instituto para la investigación de la Salud IdiPAZ, Madrid, España.

<sup>6</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario, Salamanca, España.

<sup>7</sup>Servicio de otorrinolaringología, Hospital Universitario, Salamanca, España.

<sup>8</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario, Salamanca, España.

<sup>9</sup>Departamento de Inmuno-Hematología y Transfusión de Sangre, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países bajos.

*Journal of Immunological Methods*

Septiembre de 2017

DOI: 10.1016/j.jim.2017.09.008

La información suplementaria correspondiente a este artículo está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el anexo II y el CD-ROM adjuntos al final de la presente memoria.

**Introducción.** Hace más de 20 años, la IUIS junto con la OMS realizaron estudios cooperativos multicéntricos, con el fin de validar un gran número de clones de Acs para la detección específica y sensible de los distintos isotipos de Igs y de las subclases de IgG e IgA, mediante un amplio abanico de técnicas. Esta labor de estandarización permitió establecer la utilidad clínica de los niveles de las subclases IgG1-4 e IgA1-2, además de los isotipos de Igs, en suero y otros fluidos corporales. Sin embargo, estos trabajos no testaron la capacidad de estos reactivos para identificar las subclases IgG1-4 e IgA1-2 en la superficie de los linfocitos B. Aunque posteriormente algunos ensayos locales han demostrado que sería posible reconocer las subclases de Igs expresadas por los linfocitos B, el número de reactivos testado hasta el momento de realizar este trabajo era muy limitado, sin que existieran métodos validados clínicamente que permitieran analizar de forma rutinaria la expresión de estas subclases de Igs en distintas localizaciones celulares (citoplasma vs. membrana), en linfocitos B en diferentes estadios madurativos, en SP y otros tejidos humanos.

**Objetivo.** Seleccionar y validar un amplio panel de clones de Acs comercialmente disponibles para la detección mediante citometría de flujo de las distintas subclases de IgG e IgA en linfocitos B de memoria y CPs de SP y otros tejidos humanos.

**Muestras, materiales y métodos.** En una primera fase, evaluamos la capacidad de identificar las Igs expresadas en la superficie de los linfocitos B y CPs en la SP de 39 donantes sanos de un total 28 clones de Acs distintos que habían sido previamente validados para la detección y cuantificación de Acs séricos de distintas subclases de IgG e IgA. Los distintos clones de Acs seleccionados en la fase anterior fueron validados posteriormente en 19 muestras de SP, 12 muestras de MO y 3 muestras de amígdala procedentes de voluntarios sanos. Para el procesamiento de las muestras empleamos los protocolos estandarizados por el consorcio europeo EuroFlow ([www.euroflow.org](http://www.euroflow.org)). En todos los casos, para la evaluación de los Acs específicos de las distintas subclases de IgG e IgA, se emplearon combinaciones de estos Acs con otros reactivos que permitían la identificación simultánea de linfocitos B

inmaduros/transicionales, linfocitos B naïve y de memoria, y de CPs circulantes, separando dentro de las dos últimas poblaciones celulares, las células que presentaban cambio de isotipo de las que seguían expresando IgM y/o IgD. El análisis de las muestras marcadas se realizó en citómetros de flujo Fortessa X-20 y FACSCanto II.

**Resultados.** Solamente 17 de los 28 clones de Acs evaluados mostraron reactividad frente a las distintas subclases de IgG e IgA expresadas en la membrana de linfocitos B y CPs, incluyendo 4 clones dirigidos frente a IgG1 (SAG1, HP6188, HP6001 y HP6186), 3 frente a IgG2 (SAG2, HP6014 y HP6002), 3 frente a IgG3 (SAG3, HP6095 y HP6050), 1 frente a IgG4 (SAG4), 3 frente a IgA1 (SAA1, H69-11.4 y B3506B4) y 3 frente a IgA2 (SAA2, 2E2 y A9604D2). En un segundo paso, seleccionamos un único clon para cada una de las subclases de Ig, de acuerdo a la especificidad e intensidad de fluorescencia observadas y la disponibilidad de reactivos conjugados directamente con fluorocromos técnicamente compatibles. Los 6 clones seleccionados, específicos de las distintas subclases de IgG<sub>1-4</sub> (SAG1, SAG2, SAG3 y SAG4) e IgA1-2 (SAA1 y SAA2), fueron validados en 4 laboratorios diferentes evaluando: 1) la posible reactividad cruzada entre ellos, es decir, comprobando que era mutuamente excluyentes; 2) el marcaje en tejidos humanos distintos de la SP, incluyendo MO y amígdala; y 3) su capacidad para identificar las subclases de IgG e IgA expresadas, tanto a nivel de la superficie celular, como a nivel citoplasmático. En todos los tejidos evaluados, los 6 clones seleccionados mostraron un marcaje intenso en la membrana citoplasmática, en ausencia de reactividad cruzada entre ellos, independientemente del tejido analizado. El marcaje citoplasmático para las células B de memoria IgG1, IgG2 e IgG3 fue más débil que el observado en la superficie externa de la membrana citoplasmática, mientras que para IgA1, IgA2 e IgG4, la intensidad de fluorescencia obtenida con ambos protocolos fue similar. A su vez, las CPs mostraron, de forma sistemática, mayor intensidad de marcaje citoplasmático vs. membrana para todas las subclases de Ig.

**Conclusiones.** Tras evaluar un amplio panel de Acs dirigidos frente a las distintas subclases de IgG e IgA, pudimos seleccionar 6 clones que mostraban una elevada positividad y especificidad

a la hora de identificar las diferentes poblaciones de células B que expresan cada una de las distintas subclases de IgG e IgA. Además, nuestros resultados mostraron que, el uso de los clones de Acs seleccionados, en combinación con otros marcadores de linfocitos B y protocolos de procesamiento de muestras previamente validados, proporcionan una herramienta robusta que permite la identificación y cuantificación rápida (<3 horas), y sensible (<math>10^{-5}</math>) de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs definidas por la expresión de diferentes isotipos y subclases de Igs (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1-2) en diferentes tejidos humanos, con una manipulación mínima de las muestras.

Material eliminado para la versión almacenada en el repositorio del Ministerio de Educación  
por estar sujeto a copyright.





## Artículo 2

### Distribución en sangre de las distintas subpoblaciones de linfocitos B y de células plasmáticas normales a lo largo de la vida

Elena Blanco<sup>1</sup>, Martín Perez-Andrés<sup>1</sup>, Sonia Arriba-Mendez<sup>2</sup>, Teresa Contreras-Sanfeliciano<sup>3</sup>, Ignacio Criado<sup>1</sup>, Ondrej Pelak<sup>4</sup>, Ana Serra-Caetano<sup>5</sup>, Alfonso Romero<sup>6</sup>, Noemí Puig<sup>7</sup>, Ana Remesal<sup>2</sup>, Juan Torres Canizales<sup>8</sup>, Eduardo Lopez-Granados<sup>8</sup>, Tomas Kalina<sup>4</sup>, Ana E. Sousa<sup>5</sup>, Menno van Zelm<sup>9</sup>, Mirjam van der Burg<sup>10</sup>, Jacques J. M. van Dongen<sup>11</sup>, Alberto Orfao<sup>1</sup>, por el grupo de inmunodeficiencias primarias de EuroFlow (Euroflow PID).

<sup>1</sup>Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España.

<sup>2</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>3</sup>Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>4</sup>Departamento de Hematología/Oncología, 2ª Facultad de Medicina, Universidad Charles, Praga, República Checa.

<sup>5</sup>Instituto de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal.

<sup>6</sup>Centro de Salud Miguel Armijo, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Salamanca, España.

<sup>7</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>8</sup>Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario La Paz, Grupo de Fisiopatología de Inmunodeficiencias, Instituto para la investigación de la Salud IdiPAZ, Madrid, España.

<sup>9</sup>Departamento de Inmunología y Patología, Universidad Monash y Hospital Alfred, Melbourne, Victoria, Australia.

<sup>10</sup>Departamento de Inmunología, Centro Médico de la Universidad Erasmus, Rotterdam, Países Bajos.

<sup>11</sup>Departamento de Inmuno-Hematología y Transfusión de Sangre, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países bajos.

*Journal of Allergy and Clinical Immunology*

Marzo de 2018

DOI: 10.1016/j.jaci.2018.02.017

La información suplementaria correspondiente a este artículo está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el anexo II y el CD-ROM adjuntos al final de la presente memoria.

**Introducción.** Los niveles solubles de Igs presentes en suero cambian a lo largo de la vida y contribuyen a la diferente susceptibilidad que presenta cada individuo a padecer infecciones, inmunodeficiencia, autoinmunidad y/o cáncer. Por todo ello, los niveles de Acs se han empleado a lo largo de los años para evaluar la respuesta humoral por parte de los linfocitos B, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. No obstante, la mayoría de estas Igs tiene su origen en CPs de vida larga que se encuentran en la MO donde se acumulan durante años, lo que hace que los niveles de Acs presentes en suero no reflejen el estado real de los linfocitos B en ese momento. Por otro lado, se ha observado que las poblaciones mayoritarias de linfocitos B inmaduros/transicionales, naïve y de memoria presentes en SP sufren cambios en su distribución y concentración con la edad, especialmente durante los dos primeros años de vida. Pese a todo lo anterior, en la actualidad no existe ningún estudio en el que se analicen los cambios en las distintas poblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs, a lo largo de la vida.

**Objetivo.** En este trabajo nos propusimos evaluar la distribución en sangre de los distintos compartimentos madurativos de células B, incluidas las diferentes subpoblaciones de linfocitos B de memoria y de CPs que expresan los distintos isotipos y subclases de Igs, a lo largo de la vida.

**Muestras, materiales y métodos.** En conjunto analizamos un total de 19 muestras de sangre de cordón umbilical y 215 muestras de SP de voluntarios sanos, sin antecedentes de enfermedades hematológicas y/o inmunológicas. Según su edad, los voluntarios sanos se agruparon en: 12 recién nacidos (menores de 12 días), 11 niños de entre 1 y 5 meses, 7 de entre 6 y 11 meses, 12 de entre 12 y 17 meses, 12 de entre 18 y 23 meses, 25 de entre 2 y 4 años y 22 niños de entre 5 y 9 años, 14 sujetos de entre 10 y 17 años, 32 adultos de entre 18 y 39 años, 27 de entre 40 y 59 años, 27 de entre 60 y 79 años, y 12 adultos con más de 80 años. Para el análisis de las subpoblaciones de células B, se marcaron las muestras con un panel de Acs conjugados con 12 fluorocromos diferentes, dirigidos frente a las distintas subpoblaciones B y los diferentes isotipos y subclases de Igs empleando protocolos validados previamente. Para ello se midieron

un mínimo de 5 millones de leucocitos (incluyendo  $\geq 100.000$  linfocitos B) en un citómetro de flujo Fortessa X-20. Además, en 18 muestras de sangre de cordón y en 201 muestras de SP (incluyendo donantes de todos los grupos de edad), se midieron los niveles solubles en plasma de Acs de distinto isotipo y subclase de Ig, mediante técnicas de nefelometría/turbidimetría.

**Resultados.** El número de linfocitos B totales en sangre aumentó de forma significativa desde edades muy tempranas, alcanzando su nivel máximo a los 1-5 meses; posteriormente, el número de linfocitos B descendió de forma gradual hasta la edad adulta, manteniéndose estable a partir de ahí hasta edades ya avanzadas ( $> 80$  años). Los números de linfocitos B inmaduros y naïve en sangre, mostraron un perfil muy similar al descrito anteriormente, alcanzando su nivel más elevado entre los 1 y 11 meses de edad, y sin que se observasen diferencias significativas entre adultos jóvenes y mayores.

A su vez, los linfocitos B de memoria aumentaron progresivamente desde el recién nacido hasta los 2-4 años de edad, momento en el que empezaron a descender hasta los 10-17 años; en adultos, el número de linfocitos B de memoria se mantuvo estable hasta los 60 años, descendiendo posteriormente de forma paulatina. Pese a este perfil global, cuando analizamos de forma individual cada población de linfocitos B de memoria, observamos patrones muy diferentes en función del isotipo y subclase de Ig expresada. Así, a diferencia de los linfocitos B de memoria CD27<sup>-</sup> con cambio de isotipo, presentes ya en sangre de cordón umbilical y en recién nacidos, las células de memoria IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup> solo se hacían detectables a partir de los 1-5 meses de edad, permaneciendo su número relativamente estable hasta los 2-4 años; por el contrario, los linfocitos B de memoria IgD<sup>+</sup> alcanzaron su nivel más elevado en niños de 2-4 años. A su vez, los linfocitos B de memoria que expresaban IgG3, IgG1 e IgA1 (subclases de Igs codificadas en el segundo bloque del gen *IGHC*) alcanzaban sus valores máximos en sangre entre los 2 y 4 años de vida, mientras que los linfocitos B de memoria que expresaban IgG2, IgG4 e IgA2 (subclases de Igs codificadas en el tercer bloque del gen *IGHC*) seguían aumentando en SP hasta la edad adulta.

Respecto a las CPs, aunque se encontraban ausentes en sangre de cordón umbilical, eran detectables ya en la mayoría (79%) de recién nacidos, en los que estaban mayoritariamente integradas por CPs IgM<sup>+</sup>. Las CPs IgM<sup>+</sup>, IgG1<sup>+</sup>, IgG2<sup>+</sup>, IgG3<sup>+</sup>, IgA1<sup>+</sup> e IgA2<sup>+</sup> aumentaron exponencialmente después del nacimiento hasta los 6-11 meses, edad en la que se alcanzaron cifras ≈10 veces superiores a las del adulto, debido a que disminuían progresivamente a partir del año de vida. Las CPs IgD<sup>+</sup> e IgG4<sup>+</sup> mostraron niveles máximos en niños de entre 2 y 5 años y de entre 5 y 9 años, respectivamente. Estos números reflejan una producción masiva de CPs en edades tempranas de la vida, con un descenso a partir de la infancia, lo que les confiere una cinética claramente distinta de la observada para las correspondientes Igs solubles, excepto en el caso de la IgD, cuyo valor máximo en plasma se alcanzó también a los 2-4 años de vida, al igual que ocurría con el pico de las CPs y de los linfocitos B de memoria IgD<sup>+</sup>. Los niveles plasmáticos de IgM aumentaron ya en niños de 1-5 meses, manteniéndose relativamente estables a partir de esa edad. Respecto a las subclases de IgG, sus niveles eran ya elevados en el plasma de recién nacidos debido a la IgG de origen materno, sufriendo durante el primer año un descenso transitorio. A partir de aquí, los niveles de IgG aumentaron significativamente alcanzando la IgG3 e IgG1 sus valores máximos a los 5-9 años, mientras que la IgG2 y la IgG4 solo alcanzaron sus niveles más elevados en plasma en adultos de 18-39 años. De forma similar, los niveles solubles de IgA1 en plasma alcanzaron valores máximos de forma más rápida (pico máximo a los 10-17 años) que los de IgA2 (valores máximos a los 40-39 años). Una vez alcanzados los valores máximos de las distintas Igs, estos se mantuvieron relativamente estables a lo largo de la vida hasta edades superiores a los 80 años.

**Conclusiones.** El pico de producción de las CPs precede en años, o incluso décadas, al de los linfocitos B de memoria y al de los niveles solubles de Igs, constituyendo un marcador (en tiempo real) del estado exacto de la respuesta B. Además, las subpoblaciones de linfocitos B de memoria y CPs que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs muestran una cinética muy diferente en sangre a lo largo de la vida, según el bloque del gen *IGHC* en el que están codificadas; esto

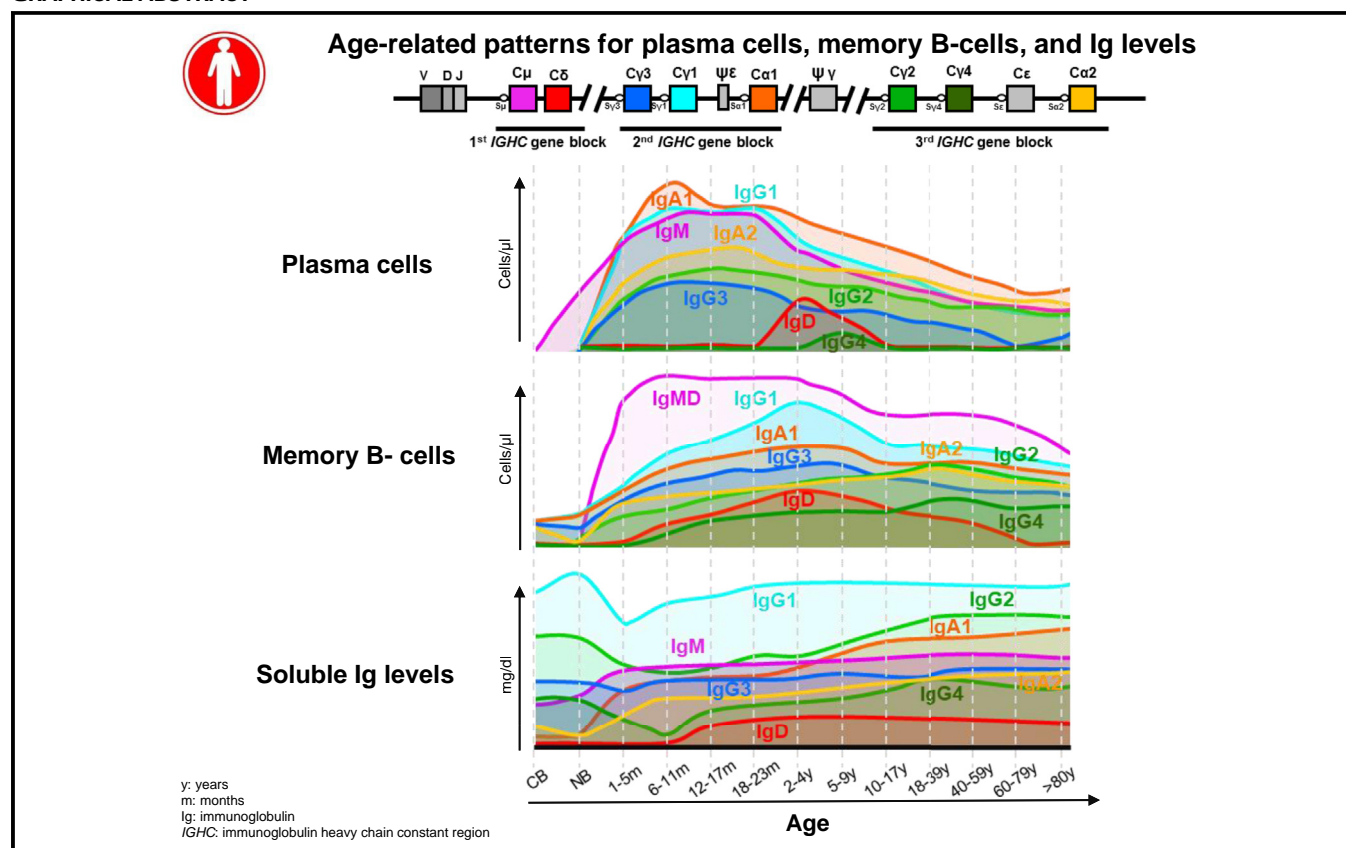
probablemente refleja la ocurrencia de ciclos consecutivos de cambio de isotipo tras sucesivos reencuentros con Ags, generando un acúmulo de linfocitos B de memoria de isotipos más tolerogénicos (i.e. IgG2 e IgG4) a medida que avanza la edad. Por otra parte, estos resultados proporcionan un marco de referencia para el estudio de las poblaciones de linfocitos B durante el envejecimiento y en enfermedades del sistema inmune, especialmente en inmunodeficiencias, inflamación, alergia, autoinmunidad e infecciones.



# Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood

Elena Blanco, MSc,<sup>a</sup> Martín Pérez-Andrés, PhD,<sup>a</sup> Sonia Arriba-Méndez, MD, PhD,<sup>b</sup> Teresa Contreras-Sanfeliciano, MD,<sup>c</sup> Ignacio Criado, MSc,<sup>a</sup> Ondrej Pelak, PhD,<sup>d</sup> Ana Serra-Caetano, MSc,<sup>e</sup> Alfonso Romero, MD,<sup>f</sup> Noemí Puig, MD, PhD,<sup>g</sup> Ana Remesal, MD,<sup>b</sup> Juan Torres Canizales, MD,<sup>h</sup> Eduardo López-Granados, MD, PhD,<sup>h</sup> Tomas Kalina, MD, PhD,<sup>d</sup> Ana E. Sousa, MD, PhD,<sup>f</sup> Menno van Zelm, PhD,<sup>i,j</sup> Mirjam van der Burg, PhD,<sup>j</sup> Jacques J. M. van Dongen, MD, PhD,<sup>k</sup> and Alberto Orfao, MD, PhD,<sup>a</sup> on behalf of the EuroFlow PID group Salamanca and Madrid, Spain, Prague, Czech Republic, Lisbon, Portugal, Melbourne, Australia, and Rotterdam and Leiden, The Netherlands

## GRAPHICAL ABSTRACT



From <sup>a</sup>the Department of Medicine, Cancer Research Centre (IBMCC, USAL-CSIC), Cytometry Service (NUCLEUS), University of Salamanca (USAL), the Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, and the Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC) Instituto de Salud Carlos III, Madrid; <sup>b</sup>Servicio de Pediatría, <sup>c</sup>Servicio de Bioquímica Clínica, and <sup>d</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; <sup>e</sup>CLIP, Department of Haematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague; <sup>f</sup>Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisbon; <sup>g</sup>Centro de Salud Miguel Armiño, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Salamanca; <sup>h</sup>Departamento de Inmunología, Hospital Universitario La Paz, Madrid; <sup>i</sup>the Department of Immunology and Pathology, Monash University and Alfred Hospital, Melbourne; <sup>j</sup>the Department of Immunology, Erasmus University Medical Center (Erasmus MC), Rotterdam; and <sup>k</sup>the Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center.

E.B. was supported by a grant from Junta de Castilla y León (Fondo Social Europeo, ORDEN EDU/346/2013, Valladolid, Spain). This work was supported by the CB16/12/00400 grant (CIBERONC, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain, and FONDOS FEDER) and the FIS P112/00905-FEDER grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain). O.P. and T.K. were supported by the Ministry of Education,

Youth and Sports (NPU I no. LO1604 and 15-28541A). The coordination and innovation processes of this study were supported by the EuroFlow Consortium.

Disclosure of potential conflict of interest: E. Blanco, M. Pérez-Andrés, E. López-Granados, T. Kalina, M. van Zelm, M. van der Burg, J. J. M. van Dongen, and A. Orfao each report being one of the inventors on the EuroFlow-owned patent PCT/NL 2015/050762 (Diagnosis of primary immunodeficiencies), which is licensed to Cytognos, a company that pays royalties to the EuroFlow Consortium. M. van Zelm reports grants from the NHMRC and has a patent issued (EP 2780711 B1). J. J. M. van Dongen and A. Orfao report an Educational Services Agreement from BD Biosciences. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication July 27, 2017; revised December 15, 2017; accepted for publication February 5, 2018.

Corresponding author: Alberto Orfao, MD, PhD, Department of Medicine, Cancer Research Center, University of Salamanca, Paseo de la Universidad de Coimbra s/n, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: orfao@usal.es.

0091-6749

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.017>

**Background:** Humoral immunocompetence develops stepwise throughout life and contributes to individual susceptibility to infection, immunodeficiency, autoimmunity, and neoplasia.

Immunoglobulin heavy chain (IgH) isotype serum levels can partly explain such age-related differences, but their relationship with the IgH isotype distribution within memory B-cell (MBC) and plasma cell (PCs) compartments remains to be investigated.

**Objective:** We studied the age-related distribution of MBCs and PCs expressing different IgH isotypes in addition to the immature/transitional and naive B-cell compartments.

**Methods:** B-cell and PC subsets and plasma IgH isotype levels were studied in cord blood (n = 19) and peripheral blood (n = 215) from healthy donors aged 0 to 90 years by using flow cytometry and nephelometry, respectively.

**Results:** IgH-switched MBCs expressing IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA<sub>1</sub>, and IgA<sub>2</sub> were already detected in cord blood and newborns at very low counts, whereas CD27<sup>+</sup>IgM<sup>++</sup>IgD<sup>+</sup> MBCs only became detectable at 1 to 5 months and remained stable until 2 to 4 years, and IgD MBCs peaked at 2 to 4 years, with both populations decreasing thereafter. MBCs expressing IgH isotypes of the second immunoglobulin heavy chain constant region (*IGHC*) gene block (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, and IgA<sub>1</sub>) peaked later during childhood (2-4 years), whereas MBCs expressing third *IGHC* gene block immunoglobulin isotypes (IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub>, and IgA<sub>2</sub>) reached maximum values during adulthood. PCs were already detected in newborns, increasing in number until 6 to 11 months for IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA<sub>1</sub>, and IgA<sub>2</sub>; until 2 to 4 years for IgD; and until 5 to 9 years for IgG<sub>4</sub> and decreasing thereafter. For most IgH isotypes (except IgD and IgG<sub>4</sub>), maximum plasma levels were reached after PC and MBC counts peaked.

**Conclusions:** PC counts reach maximum values early in life, followed by MBC counts and plasma IgH isotypes. Importantly, IgH isotypes from different *IGHC* gene blocks show different patterns, probably reflecting consecutive cycles of IgH isotype switch recombination through life. (J Allergy Clin Immunol 2018;■■■:■■■-■■■.)

**Key words:** Immunoglobulins, IgH isotype, subclass, memory B cells, plasma cells, flow cytometry, reference ranges, normal B cells, age-related values

Serum immunoglobulin levels are widely accepted as the most reliable surrogate marker for B-cell functionality in healthy donors and patients with different immune-related diseases.<sup>1-6</sup> Thus, reference serum immunoglobulin values per age group have been generally adopted as the measure of changes in B-cell immunocompetence through life.<sup>7-17</sup>

Overall, increasing serum immunoglobulin levels are observed with age, although patterns vary for the distinct immunoglobulin heavy chain (IgH) isotypes and subclasses. At birth, serum contains low IgM and IgA levels, whereas maternal immunoglobulin molecules provide near-adult levels of serum IgG.<sup>13-15,18</sup> Once maternal antibodies are cleared, the infant's antibody responses are initially dominated by IgM, and serum IgM, IgG, and IgA values reach approximately 100%, 60%, and 30% of adult levels by the first year of life, respectively.<sup>14,15</sup> Total serum IgG levels gradually increase at early ages; however, different production patterns are observed for the 4 IgG subclasses.<sup>16,17</sup>

#### Abbreviations used

BM:	Bone marrow
CB:	Cord blood
IgH:	Immunoglobulin heavy chain
<i>IGHC</i> :	Immunoglobulin heavy chain constant region
MBC:	Memory B cell
PB:	Peripheral blood
PC:	Plasma cell
RT:	Room temperature
sm:	Surface membrane
SSC:	Side scatter

Although IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub> levels increase faster and reach adult-like concentrations at 5 to 10 years of age, IgG<sub>2</sub> production is delayed, with maximum levels at adulthood.<sup>16,17</sup> Similarly, production of IgG<sub>4</sub> appears to be delayed, but reference values per age group vary significantly among healthy subjects.<sup>16,17</sup> Furthermore, both IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub> levels increase gradually during childhood,<sup>8,19,20</sup> reaching maximum IgA<sub>1</sub> production around the second decade of life, whereas IgA<sub>2</sub> serum levels keep increasing throughout adulthood.<sup>12</sup> Finally, IgE serum levels peak around 10 years and decrease thereafter to adult levels.<sup>21</sup> A common feature for all serum IgH isotype subclasses (except for IgD, IgG<sub>4</sub>, and IgE) is that their levels accumulate with age.<sup>7,8,11,12,16</sup> Once maximum levels are reached, serum IgH isotype subclass levels remain remarkably stable, without significant changes in older subjects.<sup>18</sup>

In contrast to serum immunoglobulin levels, more dynamic changes have been observed for total B-cell numbers and the composition of the B-cell compartment in peripheral blood (PB). Early studies reported that total B-cell counts increase 2-fold immediately after birth, remain high until 2 years, and gradually decrease approximately 6.5-fold until adulthood.<sup>22</sup> Detailed immunophenotypic analyses demonstrated that the initial increase is mostly due to an increased B-cell production in bone marrow (BM) and release of high numbers of immature/transitional and naive B cells into PB, with maximum values at 0 to 12 months of age.<sup>23,24</sup> This early wave of recently produced B cells is followed by increased numbers of memory B cells (MBCs) that rapidly increase from 2 months of life, remain high until age 5 years, and gradually decrease thereafter to adult-like values.<sup>23-26</sup> During adulthood, the number of immature/transitional and naive B cells remains stable, whereas MBC and newly generated plasma cell (PC) counts gradually decrease in subjects older than 60 years.<sup>27,28</sup>

Thus far, accurate and robust detection of low PC counts in PB (eg, in infants) appeared to be a challenge,<sup>23,25,26</sup> and information on IgH isotypes and subclasses within MBC and PC subsets remains limited,<sup>27</sup> with absence of age-related reference values. Likewise, recent studies on antigen-experienced B cells expressing different IgH isotypes did not discriminate between MBCs and PCs<sup>25</sup> and/or did not provide data about the IgG<sub>1</sub> to IgG<sub>4</sub> and IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub> subclasses.<sup>24,26,27</sup>

Here we dissected the PB compartments of MBCs and PCs into 38 distinct subsets expressing different IgH isotypes and their subclasses and investigated their distribution in a large series of normal cord blood (CB) and PB from healthy European donors aged 0 to 90 years. Our ultimate goal was to define the kinetics of the different B-cell and PC subsets



through life and their correlation with plasma IgH isotype subclass levels.

## METHODS

### Samples

EDTA-anticoagulated CB ( $n = 19$ ) and PB samples from 215 healthy European Caucasian donors (aged 0-90 years) with no past history of immunologic or hematologic diseases (including allergy) were studied: newborns (<12 days; 14 cases); children aged 1 to 5 months (11 cases), 6 to 11 months (7 cases), 12 to 17 months (12 cases), 18 to 23 months (12 cases), 2 to 4 years (25 cases), 5 to 9 years (22 cases), and 10 to 17 years (14 cases); and adults aged 18 to 39 years (32 cases), 40 to 59 years (27 cases), 60 to 79 years (27 cases), and greater than 80 years (12 cases). All samples were collected after informed consent was provided by the subjects, their legal representatives, or both, according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committees of the participating centers (University of Salamanca, Salamanca, Spain; Charles University, Prague, Czech Republic; University of Lisbon, Lisbon, Portugal; and La Paz Hospital, Madrid, Spain).

All subjects were vaccinated following similar national vaccination schedules (European Centre for Disease Prevention and Control; <http://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Pages/Scheduler.aspx>). CB was from Spain, Portugal, and the Czech Republic, newborns and children aged 1 to 23 months were from Spain and the Czech Republic, and all cases older than 2 years were from Spain. Donors with any sign or suspicion of immunologic or hematologic diseases (including an abnormal infection rate or a known history of allergies) were excluded from the study. In addition, a questionnaire with environmental factors that could potentially affect development of the immune system,<sup>25,29,30</sup> was conducted in children less than 4 years of age ( $n = 36$ ), with no differences observed in the frequency of these factors among the age groups evaluated (see Table E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Also, the exact dates of different vaccinations received were collected in a subset of 72 children. Elderly donors (>80 years) were representative of a broader group of elderly persons in the Salamanca region (median life expectancy, 82 and 87 years for men and women, respectively).

### Multiparameter flow cytometric identification of B cells and their maturation-associated and immunoglobulin isotype subclass subsets

Samples were processed within less than 24 hours after collection;  $10^7$  cells per sample were stained with the EuroFlow 12-color IgH-isotype B-cell tube (see Table E2 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). IgH isotypes and subclasses were assessed in every sample by using surface membrane staining; in addition, in a subset of 6 children (age,  $3 \pm 5$  years) and 6 adults (age,  $33 \pm 8$  years) surface membrane plus cytoplasmic staining was done in parallel.

Both protocols were performed strictly according to the EuroFlow BulkLysis standard operating procedure, as previously described (a detailed protocol is provided in the Methods section in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org) and [www.EuroFlow.org](http://www.EuroFlow.org)).<sup>31,32</sup> A minimum of  $5 \times 10^6$  leukocytes (including  $\geq 10^5$  B cells) was acquired per tube with Fortessa X-20 or LSR II Flow Cytometers (BD Biosciences, San Jose, Calif), and FACSDiva software (BD Biosciences) was used. Instrument setup was standardized across laboratories according to the EuroFlow standard operating procedure<sup>33</sup> adapted for 12-color measurements. For data analysis, Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain) was used. Absolute counts were calculated by using a dual-platform assay.<sup>34</sup>

### Analysis of plasma IgH isotype subclass levels

Plasma from 18 CB and 201 PB samples from all age groups was obtained by means of sequential centrifugation of PB (800g for 10 minutes) and platelet-rich plasma (2000g for 5 minutes) and immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Soluble IgM, IgE, and IgG<sub>1</sub> to IgG<sub>4</sub> subclass levels

were measured by using conventional nephelometry (Dimension Vista; Siemens Healthcare, Erlanger, Germany), whereas IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, and IgD levels were measured by using the SPAPLUS turbidimetric system (Binding Site, Birmingham, United Kingdom). For samples with IgH isotype subclass concentrations of greater than the measurable range, appropriate dilutions were made.

### Statistical analyses

To assess statistical significance (set at  $P < .05$ ) of differences observed between distinct age groups, Mann-Whitney *U* and Wilcoxon tests for unpaired and paired (continuous) variables were used, respectively. For categorical variables, the Fisher exact test was applied (SPSS software, version 23; IBM, Armonk, NY).

## RESULTS

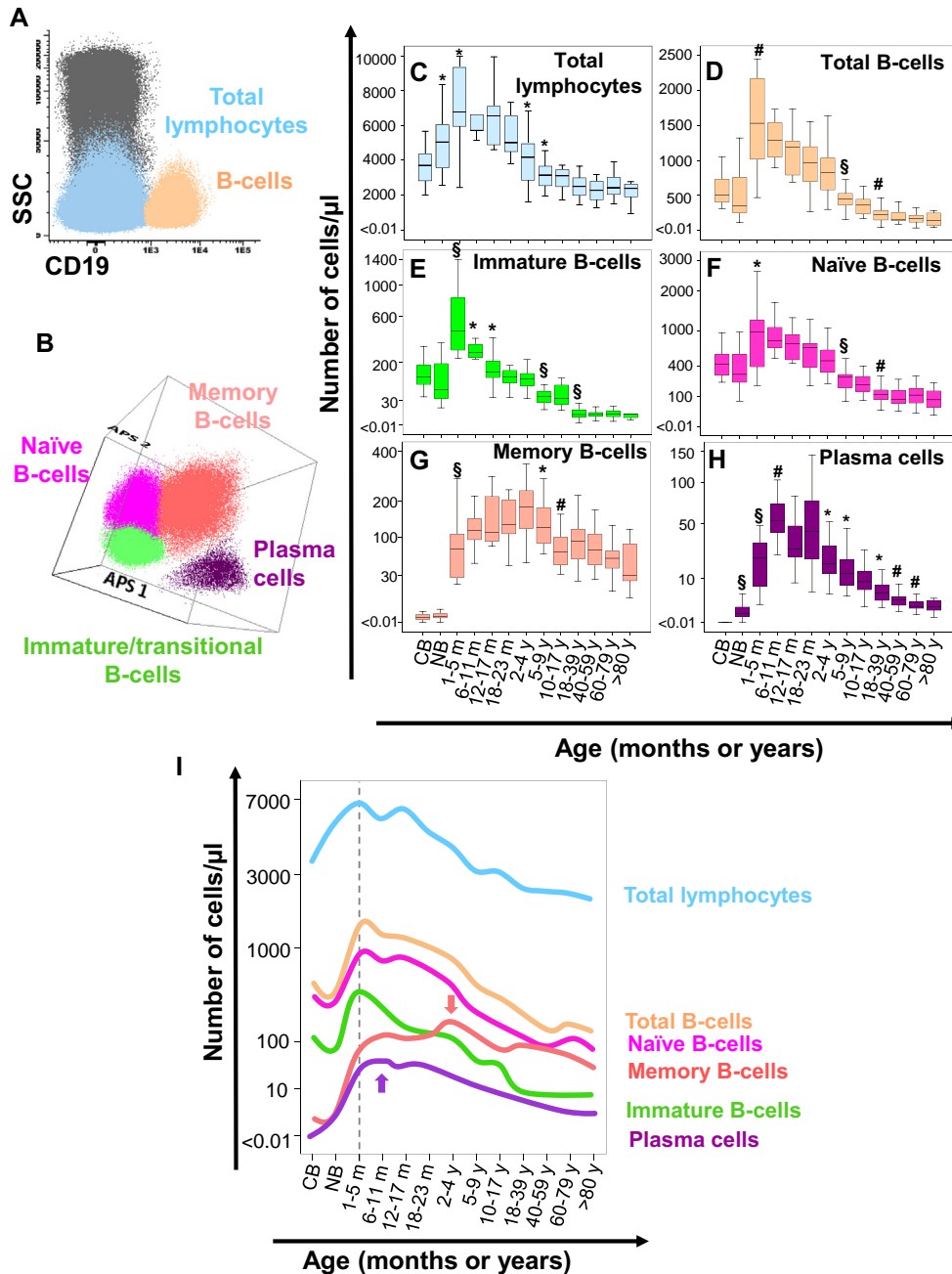
### Identification of maturation and isotypic subpopulations of PB B cells

Based on their staining pattern for CD19, CD27, CD38, CD5, CD24, CD21, surface membrane (sm) IgM, smIgD, and side scatter (SSC), B cells ( $\text{CD19}^+ \text{SSC}^{\text{lo/int}}$  forward scatter<sup>lo/int</sup> lymphocytes) were classified into maturation-associated subsets (Fig 1, A and B, and see Fig E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).<sup>27,35</sup> First, PCs were defined by a  $\text{CD38}^{++} \text{CD27}^+ \text{CD24}^- \text{CD21}^- \text{CD5}^- \text{CD19}^{\text{lo}} \text{SSC}^{\text{int}}$  phenotype. Then pre-germinal center B cells were identified by their unique  $\text{CD27}^- \text{smIgM}^+ \text{smIgD}^+ \text{CD5}^{\text{het}}$  features; this subset was subdivided subsequently into immature/transitional  $\text{CD38}^{\text{hi}} \text{CD24}^{\text{hi}} \text{smIgM}^{++} \text{IgD}^+$  B cells and  $\text{CD38}^- \text{CD24}^{\text{het}} \text{smIgM}^+ \text{IgD}^{++}$  naive B lymphocytes. Afterward, unswitched MBCs were identified by their unique  $\text{CD38}^{\text{lo}} \text{CD5}^- \text{CD27}^+ \text{smIgM}^{++} \text{IgD}^+$  phenotype, and switched MBCs were defined as  $\text{CD38}^{\text{lo}} \text{CD5}^- \text{smIgM}^- \text{IgD}^-$  B cells (see Fig E1). Despite CD10 being reported to identify immature/transitional B cells, the combination of markers used here has proved sufficient to discriminate reproducibly between mature and immature B cells.<sup>27,36</sup>

MBCs and PCs were further subclassified according to their smIgH phenotype into (1)  $\text{smIgM}^{++} \text{IgD}^+$ ,  $\text{smIgD}^+$ ,  $\text{smIgA}_1^+$ ,  $\text{smIgA}_2^+$ ,  $\text{smIgG}_1^+$ ,  $\text{smIgG}_2^+$ ,  $\text{smIgG}_3^+$ , and  $\text{smIgG}_4^+$  MBCs and (2)  $\text{smIgM}^+$ ,  $\text{smIgD}^+$ ,  $\text{smIgA}_1^+$ ,  $\text{smIgA}_2^+$ ,  $\text{smIgG}_1^+$ ,  $\text{smIgG}_2^+$ ,  $\text{smIgG}_3^+$ , and  $\text{smIgG}_4^+$  PCs, respectively (Fig 2, A and B, and Fig 2, D and E). All subsets of naive cells and MBCs were further subclassified according to CD21 expression, and the subset of switched MBCs was also further subdivided based on CD27 expression. Although a minor fraction of PCs did not show smIgH, no statistically significant differences were observed in the IgH isotype and subclass distribution of PCs when staining for smIgH was compared with cytoplasmic IgH, either in children ( $n = 6$ ) or adults ( $n = 6$ ), except for the percentage of  $\text{IgH}^-$  PCs, which was lower when cytoplasmic versus Sm staining was used (see Fig E2 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), which is in line with previous findings.<sup>32</sup>

### Kinetics of total B cells and maturation-associated B-cell subsets through life

Total lymphocyte and B-cell counts reached maximum levels at approximately 1 to 5 months of age. The total lymphocyte count increased progressively from CB to newborns and 1- to 5-month-old children, whereas B cells showed a slightly delayed

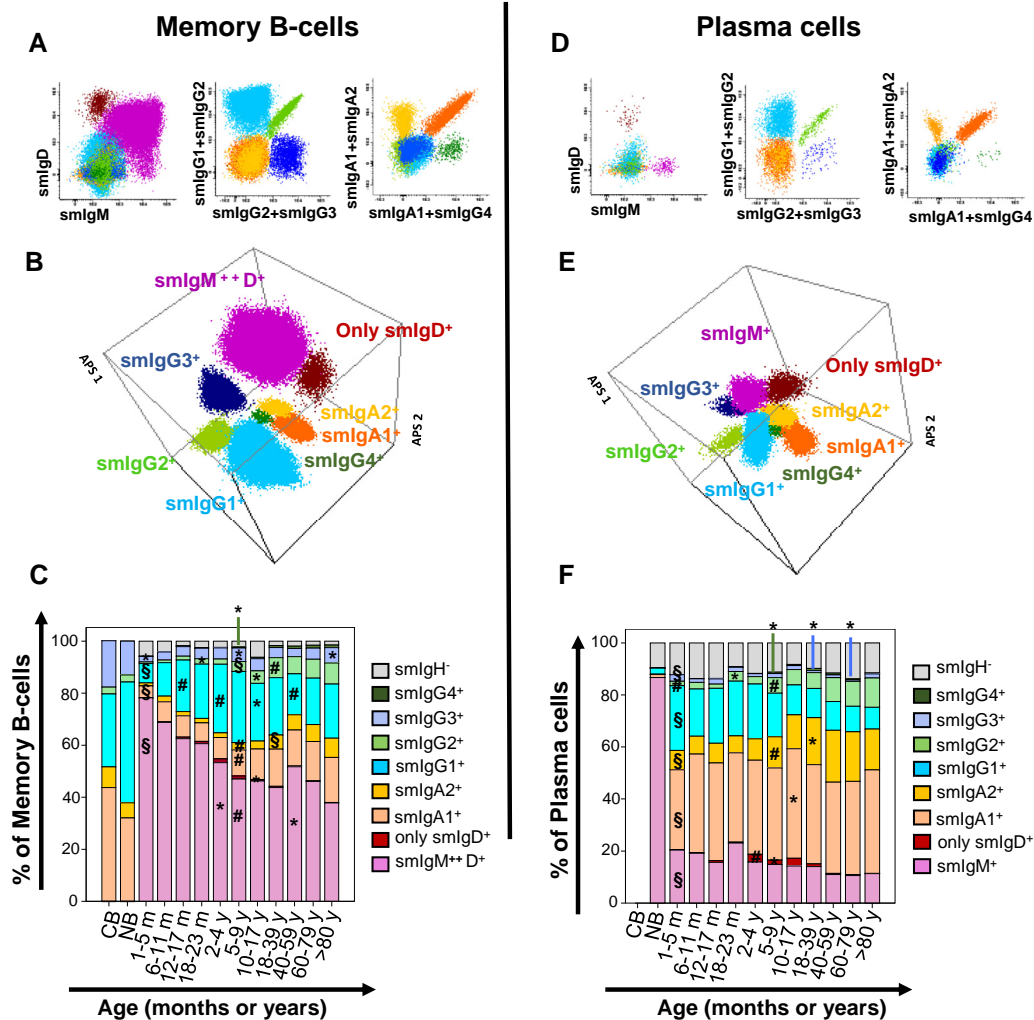


**FIG 1.** Age distribution of PB lymphocytes, total B cells, and maturation-associated B-cell subsets. **A**, Dot plot representation of total lymphocytes (blue) and B cells (light orange). **B**, Three-dimensional Automated Population Separator (APS) view: principal component 1 versus principal component 2 versus principal component 3. Graphic representation of the B-cell maturation-associated subsets is shown as follows: immature/transitional (green), naïve (pink), and MBCs (orange), and PCs (violet). The APS representation, which generates automatic separation of clusters of cells based on their immunophenotype, was used as a visualization tool. The gating strategy is described in Fig E1. **C-H**, Absolute counts (cells per microliter) of lymphocytes (Fig 1, C), total B cells (Fig 1, D), and maturation-associated B-cell subsets (Fig 1, E-H) present in CB and PB distributed by age. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; middle line corresponds to median values, and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. **I**, Lines link median values of total lymphocytes; total B cells, immature/transitional naïve MBCs, and PCs. \* $P < .05$ , # $P < .01$ , and \$ $P < .001$  versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.

significant increase during this period ( $P > .05$  for CB vs for newborns;  $P = .001$  for newborns vs 1- to 5-month-old children). Thereafter, absolute B-cell counts progressively decreased until adulthood (18 years), remaining relatively stable afterward

(Fig 1, C, D, and I, and see Table E3 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

Most CB B cells corresponded to immature/transitional and naïve B cells (Fig 1, E, F, and I, and see Table E3). Still, a minor



**FIG 2.** Distribution of different IgH isotype and subclass subsets of PB MBCs and PCs by age. **A** and **D**, Dot plot graphic representation of MBC (Fig 2, **A**) and PC (Fig 2, **D**) subsets expressing distinct smlgH isotypes and isotype subclasses: IgM(D<sup>+</sup>) (violet), IgG<sub>1</sub> (light blue), IgG<sub>2</sub> (light green), IgG<sub>3</sub> (dark blue), IgG<sub>4</sub> (dark green), IgA<sub>1</sub> (orange), IgA<sub>2</sub> (yellow), and IgD (brown); smlgH<sup>-</sup> B cells are highlighted in gray. **B** and **E**, Three-dimensional Automated Population Separator (APS) view: principal component 1 versus principal component 2 vs principal component 3 of the IgH isotype and subclass subsets of MBCs (Fig 2, **B**) and PCs (Fig 2, **E**) identified by the same color code as described above. The APS graphic representation, which generates automatic separation of clusters of cells based on their immunophenotype, was used as a visualization tool. **C** and **F**, Relative distribution of the distinct IgH isotype and subclass subsets of MBCs and PCs in the different age groups analyzed. \**P* < .05, #*P* < .01, and §*P* < .001 versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.

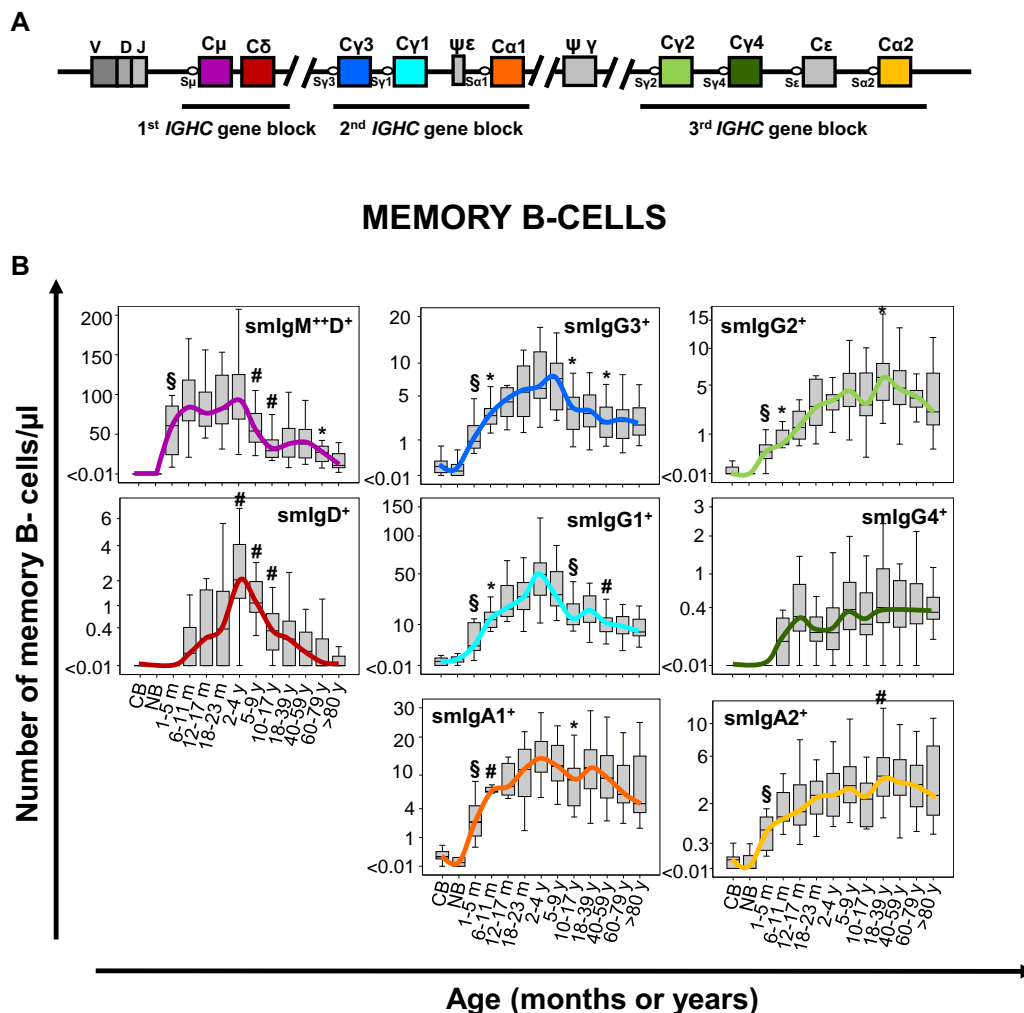
fraction of IgH-switched MBCs was detected in most CB (95% of subjects) in the absence of PCs ( $\leq 0.01$  PCs/ $\mu$ L; Fig 1, *G-I*, and see Table E3). Interestingly, although no significant differences were observed in immature/transitional, naive, and MBC numbers between CB and newborn samples, PCs became detectable at low numbers in most newborns ( $P < .001$ ). Through life, the number of PB immature/transitional and naive B cells showed a similar profile to that of total B cells, with a peak at 1 to 11 months ( $P \leq .001$  vs CB) and a progressively significant decrease until adulthood ( $P < .001$  vs 18- to 39-year-old subjects). Subjects older than 18 years showed relatively stable numbers of both immature/transitional and naive B cells (Fig 1, *E, F*, and *I*, and see Table E3).

MBC and PC counts increased from CB and newborn samples to 1- to 5-month-old children ( $P \leq .001$ ). PC counts already started to decrease in children older than 23 months ( $P = .03$ ), with a

gradually continued decrease through adulthood. In contrast, MBC counts increased gradually until age 2 to 4 years ( $P < .001$  vs 1- to 5-month-old children) followed by a decrease until a plateau was reached that lasted through adolescence (10-17 years) until adulthood (40-59 years); afterward, MBC counts progressively decreased ( $P = .02$  vs >80 years; Fig 1, *G* and *H*, and see Table E3).

### Age distribution of MBCs expressing distinct IgH isotypes and subclasses

Relative and absolute counts of MBCs expressing different IgH isotypes and subclasses varied significantly through life (Figs 2 and 3). smlgM<sup>++</sup>IgD<sup>+</sup> MBCs represented the largest fraction of MBCs (approximately 80%) in 1- to 5-month-old

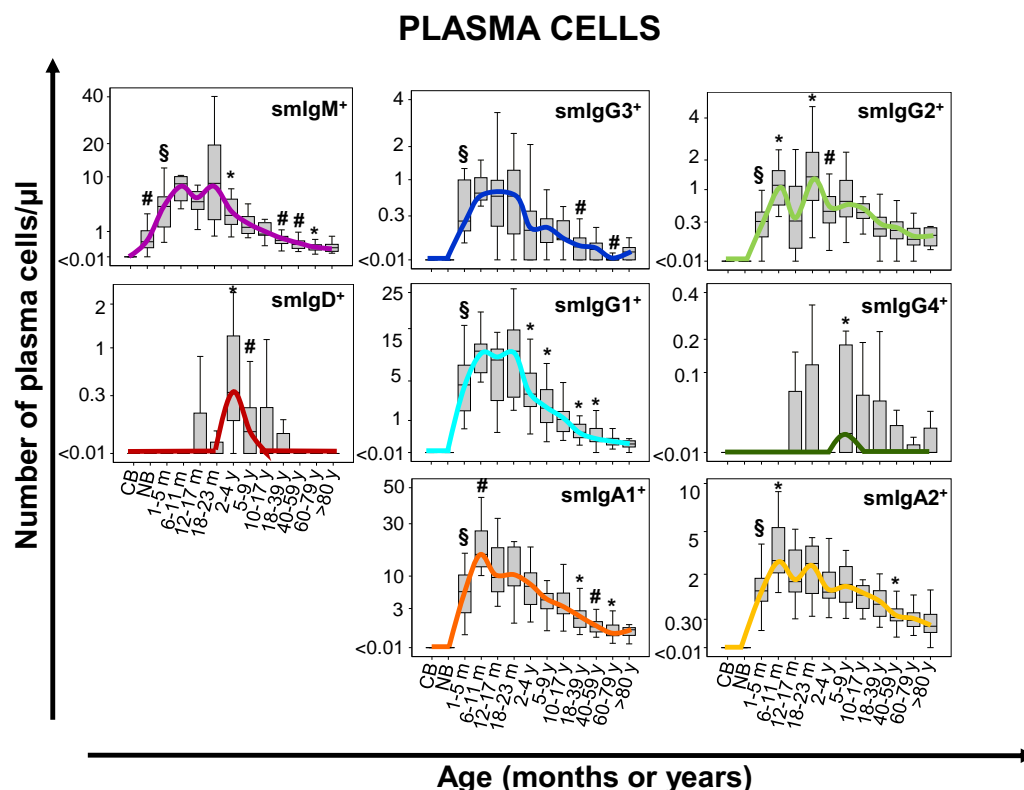


**FIG 3.** Absolute count of CB and PB IgH isotype and subclass subsets of MBCs in healthy subjects grouped by age. **A**, Schematic illustration of the human *IGH* gene constant region. **B**, Absolute number of different subsets of MBCs expressing distinct isotypes and subclasses in CB and PB according to age. *Notched boxes* represent 25th and 75th percentile values; *middle line* corresponds to median values, and *vertical lines* represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. *Colored lines* link median MBC absolute count values. \* $P < .05$ , # $P < .01$ , and \$ $P < .001$  versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.

children, being significantly expanded versus those in CB and newborns ( $P < .001$ ), with a subsequent decrease to 40% to 50% of MBCs. Conversely, smIgG<sub>1</sub><sup>+</sup>, smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup>, and smIgA<sub>1</sub><sup>+</sup> switched MBCs showed a transient relative decrease among 1- to 5-month-old children versus newborns ( $P \leq .01$ ), with their relative numbers increasing significantly at 6 to 11 months until 2 to 4 years for smIgG<sub>1</sub><sup>+</sup> ( $P = .001$  for 6-11 months vs 1-5 and 2-4 years vs 18-23 months) and at 5 to 9 years for smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup> ( $P = .02$ ), when they started to decrease, particularly in the transition to adulthood. In turn, the percentage of smIgA<sub>1</sub><sup>+</sup> MBCs increased progressively from 2 to 4 years until 10 to 17 years ( $P = .003$  for 2-4 years vs 5-9 years and  $P < .001$  for 2-4 years vs 10-17 years), remaining rather stable from then onward. In contrast, both smIgG<sub>2</sub><sup>+</sup> and smIgA<sub>2</sub><sup>+</sup> MBCs reached their highest representation in young (18-39 years) adults ( $P \leq .001$ ). During adulthood, no significant changes were observed in the relative distribution of most IgH subsets of MBCs, with a few exceptions (Fig 2, C).

Regarding absolute counts, very low numbers of MBCs were observed in CB and newborns, with similar frequencies of subjects with detectable IgH subsets of MBCs (see Table E4 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Subsequently, nonswitched smIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> MBCs became detectable at significantly increased counts among 1- to 5-month-old children ( $P = .001$ ), with numbers remaining fairly stable until 4 years and subsequently decreasing significantly to adult levels at 10 to 17 years ( $P < .002$ , Fig 3). After 60 years, progressively lower numbers of smIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> MBCs were observed ( $P = .002$  for 40-59 years vs >80 years). The smIgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> MBCs showed a very similar profile: increased counts until 2 to 4 years of age, which progressively decreased thereafter (Fig 3 and see Table E4).

In contrast, MBCs expressing smIgG<sub>3</sub>, smIgG<sub>1</sub>, and smIgA<sub>1</sub> (IgH isotype subclasses of the second immunoglobulin heavy chain constant region [*IGHC*] gene block) showed progressively higher counts until 2 to 4 years ( $P \leq .03$ ) and remained relatively



**FIG 4.** Absolute CB and PB counts of IgH isotype and subclass subsets of PCs in healthy subjects grouped by age. Absolute number of different subsets of PCs expressing distinct IgH isotypes and subclasses in CB and PB according to age. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; middle line corresponds to median values, and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. Colored lines link median PC absolute count values. \*\* $P < .05$ , # $P < .01$ , and \$ $P < .001$  versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.

stable until 10 to 17 years of age. Interestingly, although MBC counts with smIgG<sub>2</sub><sup>+</sup> and smIgA<sub>2</sub><sup>+</sup> expression (IgH isotype subclasses of the third *IGHC* gene block) also increased in childhood, these counts continued increasing until adulthood, with significantly higher counts among 18- to 39-year-old adults versus younger subjects ( $P = .03$  and  $P = .005$ , respectively). Despite representing a minor subset (<1% and <1 cell/μL for most donors), particularly among children, smIgG<sub>4</sub><sup>+</sup> MBCs peaked at 40 to 59 years (Fig 3 and see Table E4).

Interestingly, the immunophenotype of switched MBCs differed significantly between CB/newborns versus older children and adults. Thus although switched MBCs in CB and newborns lacked CD27, most MBCs from children older than 1 month and adults (80% to 90%) were CD27<sup>+</sup>. The percentage of CD27<sup>+</sup>smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup> MBCs also increased after the first month (40% to 60%), but the fraction of CD27<sup>+</sup> cells remained significantly greater ( $\geq 40\%$ ) in smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup> MBCs than in MBCs with other IgH isotype subclasses (see Fig E3 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Moreover, although CB and newborn MBCs were mostly CD21<sup>+</sup>, a significantly higher proportion of CD21<sup>-</sup> switched MBCs was observed among 1- to 11-month-old children versus all other age groups. In contrast, the percentage of CD21<sup>-</sup> naive B lymphocytes and CD21<sup>-</sup> smIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> MBCs remained low and relatively stable among all age groups. Similar to CD27, the

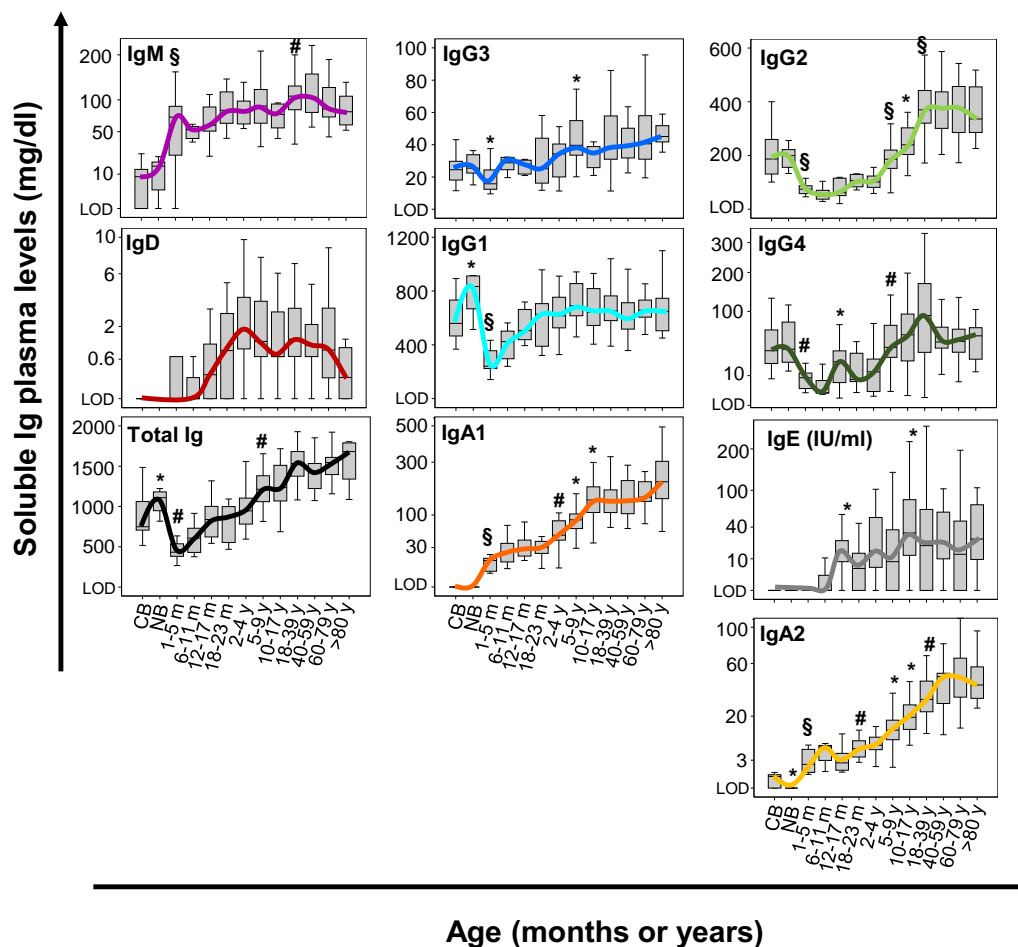
percentage of CD21<sup>-</sup> cells within smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup> MBCs was also greater than among MBCs expressing other smIgH isotype subclasses (see Fig E4 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

#### Age distribution of PC subsets expressing different IgH isotypes and subclasses

Despite their absence in normal CB, PCs were detected in most newborn samples (79%) and in all childhood and adult PB samples analyzed. In contrast to MBCs, PCs from newborns were mostly IgM<sup>+</sup> (68% to 96% of PCs), with only 7% to 25% of NBs showing smIgG<sub>1</sub><sup>+</sup> (range, 0% to 13%), smIgA<sub>1</sub><sup>+</sup> (range, 0% to 6.8%), smIgG<sub>2</sub><sup>+</sup> (range, 0% to 2.3%) and/or smIgA<sub>2</sub><sup>+</sup> PCs (range, 0% to 2.3%; Fig 2, F, and see Table E4).

Children at 1 to 5 months had greater percentages of smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup>, smIgG<sub>1</sub><sup>+</sup>, smIgA<sub>1</sub><sup>+</sup>, smIgG<sub>2</sub><sup>+</sup>, and smIgA<sub>2</sub><sup>+</sup> PCs than newborns ( $P \leq .003$ ), whereas the proportion of smIgM<sup>+</sup> PCs decreased at this age ( $P \leq .001$ ). Thereafter, the relative distribution of circulating PCs expressing different IgH isotypes and subclasses remained relatively stable, except for a transient increase in IgA<sub>1</sub><sup>+</sup> PC counts at 10 to 17 years, a decrease in IgG<sub>3</sub><sup>+</sup> PC counts in adults, and a progressive increment of smIgG<sub>2</sub><sup>+</sup> and smIgA<sub>2</sub><sup>+</sup> cell counts until 10 to 17 and 18 to 39 years, respectively (Fig 2, F). Finally, the relative number

## SOLUBLE Ig PLASMA LEVELS



**FIG 5.** Plasma levels of distinct soluble IgH isotypes and subclasses through life. Plasma levels of the distinct soluble IgH isotypes and subclasses are shown per age group. Total immunoglobulin (*Ig*), IgM, IgD, IgG, and IgA subclass concentrations are expressed in milligrams per deciliter, and IgE levels are expressed in international units per milliliter. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; middle line corresponds to median values, and vertical lines represent the highest and lowest values that are neither outliers nor extreme values. Colored lines link median values of sequential age groups. \* $P < .05$ , # $P < .01$ , and § $P < .001$  versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.

of smIgD<sup>+</sup> and smIgG<sub>4</sub><sup>+</sup> PCs was greater among 2- to 4-year-old ( $P = .001$ ) and 5- to 9-year-old children ( $P = .01$ ), respectively (Fig 2, F).

Regarding absolute counts, the number of PB smIgM<sup>+</sup> PCs increased significantly during the first year of life ( $P < .001$ ). Thereafter, smIgM<sup>+</sup> PCs decreased gradually from 1 to 2 years onward, reaching the lowest levels among adults older than 60 years. In contrast, IgD<sup>+</sup> PC numbers peaked at 2 to 4 years, progressively decreasing thereafter (Fig 4). Increased smIgG<sub>3</sub><sup>+</sup> and smIgG<sub>1</sub><sup>+</sup> PC counts were already detected among 1- to 5-month-old children ( $P \leq .001$ ). In turn, PCs expressing smIgA<sub>1</sub>, smIgA<sub>2</sub>, and smIgG<sub>2</sub> showed significantly increased counts from newborns to 6- to 11-month-old children ( $P \leq .02$ ). All these IgH-switched PC subsets decreased gradually in the transition from late childhood to adulthood. Finally, smIgG<sub>4</sub><sup>+</sup> PC numbers peaked at 5 to 9 years, decreasing thereafter (Fig 4 and see Table E4).

### Plasma levels of distinct IgH isotypes and subclasses through life

All IgG subclasses (IgG<sub>1</sub>-IgG<sub>4</sub>) were systematically detected already in CB and newborn plasma. In contrast, IgM and IgA<sub>2</sub> were detected in only a fraction of the CB (61% and 65% cases, respectively) and newborn (60% and 10% cases, respectively) plasma samples investigated; no IgA<sub>1</sub> or IgD plasma levels of greater than the limit of detection ( $>3.58$  and  $>0.66$  mg/dL, respectively) were found in newborn samples, and IgA<sub>1</sub> was found in only 1 CB sample. Later, soluble IgM, IgA<sub>1</sub>, and IgA<sub>2</sub> plasma levels became detectable systematically (except IgM in 1 donor) at higher levels among 1- to 5-month-old children ( $P \leq .004$ ); IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub> plasma levels gradually increased thereafter, whereas IgM plasma levels started to (slightly) decrease among 40- to 59-year-old adults. IgD plasma levels remained relatively stable through life until the age of 80 years. Regarding

the different IgG subclasses, a transient decrease in IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, and IgG<sub>4</sub> (but not IgG<sub>3</sub>) levels, as well as total immunoglobulin plasma levels, was observed during the first year of life, with the levels of all IgG subclasses and total immunoglobulin levels increasing thereafter until elderly age. Finally, IgE plasma levels peaked at 10 to 17 years, remaining relatively stable thereafter (Fig 5 and see Table E5 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

## DISCUSSION

Serum/plasma immunoglobulin levels have been used classically to define the ability (eg, protection against infection) or inability (eg, immunodeficiency) of B cells to mount effective and sustained immune responses. However, in recent years, increasing evidence indicates that a subgroup of long-lived PCs accumulate in the BM over years (or even decades) and are the major contributor to immunoglobulin plasma levels.<sup>18,27,37</sup> Moreover, comparison of B-cell numbers and serum antibody levels in infection models has shown that specific MBCs are more affected by age than serum antibody levels.<sup>38</sup> Therefore immunoglobulin levels in plasma might not reflect the actual status of the B-cell compartment in real time. Nevertheless, this hypothesis has not been fully confirmed, and direct detailed evaluation of the B-cell compartment through life has been only partially achieved.

Here we analyzed the distribution of 38 subsets of MBCs and PCs, including those expressing different IgH isotype subclasses, through life and their relationships with the corresponding IgH plasma levels. Only IgE MBCs and PCs, identification of which in PB of healthy (nonallergic) donors remains controversial,<sup>39-41</sup> could not be studied because of the absence of reliable and sensitive antibody reagents to detect them on the cell surface membrane in healthy subjects at very low levels,<sup>32</sup> despite several anti-IgE clones being tested here for analyses that included more than 100,000 B cells (data not shown).

In line with previous observations,<sup>42</sup> increased production of immature/transitional and naive B cells was observed during the first year of life. Afterward, BM production decreased progressively until adulthood, when immature/transitional and naive B-cell counts in PB stabilized. No further age-related differences were observed when young versus elderly adults were compared, as also reported by others.<sup>27</sup>

Although serologic studies in steady-state<sup>7-10,14-16,18</sup> and immunized<sup>43</sup> subjects suggest that children have a lower ability to produce PCs,<sup>44</sup> direct quantification of circulating PCs showed that PCs become detectable in newborns and are produced at massive levels in infants, when their PC counts are 10-fold greater than in young adults. Of note, no correlation was observed between the number of PCs and the vaccination schedule (data not shown), despite all infant but newborn samples were analyzed more than 8 days apart from the last vaccine. These results suggest that previously used methods to evaluate B-cell effector functions are probably biased by long-lived BM PC immunoglobulin production, and flow cytometry provides direct evaluation of the actual PC counts.<sup>28</sup> In this regard, circulating PCs are a very dynamic cell population with a high turnover rate<sup>27,28</sup> that might offer a closer view into ongoing B-cell responses. In fact, our results indicate that PC production precedes (the peak of) production of both MBCs and serum immunoglobulin levels by years or even decades, depending on the IgH isotype subclass evaluated (see Fig E5).

In line with this, new preliminary observations from our group indicate that the number of circulating normal PCs correlates with hypogammaglobulinemia, risk of infection, and BM PC production in both B-cell and PC neoplasms (Criado et al, unpublished data; Sanoja-Flores et al<sup>45</sup>). Therefore evaluation of PC counts in PB emerges as a surrogate marker for (future) PC production in BM and potentially also an early predictor of primary antibody deficiencies, particularly because the diagnosis of many primary antibody deficiencies is currently delayed to children 4 years old or older because of the slower constitution of antibody levels in serum.<sup>46,47</sup>

Of note, massive PC production associated with early (first) antigen stimulation of naive B cells does not translate into a parallel increase in corresponding antibody serum levels. Thus accumulation of long-lived PCs in BM, which are required to produce significant antibody serum levels, might still be limited in infants because of the intrinsic (pro)-apoptotic susceptibility of newly generated PCs,<sup>27,28</sup> the immaturity of the BM environment after birth,<sup>48</sup> and/or overfilling of BM by highly proliferating B-cell precursors during childhood,<sup>42</sup> which might occupy the BM survival niches for PCs. In turn, when significant levels of serum immunoglobulins are generated, decreased PC counts of the corresponding IgH isotype were observed, probably because of antibody-dependent modulation of B-cell responses.<sup>49,50</sup> Interestingly, immature/transitional and naive B-cell counts and IgH plasma levels remained stable through adulthood, whereas the number of PCs and MBCs decreased in the elderly versus younger adults, which is in line with previous findings.<sup>27,28</sup> The reduced ability to produce antigen-experienced B cells might explain why elderly subjects more frequently have severe infections and a lower capacity to produce antigen-specific antibodies after vaccination, despite having similar (even slightly higher) serum antibody levels versus younger adults<sup>44,51-54</sup>

Overall, the observed kinetics of the sequential waves of PCs, MBCs, and plasma IgH levels throughout life were influenced by the relative position of the IgH isotype/subclass gene segments within the *IGHC* locus. Thus IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub> production peaks appear to precede those of IgG<sub>2</sub> and IgG<sub>4</sub> for PCs (1-5 months vs 6-11 months and 5-9 years), MBCs (2-4 years vs 18-39 years), and serum antibody levels (5-9 years vs 18-39 years; see Fig E6 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Among IgA subclasses, no age-related differences were observed for the PC peaks (both detected in 6- to 11-month-old children), which could be due to the fast rate of IgA responses induced by massive gut bacterial colonization after birth.<sup>55</sup> Nevertheless, when IgA MBCs and IgA plasma levels were analyzed, we confirmed that IgA<sub>1</sub> MBC and serum IgA<sub>1</sub> levels increased faster than levels of their IgA<sub>2</sub> counterparts (2-4 years vs 18-39 years and 10-17 years vs 40-59 years, respectively). In line with these findings, previous reports indicate that IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub>, and IgA<sub>2</sub> show a greater number of mutated sequences and greater levels of antigen selection than IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA<sub>1</sub>,<sup>56,57</sup> supporting the notion that IgH isotypes encoded by the third block of the *IGHC* locus might, at least in part, be generated by secondary class-switch recombination events. Sequential production of different IgH isotypes might also influence the pattern of B-cell responses during life. Thus although IgH molecules from the first and second *IGHC* gene blocks (IgM and IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA<sub>1</sub>) show a higher ability for complement binding, opsonization, and triggering of natural killer cell-mediated cytotoxicity, those from the third block of the *IGHC* locus (IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub>, and IgA<sub>2</sub>)

have increased neutralization activity.<sup>58-60</sup> If such differences hold functional relevance, sequential production of distinct IgG and IgA subclasses through life might lead to a more tolerogenic response in adults versus children, with a potential for lower expansions of terminally switched MBCs with increasing age.

In addition to massive PC production during the first year of life, vaccination does not mount a sustained immune response in infants, particularly against encapsulated bacteria.<sup>44</sup> This suggests that the immaturity of the secondary B-cell response in infants might be related not only to a lower number of circulating MBCs but also to the ability of these MBCs to respond against different stimulatory conditions. In fact, MBCs from CB, newborns, and infants less than 2 years of age showed significant phenotypic differences to those of children older than 2 years and adults; such differences involved functional markers potentially associated with maturation of other cellular and soluble components of the immune system. Thus in line with the absence of organized germinal centers during fetal life and in newborns,<sup>61-63</sup> the very few switched MBCs detected in CB and newborns lacked CD27, a molecule that has been previously associated with T-dependent germinal center B-cell responses.<sup>35,64</sup> Further expansion of CD27<sup>+</sup> MBCs during the first year of life occurred in parallel with an increased proportion of CD21<sup>-</sup> (C3d receptor) MBCs with a limited ability to respond to polysaccharide-complement complexes.<sup>65,66</sup> The fact that within naive B cells the percentage of CD21<sup>-</sup> cells remains stable with age and shows a comparable *in vitro* response to polysaccharide antigens in children and adults<sup>67</sup> suggests that external factors affecting antigen recognition might increase the production of C3d receptor-deficient MBCs in children of around 1 year of age when serum C3 levels reach adult-like values.<sup>68</sup> Thus the limited availability of C3d and C3d-antigen complexes in infants less than 1 year old because low serum C3 levels<sup>69</sup> might contribute to reduced signaling for expression of this receptor during antigen recognition. In line with this, other age-related phenotypic subsets of MBCs have been previously reported, such as the “atypical” MBCs and the minor population of CD11c<sup>+</sup> (iC3b receptor) B cells,<sup>70-72</sup> which overlapped here with CD21<sup>-</sup> cells both in children and adults (see Fig E7 in this article’s Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), as well as in other studies.<sup>27</sup> Although we did not confirm here in human subjects previous observations about the potential expansion of atypical CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup> MBCs or other CD21<sup>-</sup> subsets of B cells in elderly subjects (see Fig E8 in this article’s Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), there might be additional phenotypic markers that might contribute to better understand B-cell immunity at advanced ages.

Altogether, these results suggest that maturation of other components of the immune response (eg, complement levels and germinal centers in lymphoid tissues) potentially contribute to determine the number of MBCs generated and their phenotype and consequently also their functional abilities. However, the effect of these environmental costimulatory signals might also be influenced by the position of the IgH isotype in the *IGHC* gene because, independent of age, a higher proportion of CD27<sup>-</sup> and CD21<sup>-</sup> MBCs was observed among those B-cell compartments expressing upstream IgH isotypes (eg, IgG<sub>3</sub>) versus those displaying IgH subclasses located at the end of the *IGHC* gene (eg, IgG<sub>2</sub>).

Overall, our results support the notion that despite serum IgH levels possibly provide important information about the long-lived steady-state PCs that accumulate in BM, they are not enough

to fully understand the humoral immunocompetence status of a subject. PCs in PB emerge as a robust earlier sensor of actual ongoing immune responses, whereas progressive accumulation of MBCs expressing IgH isotypes and subclasses encoded by the downstream part of the *IGHC* locus reflect potential terminal sequential class-switching and accumulation of MBCs expressing more tolerogenic isotypes at more advanced ages, as also confirmed by very preliminary data on longitudinal changes in children (see Fig E9 in this article’s Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Additionally, we provide normal reference values for PCs and MBCs expressing different IgH isotypes and subclasses that, once confirmed in larger longitudinal series of subjects from different genetic and geographic backgrounds, might be of value in future studies in patients with multiple disease conditions, particularly immunodeficiency, inflammation, allergy, autoimmunity, and infection.

#### Key messages

- Distinct age-related production patterns are observed for PCs, MBCs, and immunoglobulin plasma levels.
- PCs, MBCs, and antibodies of different IgH isotypes corresponding to the different *IGHC* gene blocks peak at distinct ages, likely reflecting consecutive cycles of IgH class-switch recombination through life.

#### REFERENCES

1. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014;5:162.
2. Ochs HD, Wedgwood RJ. IgG subclass deficiencies. *Annu Rev Med* 1987;38:325-40.
3. Siegrist C-A. General aspects of vaccination. *Vaccine Immunol* 2008;2:17-36.
4. Freeman JA, Crassini KR, Best OG, Forsyth CJ, Mackinlay NJ, Han P, et al. Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:99-104.
5. van den Wall Bake AW, Daha MR, van der Ark A, Hiemstra PS, Radl J, van Es LA. Serum levels and *in vitro* production of IgA subclasses in patients with primary IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 1988;74:115-20.
6. Zhang H, Li P, Wu D, Xu D, Hou Y, Wang Q, et al. Serum IgG subclasses in autoimmune diseases. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e387.
7. Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Borte M, Schubert S, Riedel F, et al. IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents. *Clin Chem* 2003;49:1924-9.
8. Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Borte M, Schubert S, Riedel F, et al. Establishment of age-dependent reference values for IgA subclasses. *Clin Chim Acta* 2003;328:129-33.
9. van der Giessen M, Rossouw E, van Veen T, van Loghem E, Zegers BJ, Sander PC. Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clin Exp Immunol* 1975;21:501-9.
10. Bird D, Duffy S, Isaacs D, Webster ADB. Reference children for IgG subclasses in preschool. *Arch Dis Child* 1985;60:204-7.
11. Haraldsson A, Weemaes CMR, Jonasdottir S, Olafsson O, Van De Wiel G, Goertz J, et al. Serum immunoglobulin D in infants and children. *Scand J Immunol* 2000;51:415-8.
12. Berth M, Delanghe J, Langlois M, De Buyzere M. Reference values of serum IgA subclasses in caucasian adults by immunonephelometry. *Clin Chem* 1999;45:309-10.
13. Stiehm ER, Fudenberg HH. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics* 1966;37:715-27.
14. Buckley RH, Dees SC, O’Fallon WM. Serum immunoglobulins. I. Levels in normal children and in uncomplicated childhood allergy. *Pediatrics* 1968;41:600-11.



15. Allansmith M, McClellan BH, Butterworth M, Maloney JR. The development of immunoglobulin levels in man. *J Pediatr* 1968;72:276-90.
16. Plebani A, Ugazio AG, Avanzini MA, Massimi P, Zonta L, Monafò V, et al. Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts. *Eur J Pediatr* 1989;149:164-7.
17. Vluc A, Nieuwenhuys EJ, van Eijk RV, Geertzen HG, van Houte AJ. Nephelometric measurements of human IgG subclasses and their reference ranges. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994;52:561-7.
18. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005;23:367-86.
19. Conley ME, Arbeter A, Douglas SD. Serum levels of IgA1 and IgA2 in children and in patients with IgA deficiency. *Mol Immunol* 1983;20:977-81.
20. Ozawa N, Shimizu M, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Selective absence of immunoglobulin A1 or A2 among blood donors and hospital patients. *Transfusion* 1986;26:73-6.
21. Martins TB, Bandhauer ME, Bunker AM, Roberts WL, Hill HR. New childhood and adult reference intervals for total IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:589-91.
22. Comans-Bitter WM, De Groot R, Van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood: Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997;130:388-93.
23. Piatosa B, Wolska-Kusnierz B, Pac M, Siewiera K, Galkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:372-81.
24. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol* 2009;133:95-107.
25. van den Heuvel D, Jansen MA, Nasserinejad K, Dik WA, van Lochem EG, Bakker-Jonges LE, et al. Effects of nongenetic factors on immune cell dynamics in early childhood: the Generation R Study. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1923-34.e17.
26. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 2010;162:271-9.
27. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-Cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:47-60.
28. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010;95:1016-20.
29. Jansen MAE, van den Heuvel D, van Zelm MC, Jaddoe VVW, Hofman A, de Jongste JC, et al. Decreased memory B cells and increased CD8 memory T cells in blood of breastfed children: the generation R study. *PLoS One* 2015;10:e0126019.
30. Carr EJ, Dooley J, Garcia-Perez JE, Lagou V, Lee JC, Wouters C, et al. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol* 2016;17:461-8.
31. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017;31:2094-103.
32. Blanco E, Perez-Andres M, Sanoja-Flores L, Wentink M, Pelak O, Martín-Ayuso M, et al. Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells. *J Immunol Methods* 2017 [Epub ahead of print].
33. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martín-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26:1986-2010.
34. Rudolf-Oliveira RCM, Goncalves KT, Martignago ML, Mengatto V, Gaspar PC, de Moraes ACR, et al. Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. *Immunol Lett* 2015;163:96-101.
35. Berkowska M, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 2011;118:2150-8.
36. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE, et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2011;105:4390-8.
37. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997;388:133-4.
38. van Twillert I, van Gaans-van den Brink JAM, Poelen MCM, Helm K, Kuipers B, Schipper M, et al. Age related differences in dynamics of specific memory B cell populations after clinical pertussis infection. *PLoS One* 2014;9:e85227.
39. Wong KJ, Timbrell V, Xi Y, Upham JW, Collins AM, Davies JM. IgE+ B cells are scarce, but allergen-specific B cells with a memory phenotype circulate in patients with allergic rhinitis. *Allergy* 2015;70:420-8.
40. Berkowska MA, Heeringa JJ, Hajdarbegovic E, Van Der Burg M, Thio HB, Van Hagen PM, et al. Human IgE+ B cells are derived from T cell-dependent and T cell-independent pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:688-97.e6.
41. Czarnowicki T, Gonzalez J, Bonifacio KM, Shemer A, Xiangyu P, Kunjraiva N, et al. Diverse activation and differentiation of multiple B-cell subsets in patients with atopic dermatitis but not in patients with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:118-29.e5.
42. Jensen K, Schaffer L, Olstad OK, Bechensteen AG, Hellebostad M, Tjonnfjord GE, et al. Striking decrease in the total precursor B-cell compartment during early childhood as evidenced by flow cytometry and gene expression changes. *Pediatr Hematol Oncol* 2010;27:31-45.
43. Blanchard Rohner G, Snape MD, Kelly DF, John T, Morant A, Yu L-M, et al. The magnitude of the antibody and memory B cell responses during priming with a protein-polysaccharide conjugate vaccine in human infants is associated with the persistence of antibody and the intensity of booster response. *J Immunol* 2008;180:2165-73.
44. Siegrist C-A, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol* 2009;9:185-94.
45. Sanoja-Flores L, Paiva B, Flores-Montero JA, Puig N, Burgos L, García O, et al. Next Generation Flow (NGF): a high sensitive technique to detect circulating peripheral blood (PB) clonal plasma cells (cPC) in patients with newly diagnosed plasma cell neoplasms (PCN). *Blood* 2015;126(23).
46. Grimbacher B. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry 2014. *Clin Exp Immunol* 2014;178(suppl):18-20.
47. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1161-78.
48. Pihlgren M, Friedli M, Toungne C, Rochat A-F, Lambert P-H, Siegrist C-A. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. *J Immunol* 2006;176:165-72.
49. Moller G, Wigzell H. Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced suppression of 19S and 7S antibody response. *J Exp Med* 1965;121:969-89.
50. Cerottini JC, McConahey PJ, Dixon FJ. The immunosuppressive effect of passively administered antibody IgG fragments. *J Immunol* 1969;102:1008-15.
51. Hannoun C, Megas F, Piercy J. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res* 2004;103:133-8.
52. Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 2006;24:1159-69.
53. Melegaro A, Edmunds WJ. The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Part II. A cost-effectiveness analysis for invasive disease in the elderly in England and Wales. *Eur J Epidemiol* 2004;19:365-75.
54. Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstein B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis* 2008;46:1078-84.
55. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;83:F186-92.
56. Collins AM, Jackson KJL. A temporal model of human IgE and IgG antibody function. *Front Immunol* 2013;4:1-6.
57. Jackson KJL, Wang Y, Collins AM. Human immunoglobulin classes and subclasses show variability in VDJ gene mutation levels. *Immunol Cell Biol* 2014;92:1-5.
58. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014;5:1-17.
59. Schroeder HWJ, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(suppl):S41-52.
60. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011;4:590-7.
61. Barzanji AJ, Emery JL. Germinal centers in the spleens of neonates and stillbirths. *Early Hum Dev* 1978;1:363-9.
62. Luscieti P, Hubschmid T, Cottier H, Hess MW, Sobin LH. Human lymph node morphology as a function of age and site. *J Clin Pathol* 1980;33:454-61.
63. Westerga J, Timens W. Immunohistological analysis of human fetal lymph nodes. *Scand J Immunol* 1989;29:103-12.
64. Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 2006;177:3728-36.
65. Griffioen AW, Rijkers GT, Janssens-Korpela P, Zegers BJM. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect Immun* 1991;59:1839-45.

66. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagen T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:801-10.e6.
67. Halista SM, Johnson-Robbins LA, El-Mohandes AE, Lees A, Mond JJ, Katona IM. Characterization of early activation events in cord blood B cells after stimulation with T cell-independent activators. *Pediatr Res* 1998;43:496-503.
68. Pedraz C, Lorente F, Pedraz MJ, Salazar Villalobos V. [Development of the serum levels of complement during the first year of life]. *An Esp Pediatr* 1980;13:571-6.
69. Johnston RBJ, Altenburger KM, Atkinson AWJ, Curry RH. Complement in the newborn infant. *Pediatrics* 1979;64:781-6.
70. Pupovac A, Good-Jacobson KL. An antigen to remember: regulation of B cell memory in health and disease. *Curr Opin Immunol* 2017;45:89-96.
71. Naradikian MS, Hao Y, Cancro MP. Age-associated B cells: key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. *Immunol Rev* 2016;269:118-29.
72. Sánchez ML, Almeida J, Vidriales B, López-Berges MC, García-Marcos MA, Moro MJ, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002;16:1460-9.

## Artículo 3

### La disección de los defectos de las poblaciones de linfocitos B de memoria y células plasmáticas que expresan diferentes subclases de inmunoglobulinas proporciona una base sólida para una (nueva) re-clasificación de la IDVC y de los déficits de subclases de inmunoglobulinas

Elena Blanco<sup>1</sup>, Martín Pérez-Andrés<sup>1</sup>, Sonia Arriba-Méndez<sup>2</sup>, Cristina Serrano<sup>3</sup>, Lucía del Pino-Molina<sup>4</sup>, Susana Silva<sup>5</sup>, Ignacio Criado<sup>1</sup>, Ignacio Madruga<sup>6</sup>, Ana Serra Caetano<sup>5</sup>, Teresa Contreras-Sanfeliciano<sup>7</sup>, Francisco Sala<sup>8</sup>, Alejandro Martín<sup>9</sup>, José María Bastida<sup>9</sup>, Félix Lorente<sup>2</sup>, Carlos Prieto<sup>10</sup>, Ignacio Dávila<sup>11</sup>, Miguel Marcos<sup>6</sup>, Tomas Kalina<sup>12</sup>, Marcela Vlkova<sup>13</sup>, Carolien Bonroy<sup>14</sup>, Jan Philippé<sup>14</sup>, Eduardo López-Granados<sup>4</sup>, Ana E. da Sousa<sup>5</sup>, Mirjam van der Burg<sup>15</sup>, Jacques J.M. van Dongen<sup>16</sup>, Alberto Orfao<sup>1</sup>, por el grupo de inmunodeficiencias primarias de EuroFlow (EuroFlow PID).

<sup>1</sup>Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, USAL-CSIC), Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, IBSAL y CIBERONC, Salamanca, España.

<sup>2</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>3</sup>Servicio de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España.

<sup>4</sup>Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario La Paz, Grupo de Fisiopatología de Inmunodeficiencias, Instituto para la investigación de la Salud IdiPAZ, Madrid, España.

<sup>5</sup>Instituto de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Lisboa, Portugal.

<sup>6</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL; Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>7</sup>Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>8</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Navarra, Pamplona, España.

<sup>9</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca, España.

<sup>10</sup>Servicio de Bioinformática (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>11</sup>Servicio de Alergia, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

<sup>12</sup>Departamento de Hematología/Oncología, 2<sup>o</sup> Facultad de Medicina, Universidad Charles, Praga, República Checa

<sup>13</sup>Departamento de Inmunología Clínica y Alergología, Hospital Universitario St Anne, Facultad de Medicina, Universidad Masaryk, Brno, República Checa.

<sup>14</sup>Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Gante, Gante, Bélgica.

<sup>15</sup>Departamento de Inmunología, Centro Médico de la Universidad Erasmus, Rotterdam, Países Bajos.

<sup>16</sup>Departamento de Inmuno-Hematología y Transfusión de Sangre, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Universidad de Leiden, Leiden, Países bajos.

*Journal of Allergy and Clinical Immunology*  
(sometido para publicación y en revisión)

La información suplementaria correspondiente a este artículo está disponible en el anexo II y el CD-ROM adjuntos al final de la presente memoria de Tesis doctoral.

**Introducción.** Las IDP-Ac son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas fundamentalmente por una producción deficitaria de  $\geq 1$  isotipo(s) o subclase(s) de Ig(s), cuya clasificación se basa (principalmente) en el isotipo o subclase afectado. En conjunto, las IDP-Ac suponen la mayoría (50-70%) de las IDP. Desde el punto de vista clínico, estos pacientes muestran un comportamiento variable, desde casos en los que la enfermedad permanece asintomática durante toda la vida, hasta otros en los que se manifiesta bajo la forma de infecciones bacterianas graves, autoinmunidad y/o organomegalias. En estos pacientes, el posible defecto genético subyacente solo se conoce en  $<10\%$  de los pacientes, lo que ha reforzado el papel del estudio de las subpoblaciones linfocitarias de SP mediante citometría de flujo, en el diagnóstico y clasificación de este grupo de IDP, habiéndose asociado la existencia de alteraciones en las distintas poblaciones de linfocitos B de SP, especialmente el descenso de los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, con una mayor frecuencia de casos sintomáticos.

**Objetivo.** El objetivo de este trabajo se centró en identificar las posibles alteraciones numéricas de las distintas poblaciones de linfocitos B y CPs de SP, incluyendo aquellas que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs, en pacientes con IDVC, déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA y déficit selectivo de IgA, y su relación con el comportamiento clínico de la enfermedad.

**Muestras, materiales y métodos.** En conjunto, se incluyeron en el estudio un total de 111 pacientes con IDP-Ac (47 con IDVC, 59 con déficit selectivo de IgA y 5 con déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA), y 140 donantes sanos pareados por grupo de edad (4-5 años, 6-9 años, 10-17 años, 18-39 años, 40-59 años, 60-79 años y  $>80$  años). En todos los pacientes y controles se obtuvieron muestras de SP que fueron analizadas mediante citometría de flujo, utilizando el panel de Acs dirigidos frente a los distintos isotipos y subclases de Igs y protocolos validados previamente. En cada muestra se analizaron un mínimo de 5 millones de leucocitos,

empleando un citómetro de flujo Fortessa X-20. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los defectos observados en las subpoblaciones de células B correspondientes a distintos estadios madurativos y definidos por el isotipo y subclase de Ig (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1-2) expresada, correlacionando dichos patrones de alteración con el subtipo diagnóstico y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

**Resultados.** En todos los pacientes diagnosticados de IDP-Ac se detectaron alteraciones en al menos una población de linfocitos B de memoria y/o CPs de SP, respecto a los valores normales de referencia para su grupo de edad. Entre los pacientes con déficit selectivo de IgA, las alteraciones encontradas estaban restringidas a los compartimentos de linfocitos B de memoria y de CPs IgA<sup>+</sup>. Aunque la práctica totalidad de pacientes con déficit selectivo de IgA presentaban un defecto severo de CPs IgA<sup>+</sup>, se identificaron dos grupos bien definidos de pacientes con distinto comportamiento clínico, dependiendo del grado de afectación de los linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup>. Así, aquellos pacientes con un déficit selectivo de IgA que presentaban mayor grado de afectación de los linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup>, presentaron mayor frecuencia de infecciones no respiratorias y de autoinmunidad específica de órgano, además de una prevalencia de antecedentes familiares de IDP-Ac más elevada.

A su vez, los pacientes con déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA y con IDVC mostraron, además de las alteraciones típicas del déficit selectivo de IgA, distintos perfiles de afectación de diferentes subpoblaciones de linfocitos B y CPs IgG<sup>+</sup>, y, con menor frecuencia también de memoria IgM<sup>++D</sup><sup>+</sup>, linfocitos B naïve y linfocitos B inmaduros/transicionales. Así, de acuerdo con el patrón de alteración de los niveles séricos de Acs, todos los pacientes que presentaban déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA presentaban un descenso significativo del número de linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> e IgG2<sup>+</sup>, asociado en 2 de los 5 casos analizados, a CPs detectables en SP. Por el contrario, todos los pacientes diagnosticados de IDVC carecían de CPs de isotipo IgG e IgA en frecuencia superiores a 0,01 células/ $\mu$ l. Sin embargo, en

función de las alteraciones observadas en las subpoblaciones linfocitos B de memoria, pudimos subclasificar los pacientes en 6 grupos, según los isotipos y subclases de inmunoglobulina afectados: i) Grupo 6, casos con un descenso marcado de todas las subpoblaciones de linfocitos B de memoria; ii) Grupo 5, pacientes que presentaban un déficit numérico de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> con valores casi normales de linfocitos B de memoria CD27<sup>-</sup> IgG3<sup>+</sup>; iii) Grupo 4, pacientes que carecen de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo; y iv) casos que presentaban linfocitos B de memoria con IgG3<sup>+</sup> e IgG1<sup>+</sup> y sin cambio de isotipo (IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup>) en ausencia (Grupo 3) y; v) en presencia (Grupo 2) de linfocitos B de memoria IgG2<sup>+</sup>; y vi) Grupo 1, casos que presentaban además linfocitos de memoria IgA1<sup>+</sup>. Estos diferentes patrones de alteración celular se asociaban con distintos perfiles de manifestaciones clínicas. Así, los pacientes que mantenían linfocitos B de memoria IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup>, IgG3<sup>+</sup> e IgG1<sup>+</sup> circulantes, presentaban una clínica más leve, respecto a los que mostraban un déficit de estas poblaciones B. En concreto, los pacientes que no tenían linfocitos B de memoria circulantes con cambio de isotipo, se caracterizaron por una mayor frecuencia de enteropatía y citopenias autoinmunes, mientras que los casos que presentaban un déficit numérico de todos los tipos de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup>, asociado a valores (casi) normales de IgG3<sup>+</sup>, presentaban con mayor frecuencia hepatomegalia y autoinmunidad específica de órgano. Así mismo, los pacientes con un marcado descenso en el número de linfocitos B de memoria de todos los isotipos, presentaban un fenotipo clínico mixto entre los dos grupos anteriores, con elevada frecuencia de enteropatía, citopenias autoinmunes y hepatomegalia, asociadas a mayor prevalencia de bronquiectasias y granulomas.

**Conclusiones.** El análisis detallado de los distintos compartimentos de linfocitos B y CPs de SP de acuerdo al isotipo y subclase de IgG1-4 e IgA1-2 que expresan, junto a su estadio madurativo, mediante citometría de flujo de alta sensibilidad (<10<sup>-5</sup>), permite identificar perfiles característicos de alteraciones de dichas poblaciones de linfocitos B y CPs, asociadas a distinto comportamiento clínico. Globalmente, las CPs de SP serían el compartimento de células B más

sensible para el diagnóstico de IDP-Ac, mientras que el análisis de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria, definidas de acuerdo al isotipo y subclase de Ig que expresan, permitiría discriminar entre grupos de pacientes con IDP-Ac que presentan distinto comportamiento clínico, proporcionando la evaluación de estas poblaciones de células B, información complementaria a la obtenida con el estudio de los niveles séricos de Acs, contribuyendo a entender mejor la patogénesis de las IDP-Ac y a mejorar su diagnóstico, clasificación y monitorización, especialmente en aquellos casos que han sido tratados con Igs de sustitución.





# Dissection of defects in memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin subclasses provides basis for (new) re-classification of CVID and Ig-subclass deficiencies.

Elena Blanco, MSc<sup>1§</sup>; Martín Pérez-Andrés, PhD<sup>1§</sup>; Sonia Arriba-Méndez, MD, PhD<sup>2</sup>; Cristina Serrano, MD<sup>3</sup>; Lucía del Pino-Molina, PhD<sup>4</sup>; Susana Silva, MD; PhD<sup>5</sup>; Ignacio Criado MSc<sup>1</sup>; Ignacio Madruga MD<sup>6</sup>; Ana Serra Caetano MSc<sup>5</sup>; Teresa Contreras-Sanfeliciano MD<sup>7</sup>; Francisco Sala, MD<sup>8</sup>; Alejandro Martín, MD, PhD<sup>9</sup>; José María Bastida, MD, PhD<sup>9</sup>; Félix Lorente, MD, PhD<sup>2</sup>; Carlos Prieto, PhD<sup>10</sup>; Ignacio Dávila, MD, PhD<sup>11</sup>; Miguel Marcos, MD, PhD<sup>6</sup>; Tomas Kalina, MD, PhD<sup>12</sup>; Marcela Vlkova, PhD<sup>13</sup>; Carolien Bonroy, PhD<sup>14</sup>; Jan Philippé, MD, PhD<sup>14</sup>; Eduardo López-Granados, MD, PhD<sup>4</sup>; Ana E. da Sousa PhD<sup>5</sup>; Mirjam van der Burg, PhD<sup>15</sup>; Jacques J.M. van Dongen, MD, PhD<sup>16\*</sup>; Alberto Orfao, MD, PhD<sup>1\*</sup>, on behalf of the EuroFlow PID group.

<sup>§</sup>Both authors contributed equally to this work and should both be considered as first author.

<sup>\*</sup>Both authors contributed equally to this work and should both be considered as last author.

## Affiliations:

<sup>1</sup>Department of Medicine, Cancer Research Centre (IBMCC, USAL-CSIC), Cytometry Service (NUCLEUS), University of Salamanca (USAL), Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain and Biomedical Research Networking Centre Consortium of Oncology (CIBERONC) Instituto de salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>3</sup>Servicio de inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Clinical Immunology Department, University Hospital La Paz and Physiopathology of Lymphocytes in Immunodeficiencies Group, IdiPAZ Institute for Health Research, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal; <sup>6</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Department of Medicine, University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain; <sup>7</sup>Servicio de Bioquímica clínica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>8</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Navarra, Pamplona, Spain; <sup>9</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca, Spain; <sup>10</sup>Bioinformatics service (NUCLEUS), University of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>11</sup>Servicio de Alergia, Hospital Universitario de Salamanca, Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Biomedical and Diagnosis Science Department, University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain; <sup>12</sup>CLIP, Dept of Haematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; <sup>13</sup>Department of Clinical Immunology and Allergology, St Anne's University Hospital, and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>14</sup>Department of Laboratory Medicine, University Hospital Ghent, Ghent, Belgium; <sup>15</sup>Department of Immunology, Erasmus University Medical Center (Erasmus MC), Rotterdam, The Netherlands; <sup>16</sup>Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden, The Netherlands.

## Corresponding author:

Prof. Alberto Orfao, MD, PhD.

Department of Medicine, Cancer Research Center  
University of Salamanca.

Paseo de la Universidad de Coimbra s/n  
37007 Salamanca, Spain.

Tel: +34 923 294 811

Email: [orfao@usal.es](mailto:orfao@usal.es)

**Funding sources:** Elena Blanco was supported by a grant from the *Junta de Castilla y León (Fondo Social Europeo, ORDEN EDU/346/2013, Valladolid, Spain)*. This work was supported by: the CB16/12/00400 grant (*CIBERONC, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, -Madrid, Spain- and FONDOS FEDER*), the FIS PI12/00905-FEDER grant (*Fondo de Investigación Sanitaria of Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain*) and AP119882013 grant (*Fundación Mutua Madrileña, Madrid, Spain*). The coordination and innovation processes of this study were supported by the EuroFlow Consortium.

**Conflict of interest disclosure:** E. Blanco, M. Pérez-Andrés, E. López-Granados, T. Kalina, M. Vlkova, M. van der Burg, J. J. M. van Dongen, and A. Orfao each report being one of the inventors on the EuroFlow-owned patent PCT/NL 2015/ 050762 (Diagnosis of primary immunodeficiencies), which is licensed to Cytognos, a company that pays royalties to the EuroFlow Consortium. J. J. M. van Dongen and A. Orfao report an Educational Services Agreement from BD Biosciences. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

## **ABSTRACT**

**Background.** Predominantly antibody deficiencies (PAD) are the most prevalent primary immune deficiencies, but the B-cell defects and underlying genetic alterations remain largely unknown.

**Objective.** We investigated PAD patients for the distribution of 41 blood B-cell and plasma cell (PC) subsets, including subsets defined by expression of distinct immunoglobulin heavy chain (IgH) subclasses.

**Methods.** Blood samples from 111 PAD patients –47 common variable immunodeficiency (CVID), 59 selective IgA-deficiency (IgADef) and 5 IgG subclass deficiency with IgA deficiency (IgG/Adef)– and 140 age-matched controls were studied by flowcytometry using EuroFlow IgH-isotype stainings. Patients were classified according to their B-cell and PC immune profile and the obtained patient clusters were correlated with clinical manifestations of PAD.

**Results.** Decreased counts of blood PCs and/or memory B-cells (MBCs) expressing distinct IgA- and IgG-subclasses were identified in all PAD patients. In IgADef patients, B-cell defects were mainly restricted to surface-membrane(sm)IgA<sup>+</sup> PCs and MBCs with two clear subgroups showing strongly decreased smIgA<sup>+</sup>PCs with mild vs. severe smIgA<sup>+</sup>MBCs defects and higher frequencies of non-respiratory infections, autoimmunity, and affected family members. IgG/Adef and CVID patients showed defects in both smIgA<sup>+</sup> and smIgG<sup>+</sup> MBCs and PCs. Absence of switched-PCs was systematically found in CVID with six different defective MBC (and clinical) profiles: i) profound decrease of MBCs; ii) defective CD27<sup>+</sup>MBCs with almost normal IgG3<sup>+</sup> MBCs; iii) absence of switched-MBCs; and iv) presence of both unswitched and switched-MBCs without and; v) with IgG2<sup>+</sup>MBCs; and vi) with IgA1<sup>+</sup>MBCs.

**Conclusion.** Distinct PAD defective B-cell patterns were identified which are associated with unique clinical profiles.

**Key messages.**

- Evaluation of blood B-cells and plasma cells expressing distinct immunoglobulin subclasses provides a new highly-sensitive approach for identification of specific B-cell defects of diagnostic relevance in patients with predominantly antibody deficiencies.
- Detailed dissection of blood memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin subclasses, identifies distinct deficient immune profiles in patients with primary antibody deficiencies, which correlate with both the diagnostic subtype and clinical manifestations of the disease.

**Capsule summary.** Dissection of the blood plasma cell and memory B-cell compartments and their immunoglobulin-subclass expression patterns in predominantly antibody deficiencies shows unique B-cell defective profiles associated with the diagnostic subtype and clinical manifestations of the disease.

**Key words.** Immunodeficiency, primary antibody deficiency, selective IgA deficiency, CVID, immunophenotyping, immunoglobulins, Ig-subclasses, memory B-cells, plasma cells, flow cytometry, diagnosis, classification.

**Abbreviations.** Ab: antibody; CVID: common variable immunodeficiency; HD: healthy donor; Ig: immunoglobulin; IgH: immunoglobulin heavy chain; IgG/Adef: IgG subclass deficiency with IgA deficiency; GC: germinal center; MBC: memory B-cell; PAD: predominantly antibody deficiency; PC: plasma cell; PID: primary immune deficiency; IgAdef: selective IgA deficiency; SOP: standard operating procedure.

## INTRODUCTION

Predominantly antibody deficiencies (PADs) are the most prevalent primary immunodeficiencies (PIDs; 50-70% of all PIDs),<sup>1,2</sup> and comprise a heterogeneous spectrum of disorders with defective production of  $\geq 1$  immunoglobulin (Ig)-isotype and/or Ig-subclass; the underlying pathogenic mechanisms remain largely unknown.<sup>1,2</sup> Current classification of PAD strongly relies on the affected serum Ig-heavy chain (IgH) isotype(s) and subclass(es) levels and includes: 1) selective IgA-deficiency (IgAdef) characterized by an isolated defect of serum IgA (prevalence:  $\approx 1:100-1,000$  individuals);<sup>3-5</sup> 2) IgG-subclass deficiency with IgA-deficiency (IgG/Adef) with reduced IgA and  $\geq 1$  IgG-subclass serum levels ( $\approx 15-20\%$  of IgA-deficiencies);<sup>6</sup> and, 3) common variable immunodeficiency (CVID), characterized by low (total) IgG serum levels, decreased IgA and/or IgM, and a more severe clinical presentation, but a lower prevalence ( $\approx 1:25,000-50,000$  individuals).<sup>4,5</sup> Although recurrent bacterial infections of the respiratory tract are the clinical hallmark of PADs, clinical manifestations vary substantially among individual patients, from (almost) asymptomatic cases, to patients presenting with recurrent severe infections associated with other non-infectious disorders, e.g. autoimmunity, allergy, lymphoproliferation, lymphadenopathy, splenomegaly, hepatomegaly, enteropathy and granulomatous disease.<sup>1,3,7-10</sup> Of note, asymptomatic individuals who present with low/absent serum IgA, while diagnosed as IgAdef by the International Union of Immunological Societies (IUIS), do not fulfill the European Society for Immunodeficiencies (ESID) diagnostic criteria for IgAdef.<sup>5</sup>

Despite extensive efforts, genetic (i.e. monogenic) alterations responsible for PADs are detected in  $<10\%$  cases.<sup>1,2,11</sup> In such setting, altered distributions of distinct blood B- and T-cell subpopulations by flowcytometry might provide key (complementary) diagnostic information, particularly for patients with low serum antibody (Ab)-isotype levels and non-specific clinical features.<sup>5,12,13</sup> In addition, several controversial results have been reported in CVID concerning the potential association between specific B-cell alterations –e.g. decreased (relative) numbers

of CD27<sup>+</sup> (antigen-experienced) switched-B-cells in blood– and relevant clinical manifestations, such as splenomegaly, granulomatous disease and autoimmunity,<sup>14–18</sup> while preservation of CD27<sup>+</sup> class-switched memory B-cells (MBCs) has been considered as a surrogate marker for the ability to respond to vaccination.<sup>5</sup> Similarly, decreased CD27<sup>+</sup> (antigen-experienced) switched-B-cell counts in blood have been associated with a worse clinical outcome in IgAdef,<sup>19</sup> while decreased percentages of CD21<sup>+</sup> B-cells and an increased proportion of immature/transitional B-cells, have both been correlated to distinct CVID clinical profiles.<sup>15,18,20</sup>

Despite the above B-cell subset correlates, the actual clinical relevance of such B-cell defects in PAD still remains elusive. This is probably due to the limited number of B-cell populations investigated in most studies. For example, in many studies focused on antigen-experienced B-cells, no distinction is made between (relative long-living) MBCs and (newly-generated) circulating plasma cells (PCs)<sup>14,15,19</sup> and very few reports have investigated the precise relationship between defects in specific IgH-isotypes and the number of blood B-cells and PCs that express them.<sup>21,22</sup> Moreover, no study has investigated so far the IgG1-4 and IgA1-2-subclass distribution within the PC and MBC compartments of PAD patients. Finally, most reports on B-cell compartments in PAD, do not consider (normal) age-associated variations, and only a few studies subdivided healthy donors (HD) and PAD patients into a few (n=3-4) age-groups.<sup>17,20,22</sup> However, age-matched reference values are of utmost importance because PAD can present at any age<sup>1,7,9,13</sup> and major age-related differences exist in the distribution of blood B-cell subsets throughout life<sup>23</sup>.

Here we investigated for the first time, the distribution of 41 distinct blood B-cell and PC subsets in 111 PAD patients vs. 140 age-matched controls. Based on the B-cell and PC defects encountered, eight distinct defective immune profiles were identified, which are associated with both the diagnostic subtype and clinical manifestations of PAD.

## METHODS

**Patients and controls.** Overall, 111 PAD patients<sup>4</sup> (mean age: 32±19y; range 4-87y) and 140 HD (mean age: 39±26y; range: 4-90y), were studied. PAD patients were subclassified by the IUIS<sup>4</sup> and ESID criteria<sup>5</sup> into: 59 and 34 IgAdef (mean age, 26±20y), respectively, 5 IgG/Adef (mean age, 33±11y) and 47 CVID (mean age, 41±17y) cases. Twenty-five asymptomatic IgAdef individuals (mean age, 24±15y) with serum IgA <7 mg/dL, did not fulfill the ESID criteria<sup>5</sup> for IgAdef (e.g. no increased susceptibility to infections, autoimmunity or affected family members). From each subject, EDTA-anticoagulated blood samples were collected after informed consent was given by each individual and/or their legal representatives. The study was approved by the local ethics committees.

**Flowcytometric identification of blood B-cells and their subsets.** Total B-cell counts and the distribution of 41 distinct B-cell subsets were analyzed by flowcytometry, after staining 10<sup>7</sup> nucleated cells with the EuroFlow 12-color IgH-isotype B-cell tube (Supplementary Table 1) and bulk-lyse standard operating procedure (SOP) ([www.EuroFlow.org](http://www.EuroFlow.org)), as described elsewhere.<sup>24,25</sup> Per sample, ≥5x10<sup>6</sup> leukocytes were measured in an LSR-Fortessa X-20 flowcytometer –Becton/Dickinson Biosciences (BD), San José, CA–. Instrument set-up and calibration was performed according to the EuroFlow SOP ([www.EuroFlow.org](http://www.EuroFlow.org))<sup>26</sup>. For data analysis, the Infinicyt software (Cytognos S.L., Salamanca, Spain) was used.

CD19<sup>+</sup> B-cells and PCs were both identified by their low-to-intermediate forward (FSC) and sideward (SSC) light scatter properties, and subsequently subclassified into 41 different subpopulations based on their maturation stage and the expression of distinct IgH-isotypes and IgH-subclasses, as previously described<sup>23</sup> (Supplementary Figure 1). First, the following B-cell subpopulations were defined based on their staining profile for CD19, CD38, CD24, CD21, CD27, CD5, surface membrane (sm)IgM and smIgD: i) CD27<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>smIgM<sup>+++</sup>D<sup>+</sup> immature/transitional B-cells; and ii) CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD24<sup>het</sup>CD5<sup>het</sup>smIgM<sup>+</sup>IgD<sup>++</sup> naive B-

lymphocytes; iii) CD27<sup>+</sup>CD38<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup>CD24<sup>het</sup>smlgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup> unswitched-MBCs; iv) CD27<sup>+/-</sup>CD38<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup>CD24<sup>het</sup>smlgM<sup>-</sup>D<sup>-</sup> switched-MBCs; and, v) CD27<sup>++</sup>CD38<sup>hi</sup>CD5<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> PCs. MBCs and PCs were further subclassified according to their IgH-isotypes and IgH-subclasses into: i) smlgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup>, smlgD<sup>+</sup>-only, smlgA1<sup>+</sup>, smlgA2<sup>+</sup>, smlgG1<sup>+</sup>, smlgG2<sup>+</sup>, smlgG3<sup>+</sup> and smlgG4<sup>+</sup> MBCs, and ii) smlgM<sup>+</sup>-only, smlgD<sup>+</sup>-only, smlgA1<sup>+</sup>, smlgA2<sup>+</sup>, smlgG1<sup>+</sup>, smlgG2<sup>+</sup>, smlgG3<sup>+</sup> and smlgG4<sup>+</sup> PCs, respectively. The above subpopulations of naive B-lymphocytes and MBCs were further subsetted based on CD21 (CD21<sup>+</sup> vs. CD21<sup>-</sup> naive and MBCs subsets), and CD27 expression (CD27<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup> MBCs) (Supplementary Figure 1).

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed with either R (v3.2.3; <https://www.r-project.org/>)<sup>27</sup> or the SPSS (SPSS v23.0, IBM, Armonk, NY) software packages. To investigate the statistical significance (set at *P*-values <0.05) of differences observed between groups, the McNemar's and Fisher-exact tests for categorical variables and the Mann-Whitney-U test for continuous variables, were used. Unsupervised clustering analysis of patient data based on the K-means learning algorithm<sup>28</sup> and Euclidean distances was performed using blood B-cell subset counts normalized by age-group (Supplementary Table 2), based on (previously reported) reference values<sup>23</sup>-log<sub>10</sub> (patient value/minimum normal value)-; age-normalized values per patient and B-cell/PC subset were represented in heatmaps using gplots (R-package).<sup>29</sup> Whenever, B-cell-and PC-subset counts were below the method's limit of detection (LOD) (<0.01 cells/μL) for more than one HD age-group -lower limit in normal (LLN)<LOD- they were excluded from analysis.



## RESULTS

### **Blood distribution of the major (maturation-associated) subpopulations of B-cells and PCs.**

Total B-cell and PC counts were significantly decreased in most CVID patients (51% and 98%, respectively) vs. age-matched HD. In contrast, decreased PC numbers with normal B-cell counts were found in 80% IgG/Adef and 46% IgAdef cases ( $P < 0.001$  vs. CVID) (Figure 1; Supplementary Table 3). In fact, the majority of CVID (92%) and IgG/Adef (60%) patients showed no PCs in blood, while PCs were detected ( $\geq 0.07$  PCs/ $\mu$ L) in every IgAdef case.

Abnormally low MBC counts were observed in most CVID patients (70%), with undetectable MBCs ( $< 0.01$  MBCs/ $\mu$ L) in 17% of cases, while all IgG/Adef ( $P = 0.004$  vs. CVID) and virtually all IgAdef (91%;  $P < 0.001$ ) individuals had normal MBC counts. Immature/transitional and naive B-lymphocytes were decreased in a smaller fraction of PAD cases –34% and 34% in CVID, 20% and 0% in IgG/Adef, and 12% and 2% in IgAdef patients, respectively– mostly at the expense of CD21<sup>+</sup>B-cells (Figures 1–2; Supplementary results; Supplementary Figure 2; Supplementary Table 3), with only 11% and 4% of CVID patients showing undetectable immature/transitional and naive B-cells, respectively (Figure 1; Supplementary Table 3).

**Blood distribution of MBCs and PCs expressing distinct IgA-subclasses.** Reduced smlgA1<sup>+</sup> and/or smlgA2<sup>+</sup> PC counts were found in virtually all PAD patients (Figure 1; Supplementary Table 3): 100% of CVID and IgG/Adef cases, and 97% of IgAdef patients. Interestingly, while smlgA1<sup>+</sup> and smlgA2<sup>+</sup> PCs were both undetectable in all CVID and IgG/Adef patients, residual smlgA<sup>+</sup> PCs were found in 39% of IgAdef cases, such cells corresponding to both IgA-subclasses in 27% cases, to smlgA1<sup>+</sup>-only in 10% and to smlgA2<sup>+</sup>-only in 2% IgAdef patients. In line with these findings, reduced smlgA1<sup>+</sup> and/or smlgA2<sup>+</sup> MBC counts were also observed in virtually all CVID (98%), IgG/Adef (100%) and IgAdef (98%) patients, being absent in most CVID (92%) and IgG/Adef (100%) cases, while present in 49% of IgAdef cases, corresponding to both smlgA1<sup>+</sup> and smlgA2<sup>+</sup> MBCs in 37% cases, and to smlgA1<sup>+</sup>-only in 12% IgAdef patients (Figure 1;

Supplementary Table 3).

**Blood distribution of MBCs and PCs expressing different IgG-subclasses.** None of the CVID patients showed circulating smlgG<sup>+</sup>PCs (<0.01 cells/ $\mu$ l –Supplementary Figure 3; Supplementary Table 3–). In contrast, smlgG<sup>+</sup>PCs were present in 40% of IgG/Adef and 90% of IgAdef patients ( $P=0.01$ ), with normal total smlgG<sup>+</sup>PC counts in 40% and 71% cases, respectively. Moreover, in most CVID patients smlgG<sup>+</sup>MBCs were decreased (87%) or absent (30%), whereas such decrease was seen in only 10% of IgAdef and 0% of IgG/Adef cases. When dissected by IgG-subclasses, CVID patients more frequently showed decreased or absent smlgG2<sup>+</sup> (94% and 70%, respectively) than smlgG1<sup>+</sup> (89% and 40%,  $P>0.05$  and  $P<0.001$ , respectively) and smlgG3<sup>+</sup> MBCs (53% and 30%, respectively;  $P<0.001$ ). Conversely, all IgAdef patients had smlgG1-3<sup>+</sup>MBCs, each subset being decreased in  $\leq 9\%$  patients. In turn, IgG/Adef patients systematically showed decreased smlgG2<sup>+</sup>MBC counts with normal smlgG1<sup>+</sup> and smlgG3<sup>+</sup> MBC numbers (Supplementary Figure 3; Supplementary Table 3).

**Altered blood distribution profiles of B-cell and PC subsets.** Unsupervised clustering analysis identified five major immune profiles of alteration of B-cell and PC subset counts in PAD patients, which closely related to the IUIS diagnostic categories of PAD (Figure 2A).<sup>4</sup> Thus, IgAdef cases split between the PAD-1 and PAD-2 clusters and IgG/Adef between the PAD-2 and PAD-3 groups, while CVID cases fell into the PAD-3, PAD-4 and PAD-5 clusters with four outliers in PAD-1 and PAD-2 (Figure 2A). In detail, PAD-1 included 30 patients with reduced but detectable smlgA<sup>+</sup>PCs or smlgA<sup>+</sup>MBCs (smlgA<sup>+</sup>MBCs range: from 10-fold below the LLN to virtually normal counts): 27/30 PAD-1 cases previously diagnosed as IgAdef, and three CVID patients with no PCs but detectable IgA1<sup>+</sup> and IgA2<sup>+</sup> MBCs and virtually normal IgG1-3<sup>+</sup> MBCs counts. PAD-2 was characterized by severely decreased smlgA<sup>+</sup>MBCs ( $\geq 30$  times below the LLN; absent in 33/35 patients) and absence of smlgA<sup>+</sup>PCs, but (similarly to PAD-1) virtually normal smlgG1-3<sup>+</sup>MBC counts; this PAD-2 cluster included 32 IgAdef patients, 2 IgG/Adef cases and one CVID patient

who lacked PCs and smlgA<sup>+</sup>MBCs, but had normal smlgG<sup>+</sup>MBC numbers. PAD-3 cases consisted of 22 CVID (88%) and 3 IgG/Adef (12%) patients with either undetectable switched-PCs (both IgG<sup>+</sup> and IgA<sup>+</sup> PCs) and severely decreased smlgA1<sup>+</sup>/A2<sup>+</sup>MBCs (absent in 21/25 cases), but presenting with a heterogeneous defect on IgG<sup>+</sup>MBCs, consisting of severely reduced smlgG2<sup>+</sup>MBCs (absent in 14/25), with a milder decrease of smlgG1<sup>+</sup> (80% of cases) and smlgG3<sup>+</sup> (20%) MBC counts. Finally, all PAD-4 and PAD-5 patients were CVID who had undetectable (8/11 cases) or severely reduced IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> and IgG<sub>2</sub><sup>+</sup> MBCs (PAD-4), or no MBCs (PAD-5), except for two of these later cases that showed detectable IgG3<sup>+</sup>MBCs at levels ≤12-fold below the LLN.

**IgAdef blood B-cell and PC immune profiles.** IgAdef patients split in two subgroups with different patterns of alteration of smlgA<sup>+</sup>MBCs (Figure 2B): present in IgAdef-1, while virtually absent in IgAdef-2 cases (Figure 3B). Interestingly, these two subgroups did not show a strong association with the ESID diagnostic criteria<sup>5</sup> for clinical IgAdef, met in 35% of IgAdef-1 cases vs. 65% of IgAdef-2 cases ( $P>0.05$ ) (Supplementary Table 4A). Of note, IgAdef-1 cases were older than IgAdef-2 patients both at the time of analysis ( $31\pm 20y$  vs.  $18\pm 13y$ , respectively;  $P=0.01$ ) and at diagnosis ( $28\pm 20y$  vs.  $16\pm 14y$ , respectively;  $P=0.04$ ), with a similar male/female distribution. Despite no differences were observed in IgM serum levels at diagnosis, serum IgG was slightly lower in sIgAdef-1 ( $1,285\pm 324$  vs.  $1,477\pm 248$  mg/dl). In turn, while around one third of both IgAdef-2 and IgAdef-1 had past history of recurrent respiratory infections at presentation, the IgAdef-2 showed a higher frequency of other (recurrent) infections (19% vs. 0%, respectively;  $P=0.02$ ), tissue-specific autoimmunity (28% vs. 7%, respectively;  $P=0.04$ ) and other family members affected (22% vs. 0%, respectively;  $P=0.02$ ) (Figure 4A; Supplementary Table 5).

**CVID blood B-cell and PC immune profiles.** Overall, 6 subgroups of CVID (CVID-1 to CVID-6) with different patterns of altered B-cell subsets and complete absence of switched-PCs, were identified (Figure 2C; Figure 3C). CVID-1 and CVID-2 included patients with both detectable smlgMD<sup>+</sup> MBCs and switched-MBCs of all smlgG1-3 subclasses, CVID-1 patients also presenting

either normal or slightly reduced IgA1<sup>+</sup> MBCs. In contrast, CVID-3 showed a more severe smlgG2<sup>+</sup> MBC defect (at least 3-fold below the LLN) frequently (12/15 cases) with undetectable smlgG2<sup>+</sup>MBCs (<0.01 cells/ $\mu$ l). CVID-4 patients had no switched-MBCs. CVID-5 patients showed more severe defects involving all CD27<sup>+</sup>MBC subsets ( $\geq$ 10-fold below the LLN), but almost normal CD27<sup>-</sup> smlgG3<sup>+</sup>MBC counts. Finally, CVID-6 cases had severely decreased switched- and unswitched-MBCs including  $\leq$ 0.06 IgG3<sup>+</sup>MBCs/ $\mu$ l ( $\geq$ 12-fold below the LLN) (Figures 2C and 3C).

Overall, a close association between the CVID-1-6 clusters and the EUROclass classification of CVID<sup>18</sup> was observed. EUROclass smB<sup>+</sup> patients were subclassified here into the CVID-1 (50%), CVID-2 (25%) and CVID-3 (25%) clusters, depending on their normal vs. low smlgA<sup>+</sup> and smlgG2<sup>+</sup> MBC counts. EUROclass B<sup>-</sup> patients were included in our CVID-6 cluster, except for two cases with <1% PB B-cells but preserved MBC counts, thereby classified here as CVID-4 and CVID-5, respectively. However, EUROclass smB<sup>-</sup> patients split across the different CVID-2-6 clusters: CVID-2, 10%; CVID-3, 45%; CVID-4, 16%; CVID-5, 19%; and CVID-6, 10% of smB<sup>-</sup> cases (Figure 2C; Supplementary Table 4B). Inclusion of other EUROclass parameters, like CD21 expression (Supplementary Table 4B) or immature/transitional B-cell counts did not result in significantly different distributions of smB<sup>-</sup> patients across our CVID-1-6 clusters (data not shown).

A similar age, gender distribution and frequency of recurrent infections (75% to 100%) was observed among the CVID clusters, except for CVID-6 patients, who were significantly older than CVID-2 and CVID-3 cases ( $P\leq$ 0.04). In addition, no differences were observed regarding serum Ig at diagnosis, except for lower IgM levels in CVID-1 vs. CVID-2 cases ( $P=$ 0.03) and similar clinical manifestations were observed among patients with preserved smlgG1<sup>+</sup>MBCs (CVID-1, CVID-2 and CVID-3 cases). Interestingly, 67% of CVID-4 patients showed autoimmune cytopenias –absent in both CVID-1 and CVID-2 cases and infrequent (8%) in CVID-3;  $P=$ 0.02– and they more frequently had enteropathy (67% vs. 0% in CVID-2,  $P=$ 0.04). In contrast, CVID-5 patients very

frequently had hepatomegaly (57% vs. 0% in CVID-3;  $P=0.009$ ) and tissue-specific autoimmunity –67% vs. 0% in CVID-4 ( $P=0.03$ ) and 10% in CVID-6 ( $P=0.04$ )–. Finally, CVID-6 cases displayed a mixed clinical profile between CVID-4 –enteropathy: 78% vs. 0% in CVID-2 ( $P=0.01$ ) and 17% in CVID-3 ( $P=0.008$ ); and autoimmune cytopenias (50% vs. 8% in CVID-3;  $P=0.04$ )– and CVID-5 cases –high frequency of hepatomegaly (56% vs. in 0% in CVID-3;  $P=0.006$ )–together with a high frequency of bronchiectasis (80% vs. 25% in CVID-3 ( $P=0.02$ ) and 14% in CVID-5 ( $P=0.01$ ). All cases with granuloma clustered in this CVID-6 group (30%) (Figure 4B; Supplementary Table 6).

## DISCUSSION

Current IUIS and ESID guidelines for diagnosis and classification of PADs relies on Ab serum levels, response to vaccination and clinical manifestations of PAD,<sup>4,5,7</sup> in the absence of well-defined genetic markers.<sup>30,31</sup> Although the number of affected serum Ab-isotypes provides a rough estimation of PAD patients' susceptibility to suffer from less (e.g. IgAdef) vs. more severe (CVID) disease complications in the short-term,<sup>4,5</sup> it cannot accurately predict for longer-term outcome of individual patients within each PAD subgroup. B-cell maturation-associated defects identified by flowcytometry have proven useful for the diagnosis and classification of CVID patients,<sup>5,18,20</sup> because they more precisely reflect the medium-term B-cell-associated protective potential, than their corresponding serum Ab-isotype levels. However, such B-cell defects have been poorly explored in IgG/Adef and IgAdef patients,<sup>19,32</sup> while the blood distribution of B-cells and PCs expressing distinct Ig-subclasses has never been investigated so far, neither in CVID nor in IgAdef. Here we investigated for the first time, the Ig-isotype and Ig-subclass distribution of MBCs and PCs in blood of PAD patients, and correlated the altered immune profiles identified, with the diagnostic subgroups and clinical manifestations of the disease. Since the blood B-cell compartment is highly dynamic along an individual's lifetime,<sup>23,33–36</sup> B-cell defects were defined per age-group.

Every CVID, IgG/Adef and IgAdef patient showed decreased counts for  $\geq 1$  B-cell subsets. This contrasts with previous flowcytometry studies that detected B-cell defects in only 6-86% of

PAD patients, namely 77%-86% in CVID,<sup>14,15,18,20,22,37,38</sup> 6%-25% in IgAdef<sup>19,32</sup> and 30% in selective IgG-subclass deficiency (with or without IgAdef).<sup>38</sup> This high frequency of B-cell defects most likely reflects the more detailed dissection of the blood B-cell and PC compartments, together with the higher sensitivity of our vs. previous methods, and/or the use of age-matched reference ranges.

Recently-produced, short-lived blood PCs,<sup>39</sup> particularly IgA<sup>+</sup>PCs, emerged as the most sensitive population for diagnosis of PAD, followed by switched and non-switched MBCs, with progressively more severe immunological defects in the spectrum of IgAdef to IgG/Adef and CVID. Thus, decreased smlgA1<sup>+</sup> and/or smlgA2<sup>+</sup> PC counts were found in all PAD patients, except in two IgAdef cases who showed reduced smlgA1<sup>+</sup> and smlgA2<sup>+</sup> MBCs. In addition, decreased total and/or switched-PCs emerged as a hallmark of CVID, in line with previous BM and lymph node findings.<sup>40,41</sup> Of note, IgAdef patients showed cellular defects typically restricted to smlgA<sup>+</sup> PCs and MBCs, without significant alterations of total smlgG<sup>+</sup> MBC and PC counts, which were restricted to the more severe IgG/Adef, and particularly, CVID cases. Nevertheless, compared to a previous study<sup>21</sup> where <10% IgAdef patients had smlgA<sup>+</sup>MBCs, a greater percentage of our IgAdef cases showed circulating smlgA<sup>+</sup>MBCs (≈50%) and/or PCs (≈40%). This discrepancy is probably due to the greater sensitivity of our EuroFlow strategies and methods with ≥5x10<sup>6</sup> (vs. 5x10<sup>4</sup>) cells analyzed<sup>21</sup>. Our findings are in line with previous studies demonstrating Sα-switch recombination in blood B-cells from 2/4 IgAdef patients.<sup>42</sup> Interestingly, IgAdef cases that showed a preserved IgA-switching capacity, displayed a milder clinical phenotype, with less risk-factors for CVID progression (e.g. autoimmunity),<sup>43</sup> but a similar prevalence of recurrent respiratory infections. Altogether, these findings suggest that detailed evaluation of blood B-cell and PC defects, might contribute to an improved classification and clinical management of IgAdef patients.

Complete lack of blood switched PCs was the hallmark of CVID. Whereas reduced numbers of switched-MBCs have been extensively reported in CVID,<sup>14-16,18,20</sup> this is the first time

that these cells were dissected at the Ig-subclass level, similarly to what is routinely done for serum IgG<sub>1-4</sub> levels. Progressive deterioration in IgG-switching capacity was observed in MBCs of CVID patients, which directly correlated with their consecutive location in the *IGHC* gene locus: IgM<IgG3<IgG1<IgG2. In line with these results, *Piqueras et al.*<sup>14</sup> showed a similar pattern of reduced mRNA expression for the different Ig-isotypes/Ig-subclasses: IgM>IgG3>IgG1>IgG2>IgA1>IgA2>IgG4. At present, it is well-established that downstream IgG-subclasses are produced, at least in part, by consecutive switching of B-cells during repeated rounds of (MBC) response,<sup>44-47</sup> leading to a greater frequency of somatic hypermutation<sup>44,46,47</sup> and switch regions bearing remnants of indirect class-switching<sup>46</sup> in cells expressing downstream Ig-isotype/Ig-subclasses. Interestingly, we recently identified a similar pattern of sequential production of MBC expressing distinct Ig-subclasses during lifetime<sup>23</sup>. These findings, together with recent observations using genome-wide sequencing approaches, suggest that consecutive switching along the *IGHC* locus might deteriorate in PAD, possibly due to combined hypomorphic/deleterious variants,<sup>48-50</sup> haploinsufficient genes<sup>51-54</sup> and epigenetic modifications<sup>55</sup> involving B-cell response pathways, rather than a single genetic defect. Progressive deterioration of sequential class-switching along the *IGHC* locus, along with reduced MBC and lack of PC, lead to a progressively more restricted repertoire and decreased functional capacity of MBCs expressing downstream IgG-subclasses.

Previous flowcytometry approaches typically excluded CVID patients with <1% B-cells from analysis, due to insufficient B-cell numbers for robust dissection of its major subsets.<sup>15,18</sup> Our high-sensitive approach allows detection of low numbers of blood MBCs and PCs expressing IgG1-4 and IgA1-2 subclasses, showing that most CVID patients retain the ability for class-switching, including the great majority (>70%) of smB<sup>-</sup> cases presenting with dramatically reduced switched-MBCs.<sup>18</sup> This is consistent with more laborious functional studies that demonstrated (residual) capacity of B-cells to produce IgG, also among smB<sup>-</sup> patients.<sup>56</sup> Our EuroFlow strategy for highly-sensitive Ig-subclass analysis of blood B-cells and PCs, identified six

CVID subgroups with different IgG-switching patterns and clinical profiles, even within smB-negative CVID patients. The three clinically milder subgroups included patients capable of producing MBCs of the (first 3) IgM/D, IgG3 and IgG1 Ig-isotypes/subclasses located upstream in the *IGHC* locus (independently of smIgG2<sup>+</sup> and IgA<sup>+</sup> MBC counts), who might potentially require less IgG-substitution therapy.<sup>56</sup> In fact, despite patients of all groups have higher frequency of infections, those within the CVID-1-3 groups required less hospital care (data not shown). CVID-4 cases were still capable of CD27<sup>+</sup> unswitched-MBC production, and typically presented with enteropathy and cytopenias, like in hyper-IgM syndromes.<sup>57-59</sup> However they had no PCs (including no IgM<sup>+</sup> PCs in all but one case) and they showed a typical CVID-related serum Ab-profile, in the absence of *in vitro* functional defects associated with hyper-IgM syndromes<sup>60</sup> (data not shown).

The two clinically more severe CVID-5, and particularly CVID-6, patient subgroups had dramatically decreased CD27<sup>+</sup> unswitched-and switched-MBCs, except for CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>IgG3<sup>+</sup>MBCs that were found to be almost normal in CVID-5 (but not in CVID-6) cases. From the clinical point of view, CVID-5 and CVID-6 patients showed disease symptoms (e.g. organomegalies) reflecting an impaired ability to mount GC responses.<sup>23,46,61</sup> Altogether, these findings suggest that even if the residual CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>smIgG3<sup>+</sup> MBCs could offer some immune protection in CVID-5, in CVID-5 and CVID-6 cases the underlying immune dysregulation leads to a polyclonal lymphocytic infiltration of secondary lymphoid tissues, previously associated with increased risk for lymphoid malignancy in CVID.<sup>62</sup> In fact, all patients with hematologic tumors were clustered in CVID-5 and CVID-6 (Supplementary Table 6). Although it is tempting to hypothesize that such stepwise deterioration of IgG-switching capacity might reflect disease progression, no significant differences in age (or time from diagnosis) were observed among the above CVID patient subgroups (except for CVID-6 patients, which were older at time of analysis than CVID-2 and CVID-3 cases).



The most severe CVID immunological phenotype –(CVID-6)– also showed significantly reduced pre-GC B-cells, reflecting a markedly defective BM B-cell production.<sup>18,20,41</sup> Most blood B-cells in these patients showed an immature/transitional phenotype, reflecting their premature egress from BM,<sup>39</sup> while residual naive B-cells were enriched in the minor CD21<sup>lo</sup> naive B-cell subset. The reduced pre-GC B-cells, together with the low *in vitro* response of both immature and CD21<sup>lo</sup> naive B-cells,<sup>39,63</sup> might explain the marked Ag-experienced B-cell defect involving all Ig-isotypes found in CVID-6 cases. In line with previous observations<sup>20</sup>, these patients also had decreased naive T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> counts vs. age-matched HD and other CVID patients (data not shown), but they did not fulfill the diagnostic criteria for late-onset combined immunodeficiency;<sup>5</sup> the potential existence of underlying hypomorphic defects and variants of genes related to the production of lymphocytes (*RAG*, *DCLRE1C*, *NHEJ1*) previously related to CVID-like clinical phenotypes, remains to be more deeply investigated in those CVID-6 cases.<sup>48–</sup>

50

In summary, detailed dissection of circulating MBCs and PCs into subsets expressing distinct Ig-subclasses in PAD, provides complementary information to serum Ab isotype-levels, and might contribute to a better pathogenic understanding of PAD, with improved PAD diagnosis, subclassification, and monitoring (particularly in case of Ig-replacement therapy). Blood PCs emerged here as the most sensitive diagnostic blood cellular compartment, while analysis of blood MBC subsets appeared informative to discriminate patients with different clinical profiles.

## REFERENCES

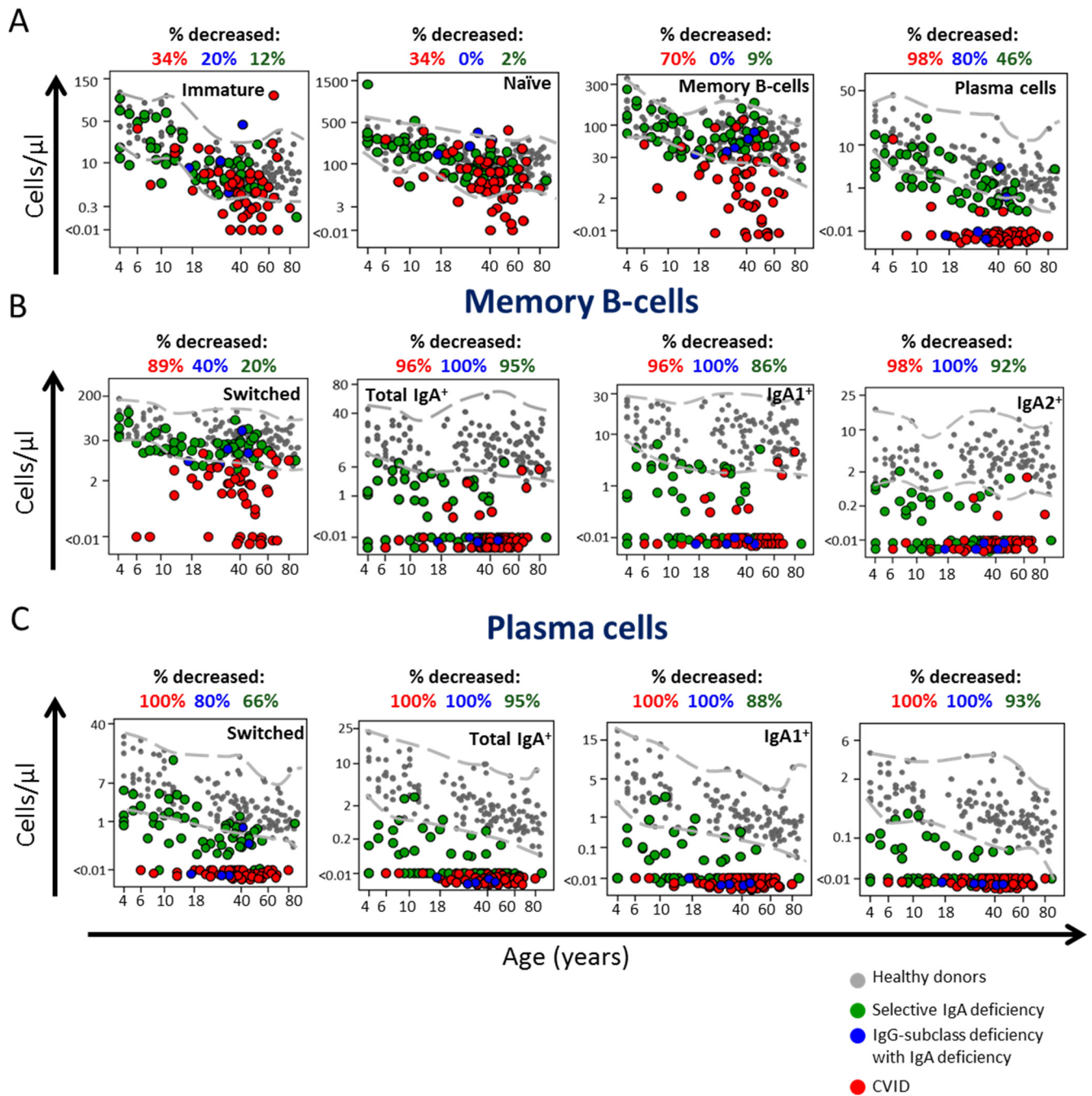
1. Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol* 2013;13:519–33.
2. Wood PM. Primary antibody deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol* 2010;17:356–61.
3. Wang N, Hammarstrom L. IgA deficiency: what is new? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:602–8.
4. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* 2018;38:96–128.
5. Abinun M, Albert M, Buckland SBCM, Bustamante J, Cant A, Casanova J-L, et al. ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID. 2017.
6. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:581–91.
7. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013;1:545–56.
8. Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol* 2017;85:3–12.
9. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2012;2012:301–5.
10. Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, et al. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1197–8.
11. Chapel H. Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) - Diagnoses of Exclusion, Especially Combined Immune Defects. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:1158–9.
12. Bertinchamp R, Gerard L, Boutboul D, Malphettes M, Fieschi C, Oksenhendler E. Exclusion of Patients with a Severe T-Cell Defect Improves the Definition of Common Variable Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:1147–57.
13. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:38–59.
14. Piqueras B, Lavenu-Bombled 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;23:385–400.
15. 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;99:1544–51.

16. Al Kindi M, Mundy J, Sullivan T, Smith W, Kette F, Smith A, et al. Utility of peripheral blood B cell subsets analysis in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2012;167:275–81.
17. Pięta B, Pac M, Siewiera K, Pietrucha B, Klaudel-Dreszler M, Heropolitańska-Pliszka E, et al. Common variable immune deficiency in children - Clinical characteristics varies depending on defect in peripheral B cell maturation. *J Clin Immunol* 2013;33:731–41.
18. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111:77–85.
19. Aghamohammadi A, Abolhassani H, Biglari M, Abolmaali S, Moazzami K, Tabatabaeiyan M, et al. Analysis of switched memory B cells in patients with IgA deficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:462–8.
20. Driessen GJ, van Zelm MC, van Hagen PM, Hartwig NG, Trip M, Warris A, et al. B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiologic backgrounds in common variable immunodeficiency. *Blood* 2011;118:6814–23.
21. Marasco E, Farroni C, Cascioli S, Marcellini V, Scarsella M, Giorda E, et al. B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subsets and identifies specific defects in immunodeficient patients. *Eur J Immunol* 2017;47:131–43.
22. Driessen GJ, Dalm VASH, van Hagen PM, Grashoff HA, Hartwig NG, van Rossum AMC, et al. Common variable immunodeficiency and idiopathic primary hypogammaglobulinemia: two different conditions within the same disease spectrum. *Haematologica* 2013;98:1617–23.
23. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O, et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2018;in press.
24. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017;31:2094–2103.
25. Blanco E, Perez-Andres M, Sanoja-Flores L, Wentink M, Pelak O, Martín-Ayuso M, et al. Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells. *J Immunol Methods* 2017;in press.
26. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martín-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26:1986–2010.
27. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2015;
28. MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 1: Statistics*. Berkeley, Calif.: University of California Press; 1967. page 281–97.
29. Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Liaw WHA, Lumley T, et al. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. R Packag. version 2.17.0.2015;2015.
30. Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet* 2016;53:575–90.

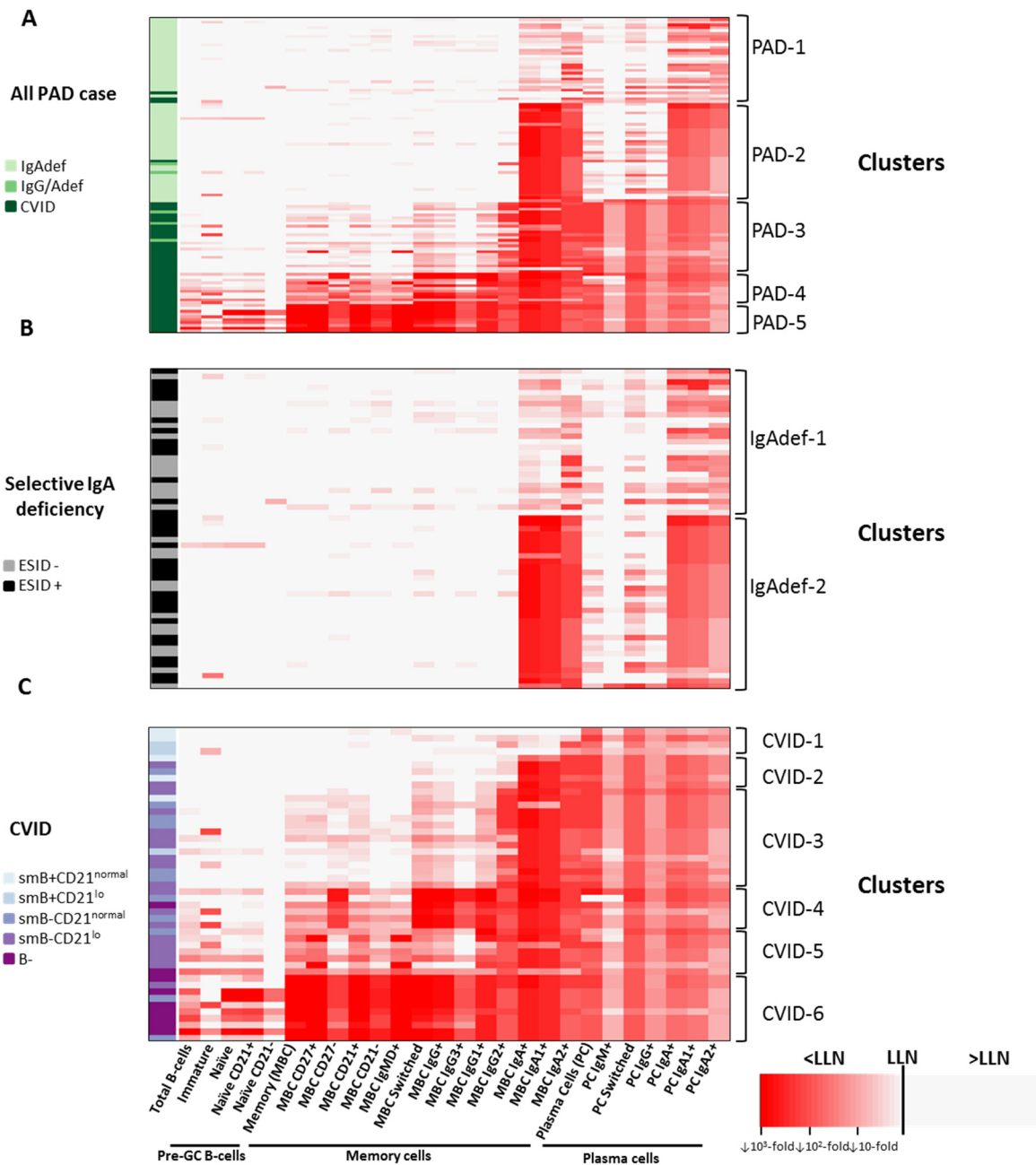
31. Kienzler A-K, Hargreaves CE, Patel SY. The role of genomics in common variable immunodeficiency disorders. *Clin Exp Immunol* 2017;188:326–32.
32. Nechvatalova J, Pikulova Z, Stikarovska D, Pesak S, Vlkova M, Litzman J. B-lymphocyte subpopulations in patients with selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2012;32:441–8.
33. Piatosa B, Wolska-Kusnierz B, Pac M, Siewiera K, Galkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010;78:372–81.
34. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol* 2009;133:95–107.
35. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 2010;162:271–9.
36. van den Heuvel D, Jansen MAE, Nasserinejad K, Dik WA, van Lochem EG, Bakker-Jonges LE, et al. Effects of nongenetic factors on immune cell dynamics in early childhood: The Generation R Study. *J Allergy Clin Immunol* 2017;
37. Huck K, Feyen O, Ghosh S, Beltz K, Bellert S, Niehues T. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin Immunol* 2009;131:50–9.
38. Bogaert DJA, De Bruyne M, Debacker V, Depuydt P, De Preter K, Bonroy C, et al. The immunophenotypic fingerprint of patients with primary antibody deficiencies is partially present in their asymptomatic first-degree relatives. *Haematologica* 2017;102:192–202.
39. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-Cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2010;78:47–60.
40. Unger S, Seidl M, Schmitt-Graeff A, Bohm J, Schrenk K, Wehr C, et al. Ill-defined germinal centers and severely reduced plasma cells are histological hallmarks of lymphadenopathy in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2014;34:615–26.
41. Ochtrop MLG, Goldacker S, May AM, Rizzi M, Draeger R, Hauschke D, et al. T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood* 2011;118:309–18.
42. Wang Z, Yunis D, Irigoyen M, Kitchens B, Bottaro A, Alt F. Discordance between IgA switching at the DNA level and IgA expression at the mRNA level in IgA-deficient patients. *Clin Immunol* 1999;91:263–70.
43. Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, Rezaei N, Moin M, Espanol T, et al. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:87–92.
44. Jackson KJL, Wang Y, Collins AM. Human immunoglobulin classes and subclasses show variability in VDJ gene mutation levels. *Immunol Cell Biol* 2014;92:1–5.
45. Collins AM, Jackson KJL. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol* 2013;4:235.
46. Berkowska M, Driessen G, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al.

- Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 2011;118:2150–8.
47. de Jong BG, IJspeert H, Marques L, van der Burg M, van Dongen JJ, Loos BG, et al. Human IgG2- and IgG4-expressing memory B cells display enhanced molecular and phenotypic signs of maturity and accumulate with age. *Immunol Cell Biol* 2017;95:744–52.
  48. Volk T, Pannicke U, Reisli I, Bulashevskaya A, Ritter J, Bjorkman A, et al. DCLRE1C (ARTEMIS) mutations causing phenotypes ranging from atypical severe combined immunodeficiency to mere antibody deficiency. *Hum Mol Genet* 2015;24:7361–72.
  49. Abolhassani H, Cheraghi T, Rezaei N, Aghamohammadi A, Hammarstrom L. Common Variable Immunodeficiency or Late-Onset Combined Immunodeficiency: A New Hypomorphic JAK3 Patient and Review of the Literature. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015;25:218–20.
  50. Abolhassani H, Wang N, Aghamohammadi A, Rezaei N, Lee YN, Frugoni F, et al. A hypomorphic recombination-activating gene 1 (RAG1) mutation resulting in a phenotype resembling common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:1375–80.
  51. Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW, et al. Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med* 2016;374:1032–43.
  52. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* 2014;20:1410–6.
  53. Fliegau M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon S-T, Lehnert K, et al. Haploinsufficiency of the NF-kappaB1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2015;97:389–403.
  54. Tuijnenburg P, Lango Allen H, Burns SO, Greene D, Jansen MH, Staples E, et al. Loss-of-function nuclear factor kappaB subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *J Allergy Clin Immunol* 2018;in press.
  55. Rodríguez-Cortez VC, del Pino-Molina L, Rodríguez-Ubreva J, Ciudad L, Gómez-Cabrero D, Company C, et al. Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-to-memory B-cell transition. *Nat Commun* 2015;6:7335.
  56. Rösel AL, Scheibenbogen C, Schliesser U, Sollwedel A, Hoffmeister B, Hanitsch L, et al. Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and a memory B-cell functionality assay. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:198–208.
  57. Leven EA, Maffucci P, Ochs HD, Scholl PR, Buckley RH, Fuleihan RL, et al. Hyper IgM Syndrome: a Report from the USIDNET Registry. *J Clin Immunol* 2016;36:490–501.
  58. Qamar N, Fuleihan RL. The hyper IgM syndromes. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014;46:120–30.
  59. de la Morena MT. Clinical Phenotypes of Hyper-IgM Syndromes. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:1023–36.
  60. O’Gorman MR, Zaas D, Paniagua M, Corrochano V, Scholl PR, Pachman LM. Development of a rapid whole blood flow cytometry procedure for the diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome patients and carriers. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:172–81.

61. Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 2006;177:3728–36.
62. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008;112:277–86.
63. Isnardi I, Ng Y, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I, et al. Complement receptor 2/CD21-human naïve B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 2010;115:5026–36.



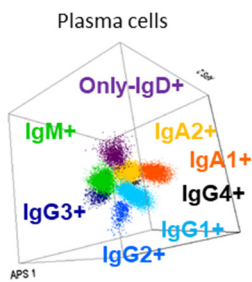
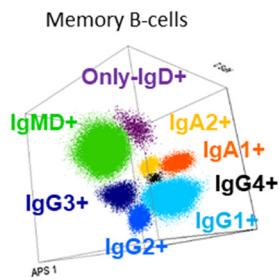
**Figure 1. Absolute counts of distinct maturation-associated subpopulations of blood B-cells and plasma cells (Panel A), and the total switched, total IgA and IgA subclass subsets of memory B-cells (Panel B) and plasma cells (Panel C) in CVID (n=47), IgG-subclass deficiency with IgA deficiency (n=5) and selective IgA deficiency patients (n=59) vs. healthy donors (n=140) distributed by age. Individual cases are represented by green (selective IgA deficiency), blue (IgG-subclass deficiency with IgA deficiency), red (CVID), and grey dots (healthy donors). Dotted grey lines represent maximum and minimum age-associated reference (range) values. The percentage of patients with reduced numbers compared to age reference values per age group is depicted above each plot using the same color code. CVID, common variable immunodeficiency.**



**Figure 2. Heatmap-based cluster analysis of all patients with predominantly antibody deficiency (Panel A), and those with selective IgA deficiency (panel B) and CVID (Panel C).** Each heatmap represents counts of the different B-cell subsets normalized by the lower limit value in normal controls (LLN) for the corresponding age-group (columns) vs. individual cases (rows). Higher red color intensities represent a deeper degree of deficiency in a log<sub>10</sub> scale, compare to the corresponding age-matched LLN. Individual patients (rows) are identified by i) their IUIS (clinical) diagnosis (panel A; light green for selective IgA deficiency, intermediate green for IgG subclass deficiency with IgA deficiency and dark green for CVID); and ii) their corresponding ESID SIgAD diagnosis (panel B), including SIgAD cases which fulfilled (black) or not (grey) the ESID criteria for selective IgA deficiency; and iii) CVID EUROclass classification subgroup (panel C), smB+ CD21<sup>normal</sup>, smB+ CD21<sup>lo</sup>, smB- CD21<sup>normal</sup>, smB- CD21<sup>lo</sup> and B- from lighter to darker violet. The identified PAD 1-5 (panel A), IgAdef 1-2 (panel B) and CVID 1-6 (panel C) clusters are depicted at the right side of each heatmap. CVID, common variable immunodeficiency; ESID, European Society for Immunodeficiencies; LLN, lower limit of normality; PAD, predominantly antibody deficiency; IgG/Adef, IgG subclass deficiency with IgA deficiency; sIgAdef, selective IgA deficiency.

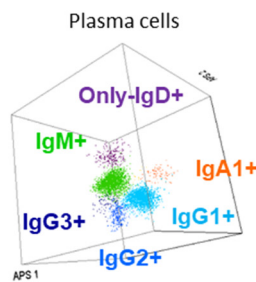
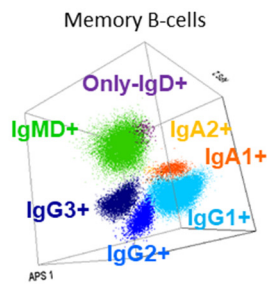


### A. Healthy donor

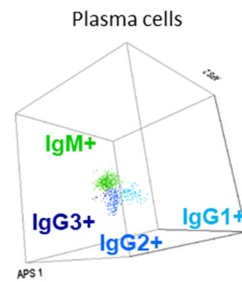
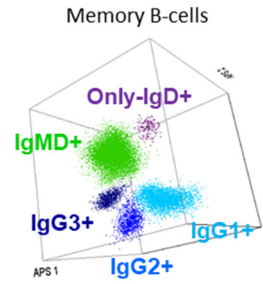


### B. Selective IgA deficiency

#### IgAdef-1 cluster

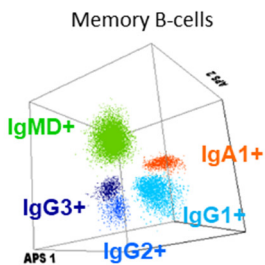


#### IgAdef-2 cluster

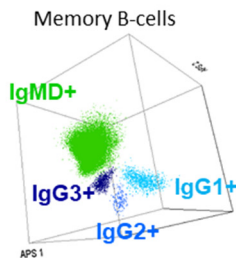


### C. CVID

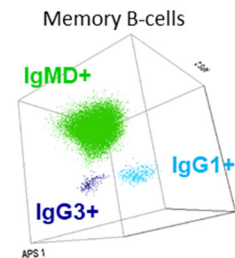
#### CVID-1 cluster



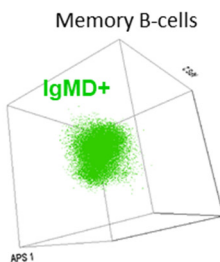
#### CVID-2 cluster



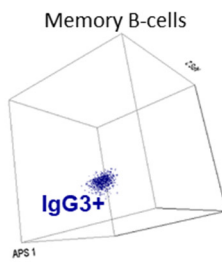
#### CVID-3 cluster



#### CVID-4 cluster



#### CVID-5 cluster



#### CVID-6 cluster

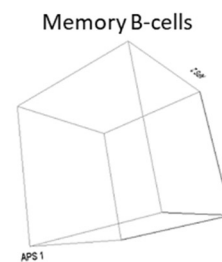
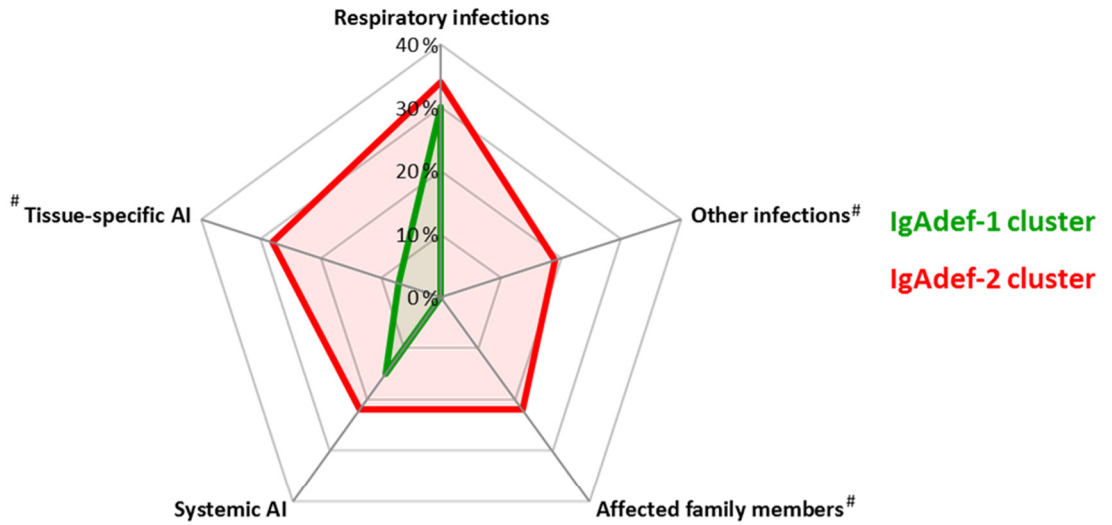
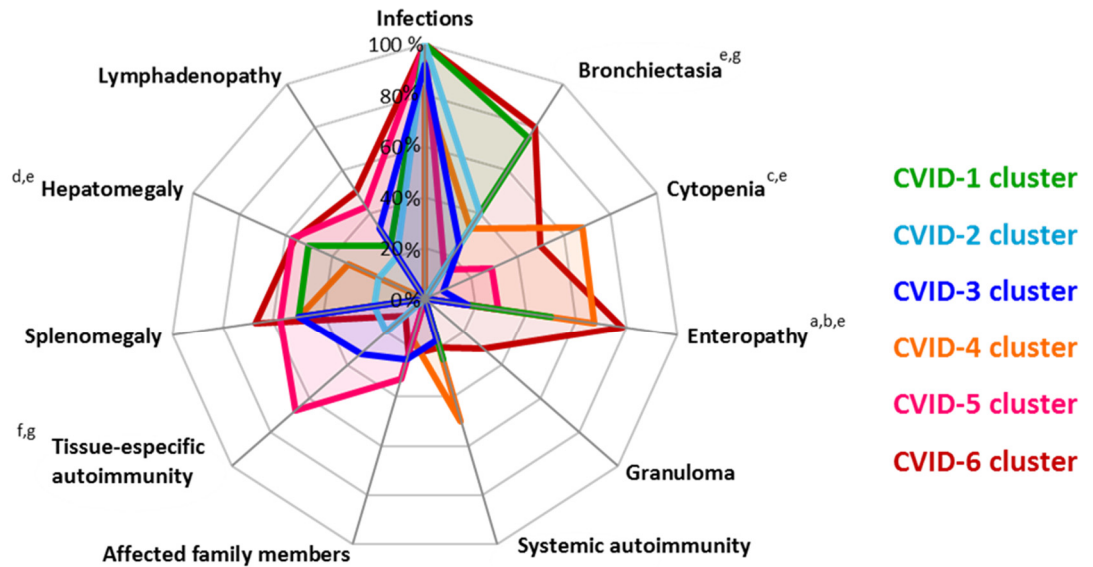


Figure 3. Illustrating dot plot examples of the numerical distribution of blood unswitched- and switched-memory B-cell and plasma cell subsets expressing different Ig-isotypes and Ig-subclasses in a representative healthy donor (panel A) and in representative patients with selective IgA deficiency (Panel B) and CVID (Panel C). Each plot corresponds to 3-D Automated Population Separator (APS) views of Principal Component 1 (PC1) vs. PC2 vs. PC3, of the distinct subsets of memory B-cells and plasma cells defined by the Ig-isotype and Ig-subclass expressed: IgM(D+) (green), IgG1 (light blue), IgG2 (intermediate blue), IgG3 (dark blue), IgG4 (black), IgA1 (orange), IgA2 (yellow) and IgD (violet). CVID, common variable immunodeficiency; sIgADef, selective IgA deficiency.

### A. Selective IgA deficiency



### B. CVID



**Figure 4. Frequency of distinct clinical manifestations of PAD and the existence (vs. absence) of affected family members among the distinct clusters (i.e. groups) of selective IgA deficiency and CVID patients defined by their distinct patterns of altered B-cell and PC subset counts.** Radar charts represent the percentage of selective IgA deficiency (panel A) and CVID (panel B) patients presenting with each type of clinical manifestation of the disease and the presence of family members affected by PAD. Colored lines indicate the distinct patient groups as defined by clustering analysis based on the B-cell and PC subset defects identified (see also Figure 2). <sup>#</sup> $P < 0.05$  for IgAdef-1 vs. IgAdef-2; <sup>a</sup> $P < 0.05$  for CVID-2 vs. CVID-4; <sup>b</sup> $P < 0.05$  for CVID-2 vs. CVID-6; <sup>c</sup> $P < 0.05$  for CVID-3 vs. CVID-4; <sup>d</sup> $P < 0.05$  for CVID-3 vs. CVID-5; <sup>e</sup> $P < 0.05$  for CVID-3 vs. CVID-6; <sup>f</sup> $P < 0.05$  for CVID-4 vs. CVID-5; <sup>g</sup> $P < 0.05$  for CVID-5 vs. CVID-6





# Discusión



Las IDP-Ac son un grupo de trastornos del sistema inmune asociados a una alteración de la respuesta de los linfocitos B, en cuyo diagnóstico y clasificación juegan un papel clave los niveles séricos de los isotipos y/o subclases de Acs<sup>11,209,213</sup>. Sin embargo, la utilidad clínica de los niveles séricos de Acs presenta algunas limitaciones, a la hora de reflejar de forma fidedigna las capacidades y el estado de la respuesta B<sup>19,53,100,409</sup>, siendo por otra parte el comportamiento clínico de pacientes con un mismo subtipo diagnóstico de IDP-Ac, muy heterogéneo<sup>13,231,236,249,328</sup>. Globalmente, los pacientes con IDP-Ac se caracterizan por mostrar una gran variabilidad en cuanto a manifestaciones clínicas y su grado de severidad, incluyendo desde casos asintomáticos hasta pacientes que presentan infecciones graves y recurrentes, asociadas a otras complicaciones no infecciosas<sup>244,246,247,249-252,256,257</sup>, que terminan por condicionar en muchos casos, una menor calidad de vida y una supervivencia significativamente acortada<sup>247,249,256</sup>. Por otra parte, en la gran mayoría de pacientes, como por ejemplo en aquellos diagnosticados de IDVC, no logra realizarse un diagnóstico definitivo basado en la demostración de una (o varias) alteraciones genéticas patogénicas, al carecer de un defecto monogénico conocido (>90% de los casos)<sup>231,265,266</sup>. Por todo ello, se estima que el diagnóstico y clasificación de las IDP-Ac, se retrasa de media entre 4 y 9 años<sup>236,244,245</sup>, desde las primeras manifestaciones clínicas y/o hallazgos de laboratorio, lo que puede llevar a la instauración de daño tisular irreversible en los órganos afectados.

Desde hace tiempo, se ha identificado la existencia de alteraciones en la distribución y número de distintas poblaciones de células B de SP de pacientes con IDVC por citometría de flujo, asociándose el perfil de alteraciones descritas, con el comportamiento clínico de la enfermedad, especialmente el descenso del número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo<sup>250,253,284,286,287,379</sup>. Sin embargo, en los estudios publicados con anterioridad a la realización de esta tesis doctoral, únicamente se evaluaba un número limitado de poblaciones celulares y, al contrario de lo que ocurre con la determinación de Acs séricos, no se discriminaba dentro de los linfocitos B, aquellos que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs<sup>250,253,284,286,287,379</sup>.

Además, debido a su baja sensibilidad, en muchos de estos estudios no fue posible identificar de forma sensible y reproducible las CPs circulantes<sup>250,286,287,379</sup>, ni las demás subpoblaciones B cuando los pacientes presentaban números reducidos de linfocitos B en SP (<1% de los linfocitos totales)<sup>250,286</sup>. Por otro lado, los valores de referencia establecidos para definir los defectos en los distintos compartimentos de linfocitos B no han tenido en cuenta de forma casi sistemática los cambios descritos en la distribución de los linfocitos B de sangre con la edad<sup>136,137,189,191</sup>, a pesar de que las IDP-Ac pueden ser diagnosticadas a cualquier edad.

Dado que entendíamos que la evaluación directa de las alteraciones presentes en los distintos compartimentos madurativos de los linfocitos B, incluidas las subpoblaciones de células B de memoria y de CPs que expresan distintos isotipos y subclases de Igs, podría contribuir a un mayor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a las IDP-Ac, e incluso a su clasificación y estratificación pronóstica, nos planteamos como primer objetivo de nuestro estudio, desarrollar una metodología que permitiera diseccionar los compartimentos de linfocitos B de memoria y de CPs de SP y órganos linfoides, en función del isotipo y subclase de Ig expresado. Empleando esta metodología, nos propusimos como segundo objetivo, conocer en profundidad los cambios que se producen, tanto en las poblaciones B de SP clasificadas de acuerdo a su estadio madurativo como por la expresión de distintos isotipos de Igs y subclases de IgG e IgA, a lo largo de la vida. Una vez establecida la metodología y los valores de referencia por edad, establecimos como tercer objetivo de este trabajo doctoral, identificar las posibles alteraciones de las poblaciones de linfocitos B de SP, que fueran características de pacientes con IDP-Ac y de sus principales subtipos diagnósticos, tratando además de correlacionar dichas alteraciones con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En este apartado de la memoria del trabajo doctoral realizado, abordaremos la discusión genérica de los resultados obtenidos de forma separada para cada uno de estos tres objetivos.



## 1. Selección y validación de clones de Acs para la identificación de distintas subclases de IgG e IgA en linfocitos B de memoria y CPs de sangre.

La relevancia clínica de la cuantificación de los niveles séricos de Igs agrupadas por isotipo y subclase, deriva de la posibilidad de disponer y emplear Acs específicos, sensibles y robustos, que permiten su determinación en diferentes fluidos corporales, de forma reproducible entre distintos laboratorios y mediante distintas técnicas. Para que esto fuera una realidad, a finales de los años 80 y principios de los 90 la IUIS organizó junto a la OMS una serie de estudios multicéntricos cuyo objetivo fue: evaluar el desempeño de distintos clones de Acs para todos y cada uno de los isotipos y subclases de IgG e IgA<sup>411-413</sup>. Mediante este esfuerzo, se validaron distintos clones de Acs específicos de cada isotipo y subclase de Ig, tanto desde el punto de vista de su idoneidad para llevar a cabo estas determinaciones mediante un amplio abanico de técnicas –por ejemplo, mediante hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunoabsorbent assay*), inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, electrotransferencia, inmunoprecipitación y aglutinación en látex, entre otros–, como desde el punto de vista clínico<sup>411-413</sup>. Sin embargo, no se validó la utilización de estos reactivos para el estudio de células B mediante citometría de flujo<sup>411-413</sup>. Ante esta situación, y a pesar del tiempo transcurrido desde entonces, y de disponer de herramientas validadas para la cuantificación de Igs solubles por isotipo y subclase de Ig, el número de estudios que han tratado de cuantificar los linfocitos B que expresan distintas subclases de IgG e IgA ha sido muy limitado<sup>131,414-416</sup>. Aun así, en algunos trabajos se ha demostrado que es factible identificar las subclases de Igs expresadas en células B procedentes de cultivo o de la fracción de células mononucleadas aisladas de SP. Por el contrario, ninguno de estos estudios ha demostrado la posibilidad de realizar dicho análisis directamente en SP total, ni tampoco se realizaron comparaciones entre los distintos clones frente a un mismo isotipo y subclase de Ig, validados para otros métodos, o se analizó su perfil de expresión en distintos compartimentos madurativos de linfocitos B, en diferentes tejidos y para distintas localizaciones

celulares (e.g. membrana vs. intracitoplasmáticas)<sup>131,414-416</sup>. Por todo ello, nos planteamos como primer objetivo de este trabajo evaluar la idoneidad de los clones comercialmente disponibles para la identificación de las distintas subclases de IgG1-4 e IgA1-2, para su utilización por citometría de flujo, con el fin de seleccionar y validar un grupo de reactivos idóneos para ser empleados en la identificación de dichas subclases de Igs en la superficie y/o citoplasma de linfocitos B y CPs de SP, de forma sensible, específica y reproducible, en diferentes condiciones y sobre distintos tipos de muestras humanas.

Tal como hemos referido ya en la introducción de esta memoria, las subclases de IgG e IgA presentan un elevado grado de homología entre ellas, lo cual dificulta la generación de clones de Acs capaces de diferenciar de forma específica cada una de las subclases de ambas Igs. Aun así, hoy se sabe que existen epítomos específicos de cada subclase de IgG e IgA, que además de estar íntimamente relacionados con sus funciones y características biológicas, permiten generar Acs específicos frente a cada una de ellas<sup>5,8,411-413,417,418</sup>. En el caso de las subclases de IgG, la mayoría de las diferencias estructurales que existen entre ellas, se localizan en la región bisagra y en los residuos del dominio CH2 más cercanos a esta región, zona a través de la cual se produce la unión de la Ig a la proteína C1q del sistema del complemento y a los receptores celulares FcγR<sup>5,7,8</sup>. De forma similar, las principales diferencias entre las subclases de IgA están relacionadas con el mayor tamaño de la región bisagra de la subclase IgA1 respecto a la IgA2, lo cual le hace también más susceptible a la ruptura proteolítica, a la vez que favorece su acceso al Ag reconocido<sup>30</sup>. Probablemente por esto, la mayoría de los clones de Acs evaluados en nuestro estudio que mostraron una adecuada reactividad frente a subclases de Igs expresadas en los linfocitos B y CPs humanas, estaban dirigidos frente a epítomos localizados en estas regiones<sup>411-413,416-420</sup>. Los motivos por los que los demás clones no presentaban reactividad, ni en linfocitos B ni en CPs, siguen siendo desconocidos. No obstante, dado que muchos de estos clones de Acs tenían su epítomo en la región CH3, la ausencia de reactividad observada, podría ser debida a la existencia de un impedimento estérico, dado que dicho dominio CH3 podría estar

menos accesible cuando la Ig se encuentra anclada en la membrana citoplasmática. Alternativamente, podría deberse a que los epítomos identificados por estos clones sean dependientes de las condiciones de ensayo, e.g. estar en formato soluble o inmovilizado en un sustrato de fase sólida. Finalmente, en 6 clones que mostraron un marcaje adecuado de los linfocitos B de memoria y de las CPs, no conocíamos la localización exacta del epítomo identificado, excepto que este se encontraba en el Fc de la Ig; la alta homología que existe entre los dominios CH3 de las distintas subclases del mismo isotipo de Ig<sup>8</sup> sugiere que probablemente, no vayan dirigidos frente a esta región, quedando por mapear con precisión la zona reconocida. En definitiva, nuestros resultados parecen indicar que la región CH2, junto con la región bisagra, constituyen los dominios de las moléculas de Igs más eficientes para la unión de Acs específicos de las distintas subclases de IgG e IgA, cuando estas Igs se encuentran en la membrana de los linfocitos B y de las CPs.

Además de las características del epítomo, existen otros factores que pueden influir y modular la reactividad de un clon de Ac dirigido frente a una proteína concreta, como la técnica y el protocolo empleados para el marcaje, y el tipo celular y/o tejido empleado<sup>411-413,421,422</sup>. Esto es debido a que los epítomos de una proteína dada varían (y por tanto la unión de los clones de Acs también), en función de la línea celular o del estadio madurativo de la misma, como consecuencia de: i) modificaciones post-transcripcionales concretas<sup>423</sup>, ii) *splicing* alternativo<sup>422</sup>, iii) la existencia de polimorfismos<sup>424</sup>, y/o iv) el estado de polimerización de la proteína diana<sup>425</sup>. Además, la disponibilidad de los epítomos para la unión de Acs, así como la propia unión de los Acs a los mismos, puede modificarse según las características de la técnica empleada para el revelado de la unión, incluyendo el tipo de anticoagulante y la técnica de marcaje empleados (membrana vs. citoplasmático) y la cantidad y concentración de la proteína disponible en forma soluble, unida a una célula, o inmovilizada sobre un sustrato sólido<sup>416,421,426,427</sup>. Además, en el caso concreto de los clones de Acs dirigidos frente a las distintas subclases de IgG e IgA, y de acuerdo con nuestros resultados, estudios previos en los que se emplearon otros tipos de

ensayos, mostraron que su eficacia dependía de la técnica empleada, probablemente debido a variaciones en los epítomos diana de cada clon, asociadas a las diferentes condiciones de cada ensayo<sup>411-413,421</sup>; precisamente esto, llevó a que no se pudieran seleccionar clones de referencia para todas las técnicas y protocolos evaluados, si no que se propusieron candidatos para las distintas aplicaciones<sup>411-413</sup>. De acuerdo con ello, de los 28 clones evaluados en nuestro estudio, y que previamente habían mostrado reactividad específica de subclase de IgG e IgA frente a Igs solubles<sup>411-413</sup>, solo 17 mostraron reactividad frente a las correspondientes subclases, expresadas en la membrana de linfocitos B de memoria y de CPs. Otros dos clones específicos de IgG2 e IgA1 (HP6207 y 512-H5.1, respectivamente), mostraron reactividad débil en linfocitos B de memoria, mientras que esta estaba ausente en CPs. Los 9 clones restantes no mostraron reactividad frente a ninguna subclase de IgG e IgA, ni entre los linfocitos B de memoria ni en las CPs.

De los 17 clones que mostraron reactividad inequívoca en la membrana de las células B, seleccionamos 6 (uno para cada subclase de IgG e IgA) de acuerdo a su especificidad, intensidad de marcaje y la disponibilidad comercial de reactivos conjugados con fluorocromos compatibles, para su posterior validación: SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, SAA1 y SAA2, dirigidos frente a IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, respectivamente. En el caso de IgG4, solo 1 de los 6 clones evaluados (SAG4) mostró positividad en linfocitos B de memoria y CPs, a pesar de que en un estudio previo se había mostrado marcaje con otro clon (HP6098) en linfocitos B purificados<sup>415</sup>. Para las demás subclases de IgG e IgA, existían otros clones, alternativos a los seleccionados, que habían mostrado en la primera evaluación global, una intensidad de marcaje y especificidad similares a la de los clones elegidos.

En esta segunda etapa de validación de los 6 clones seleccionados, determinamos en primer lugar, la posible existencia de reactividad cruzada de cada clon con más de una subclase de Ig, comprobando que los 6 reactivos seleccionados se unían de forma específica tanto a los linfocitos B de memoria como a las CPs, y que las células identificadas con cada clon eran

negativas para los 5 clones restantes. En vista de estos resultados, decidimos juntar todos los clones en una sola combinación de Acs, utilizando dos Acs del mismo clon conjugados con dos fluorocromos diferentes (i.e. IgG2-PE e IgG2-FITC; IgA1-APC e IgA1 PerCP-Cy5.5); así, era posible realizar la visualización del marcaje completo frente a las 6 subclases de IgG1-4 e IgA1-2, en un número relativamente reducido de fluorescencias (n=4). Esta aproximación había sido validada previamente para otros Acs, tanto por nuestro grupo como por otros autores<sup>428-430</sup>, y permitió comprobar que así, podríamos evaluar de forma específica, sensible y reproducible, tres subclases diferentes de Igs utilizando únicamente un par de fluorocromos.

Dado que no todos los clones de Acs que reconocen proteínas en la cara externa de la membrana citoplasmática de células vivas, reaccionan con la misma proteína cuando esta está presente a nivel intracelular en el retículo endoplasmático<sup>427</sup>, decidimos comprobar si los clones de Acs seleccionados podían detectar las subclases de IgG e IgA, también en el citoplasma de las células B de memoria, y sobre todo, de las CPs. En este sentido, nuestros resultados mostraron también que los 6 clones seleccionados eran capaces de reconocer la subclase correspondiente de Ig, tanto en la membrana externa, como en el citoplasma de las CPs, con una distribución relativa de CPs IgG1-4 e IgA1-2 similar a la observada cuando se realizaba únicamente el marcaje de membrana; sin embargo, observamos un menor porcentaje de CPs que no expresaban Igs. Estos resultados están de acuerdo con el menor nivel de expresión de Igs (y otras moléculas asociadas al BCR) descrito en la membrana vs. citoplasma de las CPs<sup>53</sup>. A su vez, a pesar del intenso marcaje observado para las subclases de IgG e IgA en la membrana de los linfocitos B de memoria, el marcaje intracelular para IgG1, IgG2 e IgG3 en estas células fue muy bajo (o indetectable), mientras que para IgG4, IgA1 e IgA2, era similar al observado en la membrana citoplasmática. Estos resultados indican que el marcaje intracelular podría ser más adecuado para una identificación más sensible y precisa de las Igs en CPs, mientras que la tinción de membrana sería la idónea para el estudio de los linfocitos B de memoria.

Una vez que los reactivos seleccionados habían demostrado un adecuado marcaje en SP, y debido a la variabilidad de marcaje que se ha descrito para algunos clones de Acs en función del tejido del que se trate<sup>422</sup>, decidimos testar los Acs seleccionados en células B de otros tejidos humanos. Así, pudimos demostrar que, tanto en muestras de MO como en las amígdalas analizadas, todos los clones seleccionados eran capaces de detectar sus correspondientes subclases de IgG e IgA en los linfocitos B de memoria y las CPs, demostrando su utilidad también para el estudio de estas poblaciones B en tejidos humanos distintos de SP.

Finalmente, cabe señalar que un subgrupo de los clones de Acs evaluados, especialmente los dirigidos frente a IgG1 e IgG3, mostraron reactividad cruzada frente a neutrófilos y monocitos. En este sentido, se sabe que tanto la IgG1 como la IgG3 poseen especial avidez por los receptores FcγRI y FcγRIII, expresados de forma intensa y homogénea en monocitos maduros y granulocitos neutrófilos, respectivamente<sup>5,8</sup>, asociándose así este marcaje aparentemente inespecífico con la expresión de los FcγR antes mencionados. En su conjunto, estos resultados sugieren que los clones de Acs anti-IgG1 y anti-IgG3 podrían estar uniéndose a los complejos FcRγ-IgG presentes en la superficie de los neutrófilos y de los monocitos. En este contexto merece destacar, que de acuerdo con la baja capacidad de los Acs de tipo IgG2, IgG4, IgA1 e IgA2 para unirse a los receptores FcR<sup>5,8</sup>, no se observó marcaje inespecífico en neutrófilos y monocitos de ningún tipo (IgG2), o este solo fue detectado de forma débil en algunas muestras (IgA1, IgA2 e IgG4). Por otra parte cabe señalar que, algunos de los clones que no mostraban reactividad frente a su subclase de IgG o IgA presente en la membrana de linfocitos B de memoria y de CPs, pero que se había demostrado sí detectaban las correspondientes subclases de Igs cuando se empleaban otras técnicas<sup>412,413,431</sup>, mostraban positividad en granulocitos neutrófilos y monocitos maduros de SP. Estos hallazgos sugieren que los epítomos de estos Acs podrían estar disponibles únicamente en la forma secretada de la Ig, o cuando esta se encuentra unida a Ags formando inmunocomplejos. Aunque los linfocitos B expresan FcγRIIb (CD32b), el marcaje de nuestros clones de Acs no pudo ser debido a uniones inespecíficas a este receptor,

ya que CD32b se expresa de forma uniforme en prácticamente todos los linfocitos B<sup>432</sup>, mientras que nuestros clones reaccionaron de forma específica frente a los linfocitos B de memoria y las CPs IgG<sup>+</sup> o IgA<sup>+</sup>.

En resumen, tras la evaluación de un amplio panel de Acs específicos de las distintas subclases de IgG e IgA, y que habían sido validados previamente para otros métodos, nuestros resultados muestran que existen clones y conjugados fluorescentes de clones de Acs específicos de las distintas subclases de IgG e IgA, que con los protocolos propuestos, proporcionan una herramienta rápida (<3 horas), específica, sensible (<10<sup>-5</sup>) y reproducible para la identificación y cuantificación de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria y CPs que expresan diferentes subclases de IgG e IgA tanto en SP como en otros tejidos humanos, siendo la expresión de dichas subclases de IgG e IgA más elevada en la membrana de los linfocitos B de memoria que en su citoplasma, al contrario de lo observado en las CPs.

## **2. Distribución en SP a lo largo de la vida de distintas subpoblaciones de linfocitos B inmaduros/transicionales, naïve y de memoria, y de CPs que expresan diferente isotipo y subclase de Ig.**

Una vez disponíamos de un panel validado de Acs específicos de las distintas subclases de IgG e IgA, nuestro interés se centró en conocer las variaciones que ocurren a lo largo de la vida en la distribución de las poblaciones de linfocitos B de memoria y CPs presentes en sangre, y que pudieran servir a su vez, como referencia para identificar alteraciones en las mismas asociadas a IDP-Ac.

Actualmente, existen múltiples evidencias que indican que la distribución de los linfocitos B en distintos estadios madurativos sufre modificaciones en SP, a lo largo de la vida<sup>53,117,136,189-191</sup>. Así mismo, se sabe también que los niveles séricos de los distintos isotipos y subclases de Igs, varían con la edad<sup>19,170,171,183,187,433</sup>. Sin embargo, al iniciar este trabajo no se conocía si existían cambios que afectaran a las poblaciones celulares B que expresan distintos isotipos y subclases de Igs. La definición de valores de referencia normales para dichas

poblaciones de linfocitos B identificadas de forma específica por el isotipo y subclase de Ig que expresan y clasificadas según su estadio madurativo, constituye un paso previo e imprescindible, al estudio de sus alteraciones en pacientes con IDP-Ac. Por todo ello, en esta fase del trabajo doctoral empleamos los reactivos y los protocolos validados en el objetivo anterior, para estudiar en profundidad los cambios que se producen en las subpoblaciones B de sangre, desde el nacimiento hasta la vejez, investigando también su posible relación con los niveles solubles de Igs en plasma.

Tanto los linfocitos B totales, como los linfocitos B inmaduros/transicionales y naïve aumentaron drásticamente durante el primer año de vida, hallazgos que corroboran los resultados encontrados previamente por otros autores<sup>189,190</sup>. A partir de esa edad, el número absoluto de estas poblaciones B en SP fue disminuyendo progresivamente hasta la edad adulta, momento a partir del cual se estabilizaron. Este patrón de variación numérica de las células B pre-CG en SP probablemente refleja una producción aumentada de linfocitos B por parte de la MO, que alcanza su máximo entre los 6 y los 20 meses de vida, para disminuir posteriormente hasta la edad adulta<sup>154</sup>. En este sentido y de acuerdo con estudios previos<sup>53</sup>, no se observaron diferencias en el número de linfocitos B inmaduros/transicionales o linfocitos B naïve, entre adultos jóvenes y ancianos, lo cual sugiere que el envejecimiento del sistema inmune no se asocia, en términos globales, a una disminución de la producción de linfocitos B en la MO, pese a la reducción significativa del componente hematopoyético de la misma en edades avanzadas de la vida<sup>152,153</sup>.

En contraposición con la producción masiva de linfocitos B pre-CG durante la infancia temprana, los estudios serológicos llevados a cabo en donantes sanos<sup>19,170,182,187,433,434</sup> y en sujetos vacunados<sup>435</sup> sugieren que los niños tienen una baja capacidad para producir Acs, y por ende, CPs. Sin embargo, nuestros resultados demuestran la presencia de CPs circulantes en la sangre de recién nacidos (aunque no en sangre de cordón), siendo estas fundamentalmente de isotipo IgM, lo que podría reflejar una exposición repentina a nuevos Ags ambientales, tras el



nacimiento<sup>71</sup>. De acuerdo con esta hipótesis, los niños de entre 6 meses y 2 años mostraron una producción masiva de CPs, alcanzando estas células a esta edad valores diez veces superiores a los observados posteriormente en adultos jóvenes. No obstante, esta producción masiva de CPs, no se acompañó de un aumento paralelo de los niveles séricos de Acs. En este sentido, dado que las CPs de vida larga constituyen la mayor fuente de producción de Acs séricos<sup>19,53,100</sup>, para que exista una producción significativa de estos, debe producirse previamente un acúmulo y aumento de CPs de vida larga en MO. Por tanto, la aparente discrepancia entre la producción relativamente baja de Acs observada en niños y el aumento masivo del número de CPs circulantes, podría tener su origen en la capacidad reducida de estas células para emigrar a la MO y/o acumularse en los nichos de supervivencia de la misma, asociada a la mayor susceptibilidad que presentan las CPs recién producidas de morir por apoptosis<sup>53,117</sup>, la inmadurez del ambiente medular tras el nacimiento<sup>155</sup> y/o la menor disponibilidad de nichos para su supervivencia por la elevada producción y proliferación de precursores B<sup>154</sup>. Posteriormente, al incrementarse los niveles de Igs solubles, observamos un descenso paralelo de las CPs que expresaban los correspondientes isotipos de Igs; esto podría ser debido al efecto inmunomodulador de la respuesta de los linfocitos ejercido por parte de los Acs<sup>436-438</sup>.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que los métodos utilizados clásicamente para evaluar la función efectora de los linfocitos B (i.e. niveles séricos de Acs), probablemente estén sesgados por la producción de Igs por parte de las CPs de vida larga de MO<sup>19,53,100</sup>. Dado que las CPs medulares pueden acumularse durante años<sup>19</sup>, los niveles de Acs séricos no reflejarían de forma fidedigna el estado real de la respuesta B en un momento concreto. Por el contrario, la evaluación del número de CPs producidas en sangre, cuyos máximos preceden en años o incluso décadas a los de los linfocitos B de memoria y de los niveles solubles en plasma de Igs del isotipo correspondiente, permitirían estimar de forma más directa el estado de la respuesta B. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que, al constituir las CPs de SP una población celular con un alta tasa de recambio<sup>53,117</sup>, su evaluación podría proporcionar una información mucho

más aproximada del estado de la respuesta B en tiempo real. Esto explicaría la estrecha relación secuencial existente entre el descenso del número de CPs normales circulantes, previa a la hipogammaglobulinemia, asociada a mayor riesgo de infección y a una menor producción de CPs de MO, observada en pacientes con neoplasias de linfocitos B<sup>439</sup> y de CPs<sup>440</sup>. Por todo lo anteriormente expuesto, la evaluación del número de CPs circulantes en sangre emerge como un marcador subrogado de la producción (futura) de CPs en MO y de los niveles de Igs solubles, planteando la posibilidad de que su evaluación sea de gran utilidad clínica, especialmente en IDP-Ac que no pueden diagnosticarse antes de los 4 años, debido a la reconstitución relativamente lenta de los niveles séricos de Acs durante la infancia<sup>11,210</sup>; en estos casos, la evaluación cuantitativa de las CPs circulantes podría constituir un marcador temprano de IDP-Ac.

En la edad adulta, al contrario de lo descrito anteriormente para los niveles séricos de Acs, los linfocitos B inmaduros/transicionales y los linfocitos B naïve, que permanecieron relativamente estables a lo largo de los años, tanto las CPs como los linfocitos B de memoria, mostraron un descenso significativo en individuos de edad más avanzada, lo que estaría de acuerdo con lo observado en estudios previos por otros autores<sup>53,117</sup>. Esta menor capacidad de generar linfocitos B efectores en respuesta a estimulación antigénica podría constituir una de las causas de la mayor tasa de infecciones (y mortalidad debido a las mismas), y de la menor respuesta a vacunación, observada en ancianos<sup>152</sup>, a pesar de que estos mostraron niveles de Acs similares (o incluso ligeramente aumentados), respecto a adultos jóvenes<sup>145,152,441-444</sup>.

En líneas generales, la cinética observada a lo largo de la vida, tanto para las CPs, como para los linfocitos B de memoria circulantes y los niveles séricos de Acs, fue diferente en función del isotipo y/o subclase de Ig y, especialmente, de la posición relativa que el isotipo/subclase de cada Ig ocupa en el gen *IGHC*. Así, los picos de producción de IgG3 e IgG1 precedieron a los de la IgG2 e IgG4 para las CPs (1-5 meses vs. 6-11 meses y 5-9 años, respectivamente), linfocitos B de memoria (2-4 años vs. 18-39 años) y niveles solubles de Acs (5-9 años vs. 18-39 años). Por el

contrario, las CPs IgA<sup>+</sup> no mostraron diferencias en cuanto a la edad a la que alcanzaban los valores máximos según la subclase de Ig expresada (ambas tuvieron su pico de producción a los 6-11 meses); esto posiblemente sea debido a la especialmente rápida respuesta de tipo IgA inducida por la colonización bacteriana masiva del intestino tras el nacimiento<sup>163</sup>. Sin embargo, en el caso de los linfocitos B de memoria y de los niveles solubles en plasma de Acs, observamos que la IgA1 se incrementaba de forma significativamente más rápida que la IgA2 (2-4 años vs. 18-39 años para los linfocitos B de memoria y 10-17 años vs. 40-59 años para los niveles de Acs séricos). Estudios previos sugieren que los isotipos y subclases de Igs codificados distalmente en el tercer bloque del gen *IGHC* (IgG2, IgG4 e IgA2) pueden, al menos parcialmente, ser generados mediante cambios secuenciales (i.e. secundarios) de isotipo de Ig, al producirse nuevos contactos por parte de los linfocitos B de memoria generados en un contacto anterior con Ag<sup>94-98</sup>.

Esta hipótesis se fundamenta en el mayor número de mutaciones somáticas y los niveles más elevados de selección antigénica que muestran estas subclases de IgG (IgG2 e IgG4) e IgA (IgA2) respecto a IgG1, IgG3 e IgA1<sup>95-97</sup>, así como en la presencia en estas células, de remanentes de secuencias procedentes de cambios de isotipo de Ig previos<sup>95,96</sup>. Aunque en un primer momento se sugirió que estos cambios de isotipo consecutivos solo se producirían durante el curso de una infección<sup>95,96</sup>, nuestros resultados, junto con los de otros autores<sup>97</sup>, sugieren que estos podrían producirse también a lo largo de la vida, tras el reencuentro de los linfocitos B de memoria generados en una primera respuesta frente a un determinado Ag, con dicho Ag. En líneas generales, las subclases de Igs codificadas en el tercer bloque del gen *IGHC* (IgG2, IgG4 e IgA2) presentan una menor capacidad para activar complemento, para opsonizar, y para activar a las células NK, granulocitos neutrófilos y monocitos/macrófagos, cuando se comparan con los isotipos/subclases de Igs codificadas en el primer y segundo bloque del gen *IGHC* (IgM, IgG3, IgG1 e IgA1)<sup>5,8,30</sup>. Por lo tanto, la producción secuencial de los distintos isotipos y subclases de Igs de acuerdo a su posición en el gen *IGHC*, observada a lo largo de la vida, podría estar asociada

también con respuestas más tolerogénicas en adultos *versus* niños, con menor potencial para generar expansiones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en individuos de edad más avanzada.

Además de presentar niveles más bajos de Acs séricos, los niños de corta edad muestran también una respuesta a vacunación distinta, al no lograr generar una respuesta sostenida, particularmente frente a bacterias encapsuladas<sup>152</sup>. Esto sugiere que la inmadurez de las respuestas secundarias de los linfocitos B en estos niños podría estar relacionada, no solo con el menor número de linfocitos B de memoria, sino también con la capacidad de estas células para responder frente a estímulos antigénicos. De hecho, nuestros resultados demuestran que los linfocitos B de memoria de sangre de cordón, neonatos y niños menores de 2 años, presentan importantes diferencias fenotípicas, respecto a los linfocitos B de memoria de niños mayores de dos años y de adultos, con patrones fenotípicos que implican distinto perfil de expresión de marcadores funcionales potencialmente relacionados con la maduración de otros componentes del sistema inmune, como el CG de los OLS (i.e. CD21 y CD27). Así, los pocos linfocitos B de memoria detectados en sangre de cordón y de recién nacidos, se caracterizaron por carecer de expresión de CD27, una molécula co-estimuladora cuya expresión está relacionada con la respuesta B del CG dependiente de linfocitos T<sup>111,123</sup>. De acuerdo con estos resultados, estudios realizados en tejidos procedentes de OLS han demostrado la ausencia de CGs durante la vida fetal y en recién nacidos<sup>157,158,445</sup>. Esto está de acuerdo con la expansión de los linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> observada a lo largo del primer año de vida.

En paralelo con el aumento de las células B de memoria CD27<sup>+</sup> observado a lo largo del primer año de vida, se produce también un aumento de los linfocitos B de memoria CD21<sup>-</sup> (receptor de C3b), asociados a una menor capacidad de responder frente a complejos complemento-polisacárido<sup>446,447</sup>. Pese a este aumento de los linfocitos B de memoria CD21<sup>-</sup>, el porcentaje de linfocitos B naïve CD21<sup>-</sup> permanecía estable durante este periodo, siendo la respuesta *in vitro* a polisacáridos por parte de los linfocitos B naïve de estos niños, comparable

a la observada en adultos<sup>448</sup>. En conjunto, estos hallazgos sugirieron que podrían existir factores externos que afectan al reconocimiento del Ag y que contribuyen a aumentar la producción de linfocitos B de memoria con expresión deficitaria del receptor de C3d en niños de hasta  $\approx 1$  año de vida, momento en el que los niveles séricos de C3 alcanzan los valores observados en adultos<sup>449</sup>. De acuerdo con estos datos, cabría plantearse la posibilidad de que durante el primer año de vida la disponibilidad relativamente limitada de C3d y de complejos C3d-Ag, contribuyese a reducir la señalización necesaria para la expresión de este receptor B durante el reconocimiento antigénico, lo cual ocasionaría el incremento observado de células B de memoria CD21<sup>+</sup> a partir de entonces.

A diferencia de lo comentado en niños, en adultos no observamos cambios en las poblaciones de células B de memoria CD27 y/o CD21, a pesar de que estudios previos han descrito que ciertas poblaciones de linfocitos B, como las llamadas “células de memoria atípicas” (CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>) o los linfocitos B CD11c<sup>+</sup> (que en nuestro estudio y en otros estudios se corresponden con los linfocitos B CD21<sup>-53</sup>) aumentarían durante el envejecimiento<sup>129,450</sup>. No obstante, no podemos descartar la existencia de otros marcadores fenotípicos o de otras poblaciones celulares B, que puedan contribuir a entender mejor los cambios en la inmunidad de los linfocitos B que ocurren en edades avanzadas y/o durante el envejecimiento. En este sentido, estudios recientes de nuestro grupo sugieren que el “fenotipo envejecido” del sistema inmune, podría estar relacionado con cambios derivados de la expansión de pequeños clones de células B con fenotipo predominantemente similar al de la leucemia linfática crónica (LLC) y que afectan a >20% de los sujetos mayores de 70 años<sup>439</sup>.

En conjunto, estos resultados sugieren que las características fenotípicas y la capacidad funcional de los linfocitos B de memoria podrían verse afectados por la maduración de otros componentes de la respuesta inmune, como los niveles de proteínas del complemento o el estado de los CGs en los tejidos linfoides. Además, la posición del isotipo y de la subclase de Ig en el gen *IGHC* parece tener un importante papel en las características fenotípicas y funcionales

de los linfocitos B de memoria, ya que aquellos que expresan los isotipos más cercanos a la región V(D)J (e.g. IgG3) contienen mayor porcentaje de células CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>, frente a aquellos isotipos y subclases localizadas al final del gen *IGHC* (e.g. IgG2), independientemente de la edad del individuo.

En definitiva, con el trabajo realizado y en base a los resultados obtenidos podemos afirmar que, a pesar de que los niveles séricos de Acs proporcionan una información valiosa acerca del estado de las CPs de vida larga de MO, y presumiblemente también del MALT, estos probablemente no reflejan de forma adecuada el estado de la respuesta B de un individuo en tiempo real. Por el contrario, el pico de producción de CPs circulantes que precedía en años/décadas a la producción de linfocitos B de memoria y niveles séricos máximos de Acs, sugiere que la evaluación cuantitativa de esta población B en SP podría proporcionar información más fiable del estado de la respuesta B de un individuo en un momento determinado, especialmente si tenemos en cuenta su elevada tasa de recambio. Además, la acumulación progresiva a lo largo de la vida de linfocitos B de memoria que expresan isotipos/subclases de Igs codificadas por los segmentos del gen *IGHC* más alejados de V(D)J, sugieren la existencia de ciclos de cambios de isotipo consecutivos, que ocasionan la acumulación de linfocitos B de memoria que expresan isotipos y subclases de Igs más tolerogénicas en individuos de edad más avanzada. Finalmente, con este trabajo proporcionamos por primera vez, valores de normalidad por grupo de edad para las múltiples subpoblaciones de linfocitos B de memoria y CPs de SP que expresan diferentes isotipos y subclases de Igs; esto proporciona un marco de referencia para el estudio de pacientes con IDP-Ac y otras enfermedades en las que está implicada la respuesta B, como la alergia, autoinmunidad, infecciones y cáncer<sup>439</sup>.

### **3. Distribución de las distintas poblaciones de linfocitos B de memoria y CPs de sangre en pacientes con IDP-Ac.**

Una vez validada la metodología desarrollada para una disección detallada de las distintas subpoblaciones B de SP, y establecidos los valores de referencia de normalidad por grupo de edad, nuestro interés se centró en determinar las posibles alteraciones de dichas poblaciones de linfocitos B y de CPs circulantes en pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de IDP-Ac, incluyendo como entidades más prevalentes el déficit selectivo de IgA, el déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA, y la IDVC.

En términos globales, la edad de los pacientes estudiados osciló entre los 4 años y los 90 años. De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, y las variaciones observadas en la distribución de las distintas poblaciones de células B en SP a lo largo de la vida, para la identificación adecuada de una distribución alterada de dichas poblaciones B en individuos con IDP-Ac se requería de forma sistemática, de la comparación con los valores de referencia de normalidad establecidos, pareados por grupo de edad. Con esta aproximación, todos los pacientes analizados que presentaban IDP-Ac, mostraron números reducidos respecto a donantes sanos del mismo grupo etario de al menos una población de linfocitos B de memoria y/o CPs definidas en base a la expresión de distintas subclases de IgG e IgA. Esta elevada prevalencia de alteraciones B contrasta con los resultados de estudios previos, en los que se había analizado la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con IDP-Ac utilizando citometría de flujo, y en los que solamente se lograron identificar defectos en las células B del 6-86% de los casos, incluyendo 77-86% de los pacientes con IDVC<sup>137,196,250,284-287</sup>, ≈30% de los sujetos con déficit de subclases de IgG (con o sin déficit de IgA asociado)<sup>285</sup> y 6-25% de los casos que presentaban déficit selectivo de IgA<sup>378,379</sup>. La mayor sensibilidad observada en nuestro estudio, probablemente sea debida a que el número de poblaciones evaluadas en estudios previos era mucho más limitado, restringiéndose mayoritariamente al análisis de los linfocitos B inmaduros/transicionales y naïve, además del conjunto de linfocitos B de memoria

con y sin cambio de isotipo, y de los linfocitos B CD21<sup>250,286,287,378,379</sup>. Por otra parte, la sensibilidad alcanzada con nuestra metodología fue también claramente superior a la de dichos estudios previos<sup>250,285,286,379,380</sup>, ya que analizamos un mínimo de 5 millones de células nucleadas de SP (vs.  $\leq 500.000$ ) por paciente. Finalmente, cabe señalar que en la mayoría de los estudios previos, no se tuvieron en cuenta los cambios que se producen en la distribución de las diferentes poblaciones de linfocitos B a lo largo de la vida<sup>250,286,287,378,379</sup>, lo cual podría influir también en la diferente sensibilidad obtenida en estos trabajos respecto a la descrita aquí.

De acuerdo con la hipótesis planteada acerca de la posibilidad de que las CPs circulantes pudieran constituir el marcador más sensible para la evaluación de la respuesta B en tiempo real, las CPs de SP, y de forma especial las CPs IgA<sup>+</sup>, representaron la población celular más sensible para el diagnóstico de IDP-Ac, ya que se encontraban disminuidas numéricamente en la práctica totalidad (98%) de los pacientes analizados. La única excepción la constituyeron dos casos con déficit selectivo de IgA que presentaban valores normales de CPs circulantes, tanto IgA1<sup>+</sup> como IgA2<sup>+</sup>, asociados a un descenso del número de linfocitos B de memoria IgA1<sup>+</sup> e IgA2<sup>+</sup>. Además, existían importantes diferencias en el patrón de alteraciones detectado en los distintos subtipos diagnósticos de IDP-Ac.

En líneas generales, las alteraciones observadas en los pacientes con déficit selectivo de IgA estaban restringidas a los linfocitos B IgA<sup>+</sup> y las CPs IgA<sup>+</sup>, sin que en estos pacientes se observaran déficits significativos en los compartimentos de células IgG<sup>+</sup> o en las poblaciones pre-CG. Sin embargo, a pesar de los defectos observados en los linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> y las CPs IgA<sup>+</sup>, cerca de la mitad de los pacientes con déficit selectivo de IgA mostraron niveles detectables de linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> y de CPs IgA<sup>+</sup>. De acuerdo con estos resultados, en un estudio previo se había mostrado también que en 2 de 4 pacientes estudiados con déficit selectivo de IgA, los linfocitos B de SP presentaban expresión de las regiones S $\mu$ -S $\alpha$ , lo cual apoyaría la existencia de células B IgA<sup>+</sup> en estos sujetos<sup>451</sup>. Además, recientemente se ha identificado mediante citometría de flujo la presencia de linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> en SP de



pacientes con déficit de IgA, aunque en este estudio dichas células solo estaban presentes en <10% de los pacientes evaluados<sup>380</sup>, probablemente debido a que solo se analizaron en cada caso  $\approx 5 \times 10^4$  leucocitos<sup>380</sup>, frente a los  $\geq 5 \times 10^6$  evaluados en nuestro trabajo. Desde el punto de vista clínico, los pacientes que mostraron una capacidad de cambio de isotipo a IgA preservada, presentaban un fenotipo (clínico) menos severo, asociado a una menor frecuencia de autoinmunidad (característica que se ha sugerido que puede estar relacionada con un mayor riesgo de progresión a IDVC<sup>354,355</sup>), de infecciones no-respiratorias y de antecedentes familiares de IDP-Ac. Por lo tanto, podríamos concluir que la evaluación detallada de los defectos de linfocitos B y CPs de SP de pacientes con déficit selectivo de IgA, podría contribuir a una mejor subclasificación y manejo clínico de estos pacientes.

Al contrario de lo que ocurría en sujetos con déficit selectivo de IgA, los pacientes con IDVC mostraron alteraciones que afectaban tanto a los compartimentos de células B IgA<sup>+</sup> como IgG<sup>+</sup>. De hecho, la ausencia de CPs con cambio de isotipo (tanto IgA<sup>+</sup> como IgG<sup>+</sup>) fue una característica común a todos los pacientes con IDVC, hallazgo que está de acuerdo con estudios previos que han demostrado la existencia de defectos en las CPs de MO<sup>283</sup>, ganglio linfático<sup>298</sup> y SP<sup>284</sup> de estos sujetos. Por otro lado, varios autores han descrito también defectos en los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes con IDVC, habiendo relacionado además estas alteraciones, con un comportamiento clínico más severo de la enfermedad<sup>250,281,284,286,287</sup>. Nuestro trabajo constituye el primer estudio en el que se ha diseccionado el compartimento de los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en función de la subclase concreta de Ig expresada, de forma similar a lo realizado de manera rutinaria para el análisis de los niveles séricos de IgG1-4. De este modo, identificamos un deterioro progresivo de la capacidad de cambio de isotipo de IgG de los linfocitos B de memoria de estos pacientes, que afectaba de forma secuencial a IgG2>IgG1>IgG3>IgM, siguiendo una trayectoria inversa a la de la localización de estos isotipos y subclases de Igs en el gen *IGHC*. De acuerdo con estos hallazgos, previamente se había descrito ya un patrón similar de frecuencia de expresión de

ARNm para los diferentes isotipos/subclases de Igs en células B de SP de pacientes con IDVC: IgG4<IgA2<IgA1<IgG2<IgG1≤IgG3<IgM<sup>287</sup>.

Como hemos comentado previamente, varios estudios, incluido el nuestro<sup>452</sup>, han sugerido que, en el gen *IGHC*, las subclases de Igs más alejadas de V(D)J se producirían, al menos en parte, por cambios de isotipo y subclase consecutivos, durante ciclos repetidos de re-encuentro de los linfocitos B de memoria con su correspondiente Ag<sup>95-97,111</sup>. Estos hallazgos, junto con conocimientos recientes derivados de la secuenciación del genoma completo de pacientes con IDVC, sugieren que el deterioro observado en el cambio de isotipo consecutivo a lo largo del gen *IGHC* en la IDVC, podría ser debido a una combinación de variantes hipomórficas/perjudiciales<sup>268,271</sup>, genes haploinsuficientes<sup>272,453-455</sup> y/o modificaciones epigenéticas<sup>278</sup> que afecten a las rutas de señalización implicadas en la respuesta de los linfocitos B a Ag, más que a un defecto genético único. Estas alteraciones inducirían, además de un defecto en el número de linfocitos B de memoria y de CPs, un deterioro que afectaría de forma progresiva (y secuencial) a células B de memoria que expresan isotipos y subclases de Igs localizadas en el gen *IGHC* de forma cada vez más cercana a la región V(D)J; esto conllevaría a la disponibilidad de un repertorio B cada vez más restringido y con menor capacidad funcional, dentro de los linfocitos B de memoria.

De forma habitual, en los estudios previos en los que se empleó la citometría de flujo para el análisis de las poblaciones de células B de SP de pacientes con IDVC, se han excluido de cualquier análisis aquellos pacientes con IDVC que presentaban <1% de linfocitos B, respecto al total de linfocitos; esto ha sido motivado por el hecho de que la metodología empleada en estos trabajos, no alcanzaba una sensibilidad suficiente para poder identificar dentro de las células B, sus subpoblaciones mayoritarias<sup>250,286</sup>. Sin embargo, al aumentar la sensibilidad mediante el análisis de un mínimo de 5 millones de leucocitos, nuestros resultados demuestran la posibilidad, no solo de identificar, sino también de cuantificar de forma precisa, las subpoblaciones de linfocitos B pre-CG, linfocitos B de memoria y CPs que expresan distintas

subclases de IgG1-4 e IgA1-2. Gracias a ello, pudimos comprobar que, a pesar del descenso del número de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo característico de los pacientes con IDVC, la mayoría de los casos analizados conservaba la capacidad de cambio de isotipo de Ig. De hecho, incluso en aquellos pacientes clasificados dentro del subtipo de IDVC smB<sup>-</sup> de acuerdo con el sistema propuesto por EUROclass<sup>250</sup>, y que se caracterizan por mostrar un número muy reducido de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo ( $\leq 2\%$  de todos los linfocitos B), más de dos tercios de ellos presentaban linfocitos B de memoria con cambio de isotipo de Ig en niveles detectables en SP; estos hallazgos apoyan los resultados de estudios previos en los que se utilizó la técnica de ELISpot para demostrar que los linfocitos B de SP de pacientes con IDVC poseen capacidad funcional residual de producir Acs IgG demostrada *in vitro*, incluso en (algunos) casos clasificados como smB<sup>-305</sup>; desde el punto de vista terapéutico, se ha sugerido que dichos pacientes (potencialmente) podrían necesitar dosis menores de Igs de sustitución<sup>305</sup>.

Globalmente, según el patrón de alteraciones B observado en la SP de pacientes con IDVC, identificamos 6 subgrupos diferentes asociados con distintos perfiles clínicos. Así, aquellos pacientes que mantenían la capacidad de producir linfocitos de memoria IgM/D, IgG3 e IgG1, es decir, de producir isotipos y subclases de Igs codificadas en las localizaciones más cercanas a la región V(D)J del gen *IGHC* (independientemente de los números de linfocitos B de memoria IgG2<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>) (grupos 1, 2 y 3), presentaban manifestaciones clínicas menos graves y requerían de menor atención hospitalaria respecto a los demás pacientes con IDVC (grupos 4, 5 y 6). Por el contrario, los pacientes en los que se observaba ausencia total de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en SP, aunque tenían linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> IgM<sup>++</sup>D<sup>+</sup> (grupo 4), mostraron mayor frecuencia de citopenias autoinmunes y enteropatía. Ambas características clínicas son típicas también de los síndromes híper-IgM<sup>306,307,456</sup>, pero a diferencia de estos últimos, en este subgrupo de pacientes con IDVC no se detectaban CPs (incluidas CPs IgM<sup>+</sup>) excepto en un caso, asociado a un perfil de Acs séricos típico de IDVC, en ausencia de los defectos funcionales (*in vitro*) asociados a síndromes híper-IgM<sup>457</sup>.

Así mismo, los pacientes con IDVC que presentaban un déficit severo de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> con y sin cambio de isotipo de Ig, pero mantenían una producción residual de linfocitos B de memoria CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>IgG3<sup>+</sup> (grupo 5) y los pacientes que mostraban ausencia prácticamente total de linfocitos B de memoria (grupo 6), presentaban manifestaciones clínicas más graves (e.g. organomegalias y mayor frecuencia de tumores hematológicos), probablemente debidas a su incapacidad de montar respuestas inmunes en los CGs de los OLS<sup>111,123,452</sup>. Además de las alteraciones ya descritas, los pacientes del grupo 6 se caracterizaron por presentar también, una reducción significativa del número de linfocitos B pre-CG en SP, lo cual podría reflejar un defecto en la producción de estas células en la MO<sup>250,283,284</sup>. Además, la mayoría de linfocitos B de estos pacientes mostraron un fenotipo inmaduro/transicional, reflejando su salida prematura de la MO<sup>53</sup>; a la vez, dentro de los linfocitos B naïve detectados en estos sujetos, existía un aumento relativo del compartimento de células B CD21<sup>-</sup> frente a las células B naïve CD21<sup>+</sup>. Tanto las células inmaduras como los linfocitos B naïve CD21<sup>-</sup> se caracterizan por presentar una menor capacidad de respuesta *in vitro*<sup>53,119</sup>, lo que unido al defecto en el número de linfocitos pre-CG, podría contribuir a explicar la disminución global, e incluso la ausencia total, de linfocitos B dependientes de Ag característica de estos pacientes. Además, aunque este subgrupo de IDVC no llega a cumplir los criterios diagnósticos de inmunodeficiencia combinada<sup>11</sup>, incluía pacientes que mostraban también números significativamente reducidos de linfocitos naïve T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, respecto tanto a donantes sanos de la misma franja etaria, como a otros pacientes con IDVC, de forma similar a lo observado por otros autores en pacientes con estas características<sup>284</sup>. En conjunto, estos defectos B sugieren la posible existencia de mutaciones hipomórficas y variantes en genes relacionados con la producción de linfocitos (*RAG*, *DLREC*, *NHEJ1*), identificadas en otros pacientes con fenotipos clínicos similares a IDVC<sup>268,269,271</sup>. Ante estos hallazgos, sería lógico pensar que el deterioro variable de la capacidad de cambio de isotipo de Ig observado en los pacientes diagnosticados de IDVC podría reflejar distintos momentos evolutivos de la

enfermedad; sin embargo, no observamos diferencias significativas en la edad de los pacientes incluidos en los distintos grupos identificados, a excepción del grupo 6, cuyos pacientes presentaban en el momento de realizar el estudio edades más avanzadas que los de los grupos 2 y 3.

Finalmente, tal como sería de esperar, los pacientes con déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA, mostraron un perfil de alteraciones en las poblaciones de linfocitos B de SP intermedio entre el déficit selectivo de IgA y la IDVC, careciendo algunos de ellos de CPs circulantes. Además, de acuerdo con el defecto secuencial en el cambio de isotipo y subclases de IgG e IgA observado en linfocitos B de memoria de pacientes con IDVC, los pacientes con déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA mostraron únicamente alteraciones en linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> e IgG2<sup>+</sup>, de acuerdo con el defecto en los niveles séricos de Acs que presentaban.

En resumen, nuestros resultados muestran que, mientras que las CPs son la población de células B de SP más sensible para el diagnóstico de IDP-Ac, los defectos en las subpoblaciones de linfocitos B de memoria, y en especial de las definidas por el isotipo y subclase de Ig expresada, permiten subclasificar con elevada precisión pacientes con perfiles clínicos distintos. De este modo, podemos concluir que el estudio detallado de los linfocitos B y CPs circulantes de acuerdo a la subclase de Ig expresada y a otros marcadores funcionales (i.e. CD27 y CD21), y su comparación con valores de referencia definidos por grupo de edad, contribuye a entender mejor la patogenia de las IDP-Ac, a facilitar un diagnóstico y clasificación más precisos de este grupo de enfermedades, y potencialmente también, a poder realizar una monitorización más eficiente de estos pacientes.



# Conclusiones





**En relación con el primer objetivo, centrado en seleccionar y validar un panel de Acs monoclonales para la detección específica y sensible de las distintas subclases de IgG e IgA expresadas en linfocitos B de memoria y CPs de SP y otros tejidos humanos, mediante citometría de flujo:**

1.- De todos los clones de Acs comercialmente disponibles y previamente validados para la identificación de subclases de IgA e IgG mediante distintas técnicas, solo una parte de ellos fueron capaces de identificar estas subclases de Igs cuando estaban expresadas en la superficie de linfocitos B de memoria y CPs, lo que pone de manifiesto la necesidad de evaluar minuciosamente cualquier clon de Ac antes de poder incluirlo en un panel diagnóstico de citometría de flujo.

2.- Los clones de Acs seleccionados y validados, así como los protocolos propuestos, permiten la identificación y cuantificación rápida, específica, sensible y reproducible de las distintas poblaciones de linfocitos B y CPs presentes en SP y otros tejidos, en función del isotipo y subclase de Ig expresada, y de la localización predominante (de membrana vs. citoplasmática) de la misma.

**En relación con el segundo objetivo, encaminado a definir la distribución normal a lo largo de la vida de las distintas poblaciones de linfocitos B de memoria y CPs circulantes, definidas en función del isotipo y subclase de Ig que expresan:**

3.- Los linfocitos B inmaduros, naïve y de memoria, así como las CPs, alcanzan sus niveles máximos en sangre antes de los 4 años de vida, disminuyendo posteriormente hasta la edad adulta. A partir de ahí, los linfocitos B inmaduros/transicionales y naïve se mantienen estables, mientras que el número de linfocitos B de memoria y de CPs vuelven a disminuir a partir de los 60 años, pudiendo este descenso estar relacionado con la menor respuesta a vacunación y la mayor tasa de infecciones descrita entre estos sujetos, a pesar de que poseen niveles de Acs similares a los de adultos jóvenes.

4.- El análisis comparativo de los patrones de distribución de las CPs y de los linfocitos B de memoria en sangre, así como de los Acs solubles en plasma, a lo largo de la vida, muestra que existe una cinética diferente para cada uno de ellos, alcanzándose el pico de producción de CPs varios años antes que el de linfocitos B de memoria, y que los niveles (máximos) de Acs de los correspondientes isotipos y subclases de Igs. Esto sugiere que el número de CPs en SP podría constituir el marcador más sensible a la hora de evaluar el estado de la respuesta B de un individuo en tiempo real.

5.- Las CPs y los linfocitos B de memoria de sangre, así como los Acs de distintas subclases e isotipos de Igs que corresponden a diferentes bloques del gen *IGHC*, alcanzan sus niveles más elevados a diferentes edades, lo que probablemente refleja los ciclos consecutivos de cambio de isotipo de Ig que ocurren a lo largo de la vida. La acumulación de linfocitos B de memoria que expresan isotipos de Igs del tercer (y último) bloque del gen *IGHC*, podría estar asociada con una respuesta B con características más tolerogénicas, típica de edades más avanzadas de la vida.

**En relación con el tercer objetivo, centrado en definir con precisión las posibles alteraciones en la distribución de las distintas poblaciones de linfocitos B y de CPs de SP en pacientes con IDP-Ac, y su posible relación con el subtipo diagnóstico y el comportamiento clínico de la enfermedad:**

6.- Un análisis detallado de los compartimentos de linfocitos B de memoria y de CPs de SP, clasificados en función del isotipo y subclase de Ig que expresan y de los marcadores funcionales CD27 y CD21, demostró la existencia de alteraciones B en todos los pacientes con IDP-Ac, observándose distintos patrones de alteración para los diferentes subtipos diagnósticos de este grupo de enfermedades; estos hallazgos, sugieren que el análisis de estas subpoblaciones de células B de SP podría constituir una herramienta útil en el diagnóstico, clasificación e incluso, la monitorización de estos pacientes.

7.- Los pacientes con déficit selectivo de IgA se caracterizan por presentar un defecto severo de producción de CPs IgA1<sup>+</sup> y/o IgA2<sup>+</sup>, aunque pueden definirse dos grupos de pacientes con distinto comportamiento clínico, según el grado de afectación de los linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> circulantes. Estos hallazgos sugieren que el estudio de dichas subpoblaciones celulares podría contribuir al diagnóstico y subclasificación de pacientes con déficit selectivo de IgA.

8.- De forma sistemática, los pacientes con IDVC carecen de CPs circulantes IgG<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>. Además, estos pacientes presentan también, un deterioro progresivo de la capacidad de cambio (secuencial) de isotipo de Ig en los linfocitos B de memoria de SP, que progresivamente afectan a cada vez más isotipos y subclases de Igs según su localización en el gen *IGHC*: de los más distales a los más cercanos a la región V(D)J del gen *IGHC*. Así, según el patrón de alteraciones observado podemos definir hasta 6 subgrupos de pacientes con IDVC distintos, que muestran diferente comportamiento clínico. Estos hallazgos apoyan la utilidad del análisis de las distintas subpoblaciones de células B de SP mediante citometría de flujo, en el diagnóstico y clasificación de la IDVC.



# Anexo I



**Tabla suplementaria 1.– Genes relacionados con mutaciones monogénicas en IDVC.**

Gen, OMIM	Localización/ Función en linfocito B	Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas	Efecto sobre la proteína/ Herencia	Alteraciones en células del sistema inmune	Otras alteraciones inmunológicas	Manifestaciones clínicas	Familiares con IDP-Ac	Familiares asintomáticos	Población general	Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)	Referencias bibliográficas
<b>TAC1</b> 604907	17p11.2 Cambio de isotipo, diferenciación y supervivencia de CP y respuesta T-independiente	≥2150 Edad pediátrica y adulta	PF (expresión normal) AD/AR	Linfocitos B totales ↑, ↓ o normales y de memoria ↓ o normales. Linfocitos T (totales y subpoblaciones) ↓ o normales.	IgG ↓, IgA e IgM ↓ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos ↓ o normal.	Infecciones de repetición, hiperplasia linfoide, organomegalias y granuloma.	Si (Déficit de IgA y de subclases de IgG)	Si	Si	IDVC (predisposición)	273,370,372,458 –467
<b>BAFF-R</b> 606269	22q13.2 Supervivencia	82 Edad pediátrica y adulta	PF/GF (expresión normal) AR	Linfocitos B totales, naïve y de memoria ↓ o normales, linfocitos (T totales y subpoblaciones) normales.	IgG ↓, IgA e IgM ↓ o normales, respuesta a vacunas de polisacáridos ↓.	Infecciones de repetición, AI y enteropatía	Si (Déficit de IgA y de IgM)	Si	Si	IDVC (predisposición)	274,283,465,468 –471
<b>TNFSF12 (TWEAK)</b> 602695	17p13.1 Unión a BAFF	3 (1 familia) Edad pediátrica y adulta	PF (expresión normal) AD	Linfocitos B totales ↓ o normales, de memoria ↓, linfocitos T CD8 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ↑	IgG ↓, IgA e IgM ↓ o normal, ↓ respuesta a vacunas de polisacáridos y proteicas.	Infecciones respiratorias, meningitis, osteomielitis, citopenias autoinmunes.	Si (Déficit de IgG2)	No	No	IDVC	472
<b>NFKB1</b> 164011	4q24 Diferenciación, supervivencia, cambio de isotipo y tolerancia	42 (27 familias) Niños y adultos	PF (expresión ↓) AD	Linfocitos B totales normales, de memoria IgM <sup>++</sup> D <sup>+</sup> normales, de memoria IgG <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ↓ linfocitos B CD21 <sup>-</sup> ↑ y linfocitos T normales.	IgG ↓, IgA e IgM ↓ o normales, respuesta a vacunas de polisacáridos y proteicas ↓ o normal.	Infecciones de repetición, AI, adenopatías y organomegalias.	Si (Déficit de IgA y de subclases de IgG)	Si	No	IDVC	272,473–477
<b>NFKB2</b> 164012	10q24.32 Diferenciación, supervivencia, cambio de isotipo y tolerancia	23 (14 familias) Niños y adultos	PF (expresión ↓ o normal) AD	Linfocitos B totales y de memoria IgM <sup>++</sup> D <sup>+</sup> ↓ o normales, de memoria con cambio de isotipo ↓, linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> normales, de memoria y foliculares ↓ o normales.	IgG, IgA e IgM ↓, respuesta a vacunas de polisacáridos y proteicas ↓ o normal.	Infecciones de repetición, infecciones localizadas por herpes simple, déficit de hormonas pituitarias y AI (alopecia).	No	No	No	IDVC	478–486

**Tabla suplementaria 1 (continuación)**

Gen, OMIM	Localización/ Función en linfocito B	Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas	Efecto sobre la proteína/ Herencia	Alteraciones en células del sistema inmune	Otras alteraciones inmunológicas	Manifestaciones clínicas	Familiares con IDP-Ac	Familiares asintomáticos	Población general	Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)	Referencias bibliográficas
<b>IKZF1 (IKAROS)</b> 603029	7p12.2 Diferenciación linfoide	24 (9 familias) Edad pediátrica y adulta	PF (expresión ↓ o normal) AD	Linfocitos B totales ↓, de memoria ↓ o normales, presencia de CP en MO, linfocitos T totales y CD8+ ↑ o normales, CD4+ ↓ o normales.	IgG ↓, IgA e IgM ↓ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos y proteicas ↓ o normal.	Infecciones de repetición, citopenias autoinmunes y tumores hematológicos.	No	Si (en niños, posible evolución)	No	IDVC	265,453,473
<b>PIK3CD</b> 602839	1p36.22 Cascada de señalización a través del Co-BCR, IL21, CD27 y BAFF.	>150 Edad pediátrica	GF (expresión normal) AD	Linfocitos B totales y naïve ↓ o normales, de memoria con y sin cambio de isotipo normales o ↓, linfocitos T totales, CD4+ (totales y naïve) y CD8+ naïve ↓ o normales, T CD4+ de memoria y CD8+ totales y de memoria ↑.	IgG e IgA ↓ o normal (en la mayoría), IgM ↑ o normal, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos ↓ o normal.	Infecciones de repetición, (típicamente EBV y CMV), LP, AI, organomegalias, linfoma, retraso neurológico y retraso en el crecimiento.	No	Si (un caso)	No	IDVC	487-489
<b>PIK3R1</b> 171833	5q13.1 Cascada de señalización a través del Co-BCR, IL21, CD27 y BAFF.	52 (47 familias) Edad pediátrica Y adulta	PF (expresión normal) AD	Linfocitos B totales y naïve ↓ o normales, de memoria con y sin cambio de isotipo normales o ↓, linfocitos T totales, CD4+ (totales y naïve) y CD8+ naïve ↓ o normales, T CD8+ totales y de memoria ↑.	IgG e IgA normal o ↓ (en la mayoría), IgM ↑ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos ↓ o normal.	Similar al déficit de PIK3CD pero con mayor prevalencia de linfoma, retraso neurológico y de crecimiento	No	No	No	IDVC	487,488,490
<b>CD19</b> 107265	16p11.2 Co-receptor de célula B	11 (8 familias) Edad pediátrica y adulta	PF (expresión ↓ o ausente) AR	Linfocitos B totales normales, de memoria IgM <sup>++</sup> D <sup>+</sup> , IgG <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ↓ con IgA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> normales, linfocitos T (totales y subpoblaciones) normales, expresión ↓ de CD21.	IgG e IgA ↓, IgM ↓ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos y proteicas ↓.	Infecciones de repetición (incluyendo glomerulonefritis), hematuria microscópica y nefropatía.	No	No	No	IDVC	272,491-495
<b>CD21</b> 120650	1q32.2 Co-receptor de célula B	2 (2 familias) Edad pediátrica	PF (expresión ausente) AR	Linfocitos B totales normales, de memoria con cambio de isotipo ↓, linfocitos T (totales y subpoblaciones) normales.	IgG e IgA ↓, IgM ↓ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos ↓.	Infecciones de repetición, enteropatía, esplenomegalia y mialgias.	No	No	No	IDVC	447,496



**Tabla suplementaria 1 (continuación)**

<b>Gen, OMIM</b>	<b>Localización/ Función en linfocito B</b>	<b>Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas</b>	<b>Efecto sobre la proteína/ Herencia</b>	<b>Alteraciones en células del sistema inmune</b>	<b>Otras alteraciones inmunológicas</b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Familiares con IDP-Ac</b>	<b>Familiares asintomáticos</b>	<b>Población general</b>	<b>Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>
<b>CD81</b> 186845	11p15.5 Co-receptor de célula B	1 Edad pediátrica	PF (expresión ausente) AR	Linfocitos B totales normales, de memoria↓, linfocitos T (totales y subpoblaciones) normales, expresión↓ de CD21, expresión ausente de CD19.	IgG↓, IgA e IgM↓ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos y proteicas↓.	Infecciones de repetición (incluyendo glomerulonefritis) y síndrome inflamatorio.	No	No	No	IDVC	497
<b>CD20</b> 112210	11q12.2 Activación y diferenciación de células B	1 Edad pediátrica	PF (expresión ausente) AR	Linfocitos B totales normales, de memoria con cambio de isotipo↓, linfocitos T (totales y subpoblaciones) normales.	IgG↓, IgM e IgA normal, respuesta a vacunas de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición.	No	No	No	IDVC	498
<b>VAV1</b> 164875	19p13.3 Cascada de señalización a través del BCR	1 Edad adulta	PF (expresión↓) AD	Linfocitos B normales, linfocitos T totales y CD8 <sup>+</sup> normales, CD4 <sup>+</sup> ↓.	IgG, IgA e IgM↓.	Infecciones de repetición.	No	No	No	IDVC	499
<b>RAC2</b> 602049	22q13.1 Cascada de señalización a través del BCR	2 (1 familia) Edad pediátrica y adulta	PF (expresión ausente) AR	Linfocitos B↓, linfocitos T totales, CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> normales, CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> naïve bajos (incluyendo emigrantes recientes), Treg↓.	IgG, IgA e IgM↓, respuesta a vacunas de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición (incluyendo glomerulonefritis), retraso en el crecimiento, urticaria, alergia y defectos de coagulación.	No	No	No	IDVC	500
<b>BLK</b> 191305	8p23.1 Cascada de señalización a través del BCR	2 (1 familia) Edad pediátrica	PF (expresión normal) AD	Linfocitos B↓ o normales, de memoria IgA+↓, de memoria IgG+ normales, linfocitos T totales, CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> normales.	IgG↓, IgA e IgM↓ o normal, respuesta a vacunas de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición	No	No	No	IDVC	501
<b>IRF2BP2</b> 615332	1q42.3 Diferenciación y proliferación de células B de memoria y CP	3 (1 familia) Edad pediátrica	GF (expresión↑) AD	Linfocitos B normales, de memoria↓ o ausentes, linfocitos T normales.	IgG, IgA e IgM↓, respuesta a vacunas de polisacáridos y/o proteicas↓.	Infecciones respiratorias y AI.	No	No	No	IDVC	502

**Tabla suplementaria 1 (continuación)**

Gen, OMIM	Localización/ Función en linfocito B	Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas	Efecto sobre la proteína/ Herencia	Alteraciones en células del sistema inmune	Otras alteraciones inmunológicas	Manifestaciones clínicas	Familiares con IDP-Ac	Familiares asintomáticos	Población general	Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)	Referencias bibliográficas
<b>ATP6AP1</b> 300197	Xq28 Diferenciación, procesamiento de Ag y producción de Ig (no confirmado)	11 (6 familias) Edad pediátrica	PF (expresión↓)  Ligada a cromosoma X	Linfocitos B de memoria con cambio de isotipo↓. (no existe información sobre otras poblaciones)	IgG↓, IgA e IgM↓ o normal, respuesta a vacunas infantiles↓ (no especificado tipo)	Infecciones de repetición, organomegalias y síntomas neurológicos.	No	No	No	IDVC	503
<b>TRNT1</b> 612907	3p26.2 Síntesis de proteínas	27 (20 familias) Edad pediátrica	PF (expresión↓ o normal)  AR	Linfocitos B↓, inmaduros↑, naïve y memoria con cambio de isotipo↓ y linfocitos T CD4+ ↓ (solo descrito en algunos casos)	IgG, IgA e IgM↓	Episodios de fiebre, anemia sideroblástica, retraso en el crecimiento y problemas neurológicos.	No	No	No	IDVC	504–508
<b>TTC37</b> 614649	8p11.21 Desconocida	96 (85 familias) Edad pediátrica	PF (expresión normal)  AR	No existe información.	IgG, IgA e IgM↓. respuesta a vacunas de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición, alteraciones en el pelo (pelo lanoso, tricolorris nudosa), malformaciones faciales, enfermedad hepática y diarrea.	No	No	No	IDVC	509
<b>SEC61A1</b> 609213	3q21.3 Transporte de proteínas en el RE	11 (2 familias) Edad pediátrica	PF (expresión↓)  AD	Linfocitos B y T normales. CPs en SP y su generación tras estimulación <i>in vitro</i> ↓.	IgG, IgA e IgM↓ (en un paciente eran normales), respuesta a vacunas de polisacáridos↓ o normal y a proteicas↓	Infecciones de repetición.	No	No	No	IDVC (todavía no recogido en la clasificación de la IUIS)	510
<b>PRKCD</b> <b>176977</b>	3p21.1 Cascada de señalización a través del BCR	6 (4 familias) Edad pediátrica	PF (expresión↓ o ausente)  AR	Linfocitos B totales↓ o normales o↑, inmaduros y naïve normales o↑, linfocitos de memoria con cambio de isotipo↓, linfocitos B CD21↑, linfocitos T totales, CD4+ y CD8+↓ o normales, CD4-CD8- ↑ o normales, células NK↓ o normales.	IgG↓ o normal, IgA e IgM↑ o normal, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos↓ o normal.	Infecciones de repetición, infecciones por virus herpes (EBV y CMV), AI sistémica grave (similar a lupus eritematoso sistémico), organomegalias, LP y retraso en el crecimiento.	No	No	No	Déficit de PRKCD  (inmuno- desregulación)	511–514

**Tabla suplementaria 1 (continuación)**

Gen, OMIM	Localización/ Función en linfocito B	Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas	Efecto sobre la proteína/ Herencia	Alteraciones en células del sistema inmune	Otras alteraciones inmunológicas	Manifestaciones clínicas	Familiares con IDP-Ac	Familiares asintomáticos	Población general	Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)	Referencias bibliográficas
<b>PLCG2</b> 600220	16q23.3  Cascada de señalización a través del BCR	30 (4 familias)  Edad pediátrica	GF (expresión normal)  AD	Linfocitos B totales↓ o normales, de memoria IgG <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> ↓, linfocitos T (totales y supoblaciones) normales, células NK↓ o normales.	IgG, IgA e IgM↓ o norma, respuesta a vacunas de polisacáridos↓ o normal.	Problemas de piel (urticaria fría y atopía) AI, granulomas, infecciones por hongos, bacterias y herpes zóster.	No	No	No	PLAID (Síndrome autoinflamatorio)	515,516
<b>CTLA-4</b> 123890	2q33.2  Señalización a través de CD80/CD86	>100  Edad pediátrica y adulto	PF (expresión ↓)  AD	Linfocitos B totales↓ o normales, memoria con cambio de isotipo, CD21 <sup>+</sup> ↑, linfocitos T totales, CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> (naïve y totales)↓ o normales, de memoria CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> , Treg y T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ↓ o normales, células NK↓ o normales.	IgG, IgA e IgM↓ o normal (en la mayoría), respuesta a vacunas de polisacáridos↓ o normal.	Infecciones de repetición (incluyendo gérmenes oportunistas), AI grave (frecuentemente citopenias), LP con infiltración de órganos, enteropatía, organomegalias, adenopatías, cáncer y retraso de crecimiento.	Si (Déficit de IgA)	Si	No	Déficit de <i>CTLA-4</i> (Inmuno- desregulación)	454,473,517- 523524
<b>LRBA</b> 606453	4q31.3  Regulación de CTLA-4	77 (57 familias)  Edad pediátrica	PF (expresión ↓ o ausente en la mayoría)  AR	Linfocitos B totales, de memoria y CPs↓ o normales, inmaduras y naïve↓ o normales o↑, linfocitos CD21- normales o↑, linfocitos T totales, Treg, CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> (totales y naïve)↓ o normales, de memoria CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> y T foliculares normales o↑.	IgG e IgA↑ o normal o ↓ (en la mayoría), IgM ↓ o normal, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos↓ o normal.	Infecciones de repetición (incluyendo gérmenes oportunistas), AI grave y de inicio temprano, (especialmente citopenias y enfermedad inflamatoria intestinal), LP con infiltración de órganos, organomegalias, adenopatías, cáncer y retraso de crecimiento.	No	Si (dos casos < de 18 años asintomáticos; posible evolución)	No	Déficit de <i>LRBA</i> (Inmuno- desregulación)	272,473,525- 538
<b>ICOS</b> 604558	2q33.2  Cambio de isotipo, formación de CG, diferenciación	16 (7 familias)  Edad pediátrica y adulto	PF (expresión ausente)  AR	Linfocitos B totales↓ o normales, de memoria ausentes o↓, CPs en MO ausentes, linfocitos TCD4+, TCD8+ y T foliculares↓ o normales.	IgG↓, IgA e IgM↓ o normal, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición (incluyendo gérmenes oportunistas), AI, organomegalias, hiperplasia linfoide y granulomas.	No	No	No	Déficit de <i>ICOS</i> (CID)	539-543
<b>CD27</b> 186711	12p13.31  Diferenciación, supervivencia y cambio de isotipo	17 (9 familias)  Edad pediátrica y adulto	PF (expresión ↓ o ausente)  AR	Linfocitos B totales↓ o normales, de memoria ausentes, linfocitos T CD4 <sup>+</sup> ↓ o normales, T CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ↑ o normales.	IgG↓, normal o↑, IgA e IgM↓ o normal, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos↓ o normal.	Infecciones crónicas, graves y atípicas por EBV, anemia aplásica y linfoma.	No	No	No	Deficiencia de CD27 (Inmuno- desregulación)	544-546

**Tabla suplementaria 1 (continuación)**

Gen, OMIM	Localización/ Función en linfocito B	Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas	Efecto sobre la proteína/ Herencia	Alteraciones en células del sistema inmune	Otras alteraciones inmunológicas	Manifestaciones clínicas	Familiares con IDP-Ac	Familiares asintomáticos	Población general	Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)	Referencias bibliográficas
<b>IL21R</b> 605383	16p12.1 Cambio de isotipo, formación del CG y diferenciación	8 (6 familias) Edad pediátrica	PF (expresión↓ o ausente)  AR	Linfocitos B totales↓, normales o ↑, de memoria IgM <sup>+</sup> D <sup>+</sup> y con cambio de isotipo↓ o normales, linfocitos T totales normales, T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> y T foliculares↓ o normales, células NK↓ o normales.	IgG e IgA↓ o normal, IgM↑ o normal, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición, (incluyendo gérmenes oportunistas) organomegalias, lupus discoide e inflamación de la piel, enfermedad hepática y retraso de crecimiento.	No	No	No	Déficit de <i>IL21R</i> (CID)	547–550
<b>IL21</b> 605384	4q27 Cambio de isotipo, formación del CG y diferenciación	1 Edad pediátrica	PF (expresión normal)  AR	Linfocitos B totales↓, de memoria IgM <sup>+</sup> D <sup>+</sup> y con cambio de isotipo↓	IgG↓, IgA e IgM normal, IgE↑, respuesta a vacunas proteicas y de polisacáridos↓.	Infecciones de repetición, enfermedad inflamatoria intestinal y retraso de crecimiento.	No	No	No	Déficit de <i>IL21</i> (CID)	551
<b>STAT3</b> 102582	17q21.2 Reacción de CG, Diferenciación y cambio de isotipo.	23 (20 familias) Edad pediátrica	GF (expresión normal)  AD	Incompleto (solo algunos casos). Linfocitos B normales, naïve↑, de memoria IgMD <sup>+</sup> ↑ o normales, transicionales y de memoria con cambio de isotipo↓ o normales, linfocitos T totales y CD4 <sup>+</sup> (totales y naïve)↓ o normales, T CD8 <sup>+</sup> normales, TCD8 <sup>+</sup> y TCD4 <sup>+</sup> de memoria normales o↑.	IgG, IgA e IgM↓ o normales.	Infecciones de repetición (incluyendo gérmenes oportunistas), AI, LP, organomegalias y retraso de crecimiento.	No	Si	No	Mutación con ganancia de función en <i>STAT3</i>	267,473,552– 554
<b>IL2RG*</b> 308380	Xq13.1 Diferenciación	2 (1 familia) Edad adulta y pediátrica	PF (expresión↓)  Ligada a cromosoma X	Linfocitos B y T normales, ausencia de células NK.	IgG, IgA e IgM↓. respuesta a vacunas de polisacáridos y normal y proteicas↓.	Infecciones de repetición, AI (específica de órgano)	No	No	No	Déficit en <i>IL2RG</i> (γc)  (SCID T-B+)	270
<b>RAG1*</b> 179615	11p12 Recombinación V(D)J	3 (3 familias)	PF  AR	Linfocitos B↓, de memoria con cambio de isotipo↓, linfocitos T totales↓ de memoria↑, células NK↓ o normales.	IgG, IgA e IgM↓. respuesta a vacunas de polisacáridos↓ y a proteicas normal, ausencia de isohemaglutininas.	Infecciones de repetición, AI, organomegalias y linfoproliferación.	No	No	No	Déficit en <i>RAG1</i> (SCID T-B-)	268,555

**Tabla suplementaria 1 (continuación)**

Gen, OMIM	Localización/ Función en linfocito B	Nº pacientes analizados/ Inicio de síntomas	Efecto sobre la proteína/ Herencia	Alteraciones en células del sistema inmune	Otras alteraciones inmunológicas	Manifestaciones clínicas	Familiares con IDP-Ac	Familiares asintomáticos	Población general	Fenotipo IDVC/otra IDP (IUIS)	Referencias bibliográficas
<b>JAK3*</b> 600173	19p13.11 Diferenciación y supervivencia	1	PF AR	Linfocitos B totales normales, Linfocitos T y NK normales (↓ en estudio posterior).	IgG, IgA e IgM↓, ausencia de isohemaglutininas.	Infecciones de repetición (incluyendo gérmenes oportunistas), linfoproliferación, enteropatía y retraso de crecimiento.	No	No	No	Déficit en JAK3 (SCID T-B+)	269
<b>DCLRE1C*</b> 605988	10p13 Recombinación V(D)J	3 (1 familia)	PF AR	Linfocitos B↓, linfocitos T totales normales, y naïve↓.	IgG, IgA e IgM↓	Infecciones de repetición y AI.	No	No	No	Déficit de Artemis (SCID T-B-)	271

Tabla adaptada, y actualizada a partir de Bogaert *et al.*<sup>265</sup>. y Picard *et al.*<sup>209</sup>. \*Genes típicamente asociados a inmunodeficiencias combinadas severas, en los que se han observado mutaciones hipomórficas que originan fenotipos de IDVC, incluyéndose en la tabla solamente el número y las características de esos casos. ↓, descenso; ↑, aumento; AD, autosómica dominante; AI, autoinmunidad; AR, autosómica recesiva; CMV, citomegalovirus; CID, inmunodeficiencia combinada (del inglés, *combined immunodeficiency*); EBV, virus de Epstein-Barr; IDVC, inmunodeficiencia variable común; IDP-Ac, inmunodeficiencia predominantemente de anticuerpos; LP, linfoproliferación; PF, pérdida de función; GF, ganancia de función; SCID, inmunodeficiencia combinada severa (del inglés, *severe combined immunodeficiency*).



# Anexo II





## ARTÍCULO 1

### **Selección y validación de clones de anticuerpos dirigidos frente a subclases de IgA e IgG expresadas en linfocitos B de memoria y células plasmáticas que presentan cambio de isotipo**

En esta sección se recogen: 1) un ejemplo ilustrativo del marcaje de los clones de Acs seleccionados dirigidos frente a las distintas subclases de IgG e IgA y su marcaje cruzado (*Supplementary Figure S1*); 2) un ejemplo ilustrativo del marcaje citoplasmático en CPs de MO de los clones de Acs seleccionados dirigidos frente a las subclases de IgG e IgA (*Supplementary Figure S2*); 3) un ejemplo ilustrativo del marcaje citoplasmático de los clones de Acs seleccionados dirigidos frente a las distintas subclases de IgG e IgA, con y sin bloqueo previo de las mismas en la membrana (*Supplementary Figure S3*); 4) un ejemplo ilustrativo del marcaje de los clones SAG4 y HP6098 dirigidos frente a IgG4 en un donante sano (*Supplementary Figure S4*); 5) el índice de marcaje y el porcentaje de linfocitos B de memoria y CPs positivas para los clones de Acs seleccionados dirigidos frente a las distintas subclases de IgG e IgA, con y sin bloqueo previo de dichas subclases en la membrana (*Supplementary Table S1*); 6) un resumen de los resultados de marcaje obtenidos para los clones de Acs seleccionados y alternativos en linfocitos B de memoria y CPs (*Supplementary Table S2*).

*Journal of Immunological Methods*

Septiembre de 2017

DOI: 10.1016/j.jim.2017.09.008



Material eliminado para la versión almacenada en el repositorio del Ministerio de Educación  
por estar sujeto a copyright.



## ARTÍCULO 2

### **Distribución en sangre de las distintas subpoblaciones de linfocitos B y de células plasmáticas normales a lo largo de la vida**

En esta sección se recogen: 1) breve descripción del protocolo de procesamiento de las muestras y del marcaje para CD11c (*Methods*); 2) estrategia empleada para la identificación de las poblaciones de linfocitos B por estadio madurativo (*Figure E1*); 3) distribución relativa en 5 niños y 5 adultos de los isotipos y subclases de Igs en CPs cuando se realiza un marcaje de membrana vs. membrana+citoplasmático (*Figure E2*); 4) porcentaje de células CD27<sup>+</sup> en los linfocitos B de memoria en sangre a lo largo de la vida (*Figure E3*); 5) porcentaje de células CD21<sup>+</sup> dentro de los linfocitos B naïve y de memoria en sangre a lo largo de la vida (*Figure E4*); 6) comparación de las medianas de linfocitos B de memoria, CPs e Igs solubles en plasma, de cada uno de los isotipos y subclases de Igs en sangre a lo largo de la vida (*Figure E5*); 7) comparación entre la distribución de IgG e IgA total vs. sus subclases dentro de los linfocitos B de memoria, CPs y los Acs solubles en plasma, a lo largo de la vida (*Figure E6*); 8) ejemplo ilustrativo del marcaje obtenido con CD11c en linfocitos B de memoria de un niño y un adulto (*Figure E7*); 9) distribución relativa de los linfocitos B de memoria típicos, atípicos y otros linfocitos CD21<sup>+</sup> a lo largo de la vida (*Figure E8*); 10) ejemplo ilustrativo de la distribución de los linfocitos B de memoria y CPs que expresan distinto isotipo y subclase de Igs en un niño evaluado a dos edades distintas (*Figure E8*); 11) características demográficas de los niños menores de 4 años incluidos en el estudio (*Table E1*); 12) combinación de Acs monoclonales utilizados en el estudio: tubo EuroFlow de 12 colores para la evaluación de isotipos y subclases de Igs (*Table E2*); 13) número absoluto de linfocitos totales, linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos B de distintos estadios madurativos en donantes sanos de diferentes grupos de edad (*Table E3*); 14) porcentaje de casos con números detectables de linfocitos B de memoria y CPs, con expresión de los distintos isotipos y subclases de Igs, así como sus números absolutos en donantes sanos de diferentes grupos de edad (*Table E4*); 15) niveles solubles en plasma de los distintos isotipos y subclases de Igs en donantes sanos de diferentes grupos de edad (*Table E5*).

*Journal of Allergy and Clinical Immunology*

Marzo de 2018

DOI: 10.1016/j.jaci.2018.02.017



## METHODS

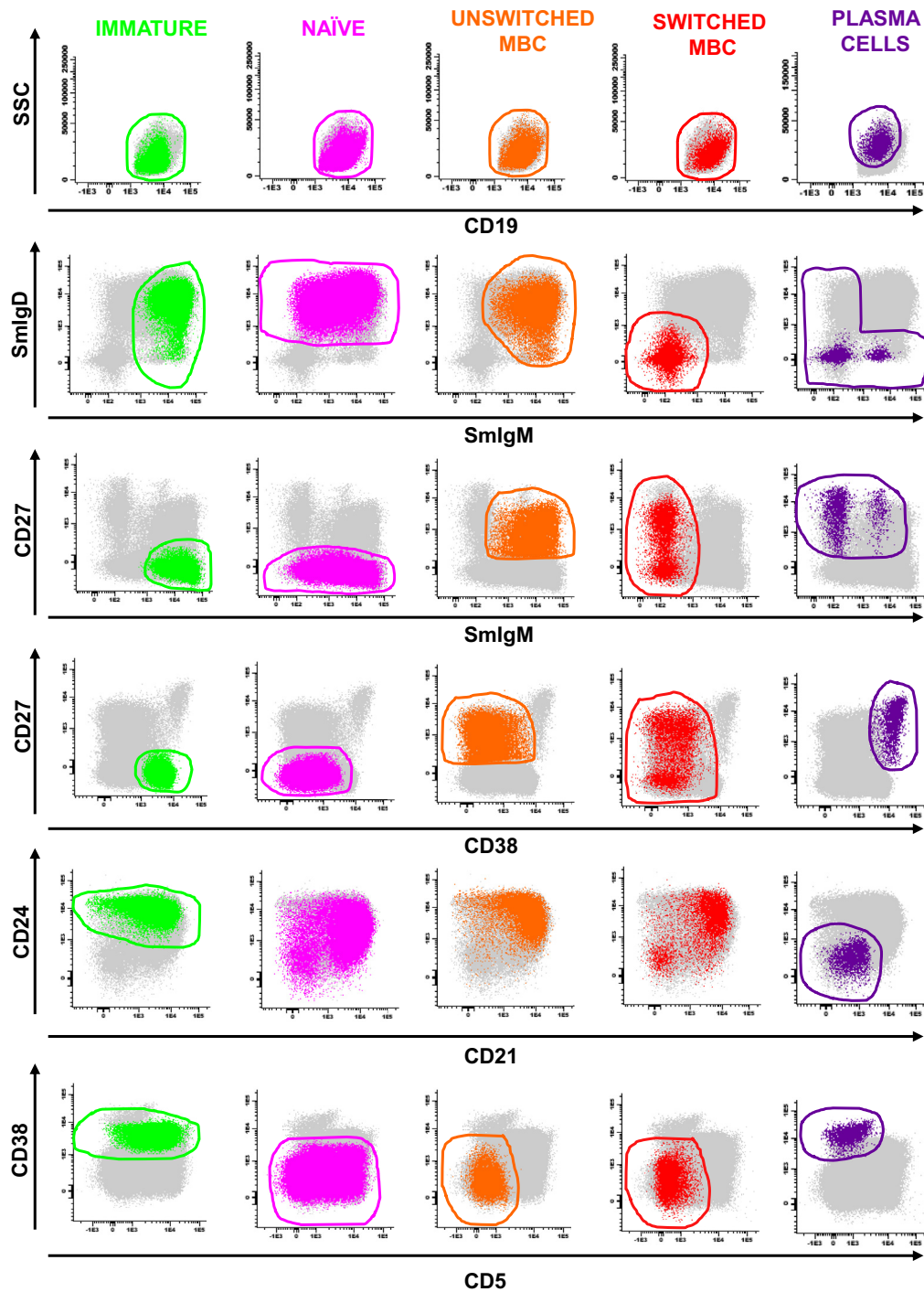
### Sample preparation

Forty-eight milliliters of an ammonium chloride solution was mixed with 2 mL of PB in a 50-mL tube and incubated for 15 minutes at room temperature (RT) while gently shaking in a roller to lyse nonnucleated red cells. Then the cell suspension was centrifuged for 10 minutes at 800g, and the supernatant was removed by using a Pasteur pipette or a vacuum system without disturbing the cell pellet. Thereafter, cells were washed with 50 mL of PBS containing 0.5% BSA and 0.09% sodium azide (PBS-BSA; pH 7.6) and centrifuged at 800g for 5 minutes, and the supernatant was removed. Subsequently, 4 mL of PBS plus 0.09% of  $\text{NaN}_3$  plus 0.5% of BSA was added, and the cell suspension was transferred to a 5-mL tube, which was centrifuged at 540g for 5 minutes. After removal of the supernatant, sample cellularity was counted in a hematologic analyzer. Ten million nucleated cells were stained subsequently with the 12-color EuroFlow antibody combination (30 minutes at RT). When only smIgH staining was performed, 2 mL of FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, Calif) diluted 1:10 (vol/vol) in distilled water was added, and cells

were sequentially incubated for another 10 minutes at RT, washed, and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS-BSA. In turn, when surface membrane plus cytoplasmic IgH staining was performed, after surface membrane staining, the cell suspension was washed and incubated with solution A of the Fix & Perm Reagent Kit (An der Grub, Vienna, Austria) for 15 minutes at RT. Afterward, washed cells were incubated for another 15 minutes at RT with solution B of the Fix & Perm Reagent Kit and antibodies against IgM, IgD, IgG<sub>1</sub> to IgG<sub>4</sub>, and IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub>; then stained cells were washed and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS-BSA. In both protocols cells were acquired immediately after sample preparation was completed or stored at 4°C for a maximum of 1 hour.

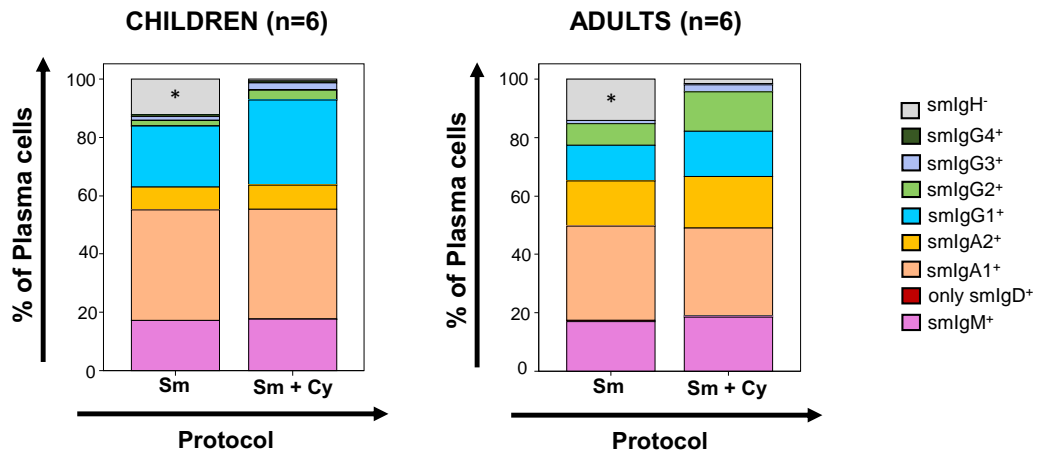
### CD11c staining

In 6 adults ( $35 \pm 8$  years) and 6 children ( $3 \pm 5$  years), in addition to the EuroFlow 12-color IgH isotype B-cell tube (Table E2), a similar tube that contained an anti-CD11c PE-Cy7 (clone B-ly6; BD) reagent instead of CD5 PE-Cy7 was stained in parallel. The protocol used was the same as described above, and  $5 \times 10^6$  leukocytes were measured per sample.

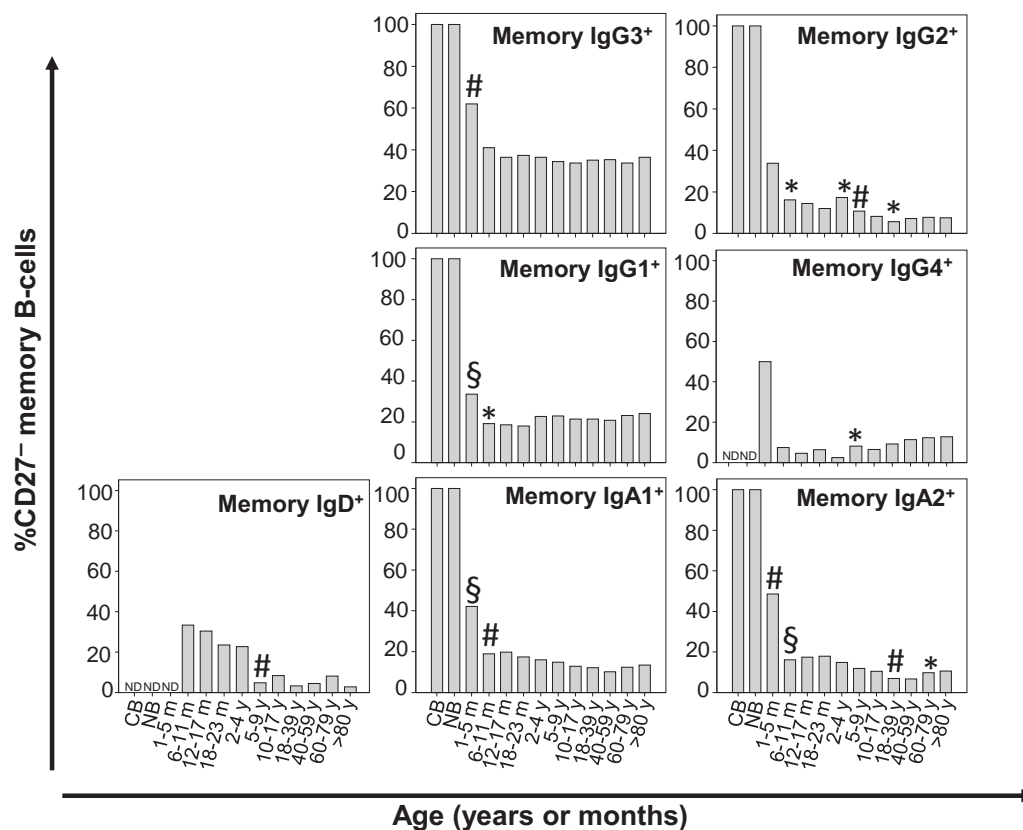


**FIG E1.** Gating strategy used for identification of maturation-associated B-cell subsets. Bivariate dot plot graphic representations of the gating strategy used to identify immature, naive, switched, and unswitched MBCs and PCs, according to their pattern of expression of CD19, CD27, CD38, CD5, CD24, CD21, smlgM, and smlgD and their side-scatter (SSC) features are shown.

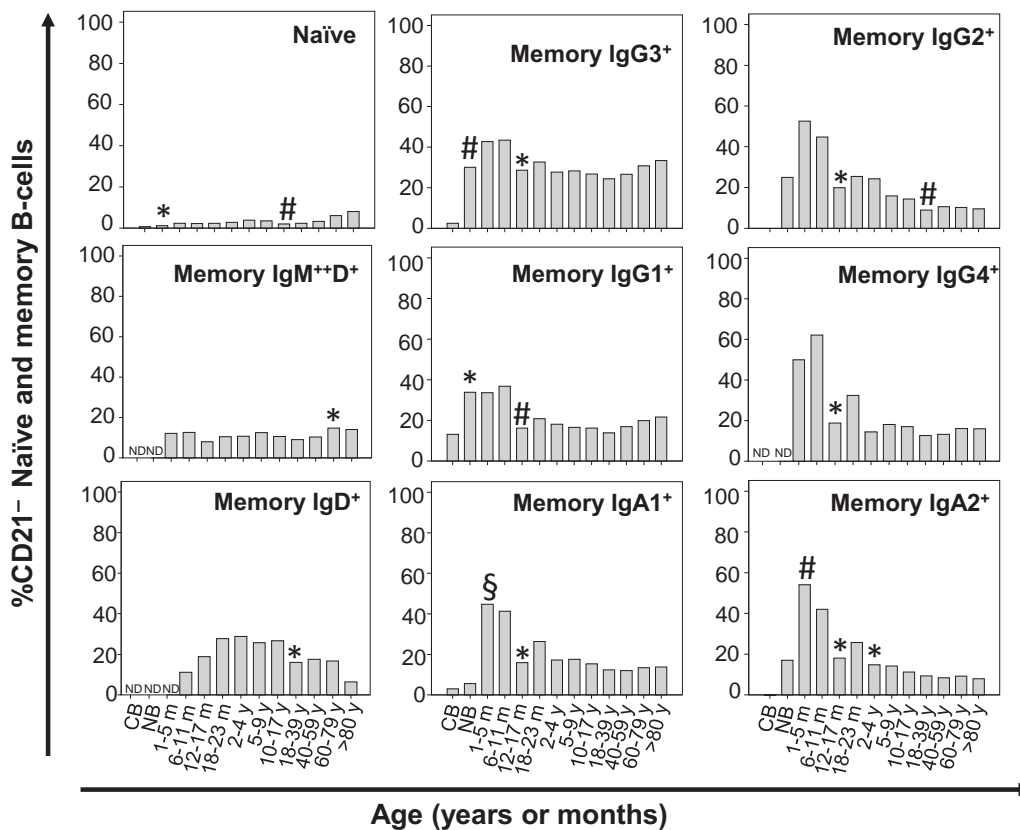




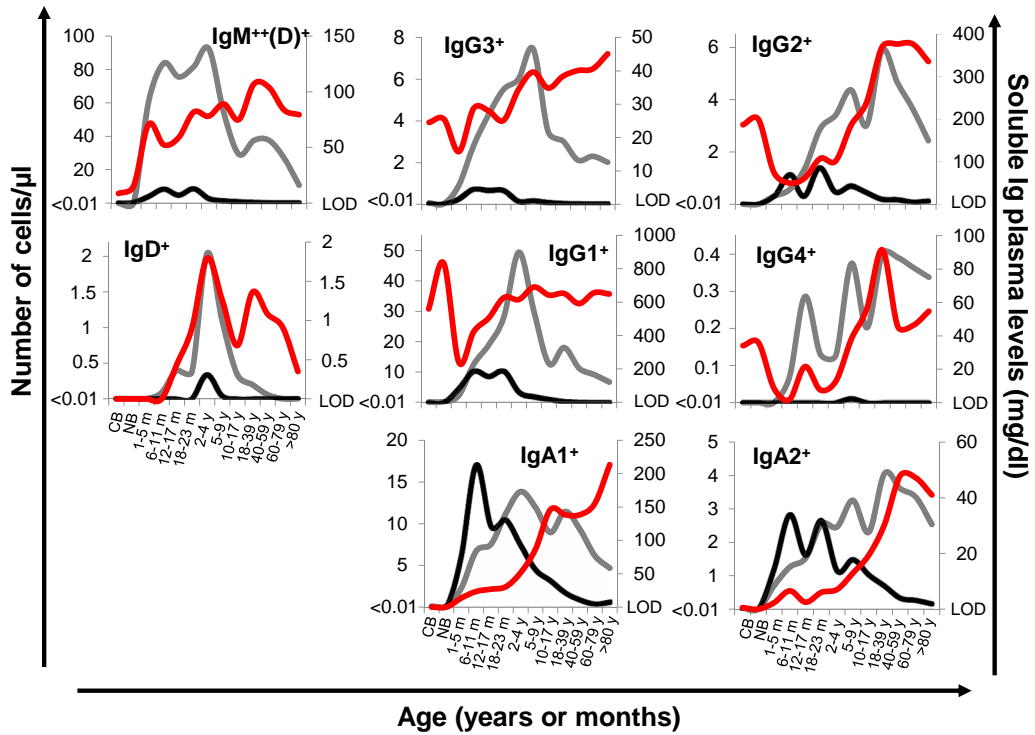
**FIG E2.** Comparison of the relative distribution in PC of subsets expressing distinct IgH isotypes and subclasses when surface membrane only versus surface membrane plus cytoplasmic staining of aliquots of the same sample ( $n = 12$ ) was performed. *Bars* represent relative distribution of the distinct IgH isotype and subclass subsets of PCs with the sm-only versus surface membrane plus cytoplasmic IgH staining in children ( $n = 6$ ) and adults ( $n = 6$ ).  $*P < .05$ , surface membrane only versus surface membrane plus cytoplasmic staining.



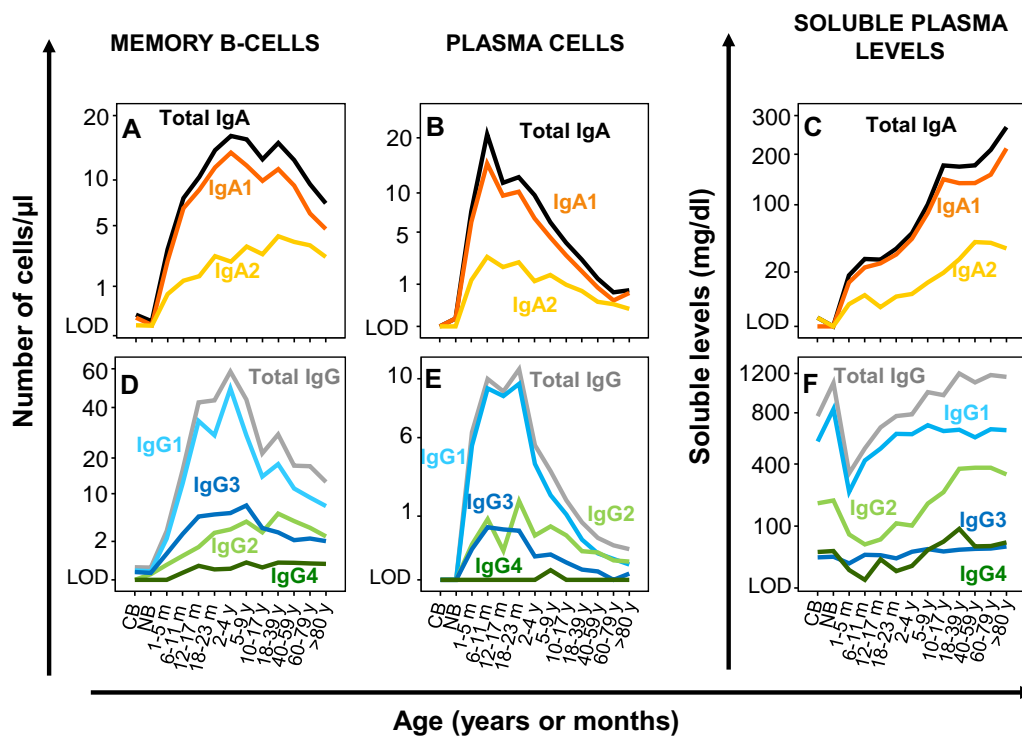
**FIG E3.** Relative distribution of CD27<sup>-</sup> B cells within each subset of CB and PB memory B lymphocytes expressing different IgH isotypes and isotype subclasses through life. Bars represent percentage values of CD27<sup>-</sup> B cells within each MBC compartment. \* $P < .05$ , # $P < .01$ , and § $P < .001$  versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.



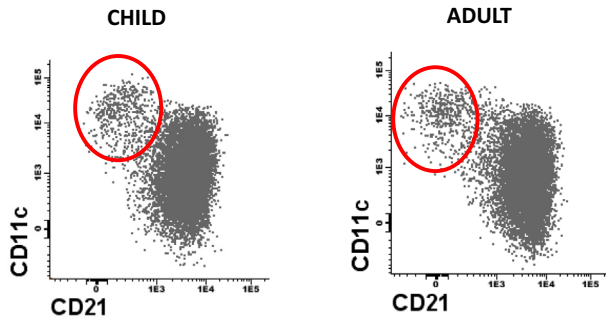
**FIG E4.** Relative distribution of CD21<sup>-</sup> B cells within each subset of CB and PB naïve B lymphocytes and MBCs expressing different IgH isotypes and isotype subclasses through life. Bars represent percentage values of CD21<sup>-</sup> B cells within each B-cell compartment. \**P* < .05, #*P* < .01, and §*P* < .001 versus the previous age group, respectively. NB, Newborn.



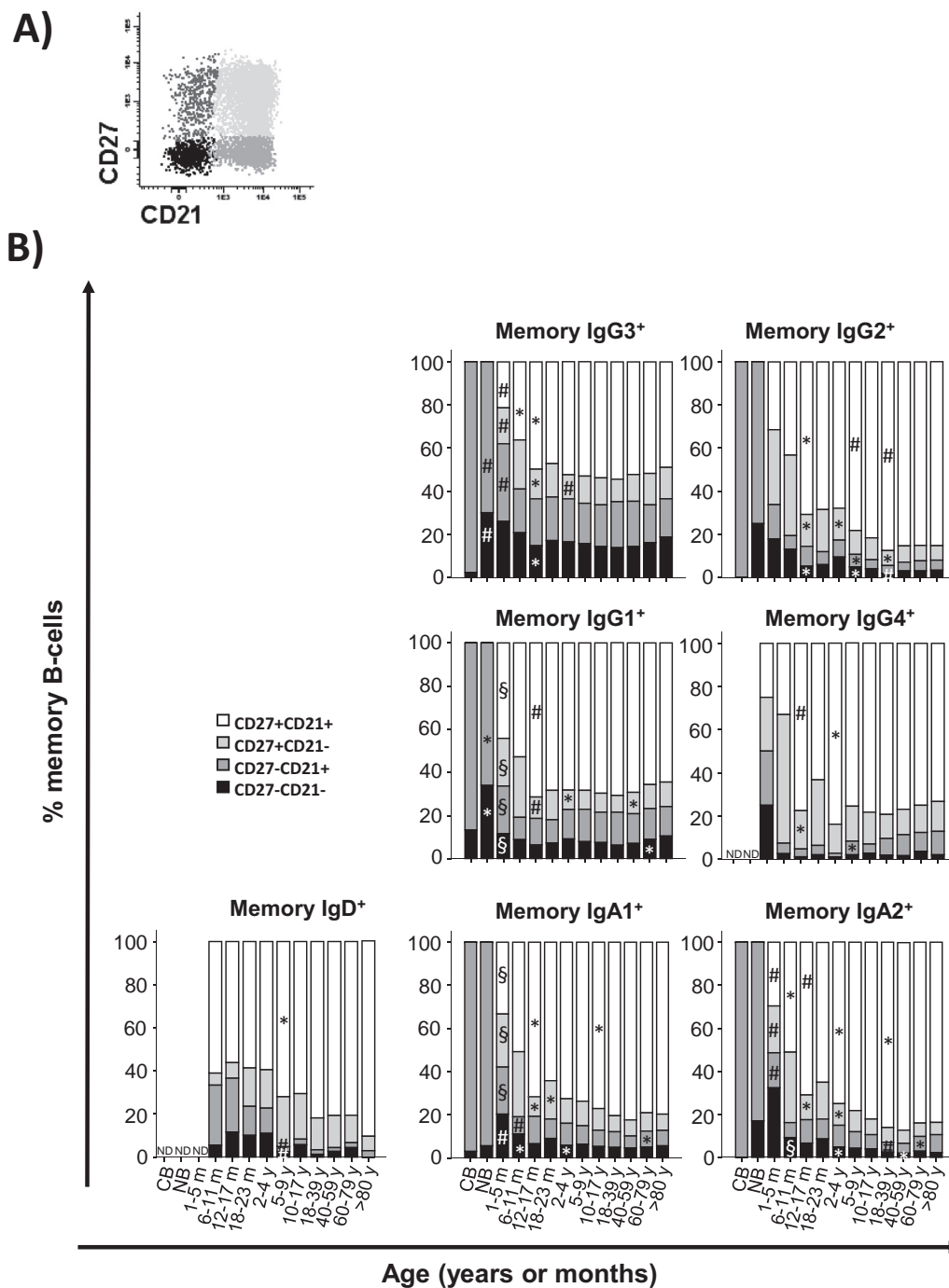
**FIG E5.** Direct comparison among median numbers of CB and PB MBCs, PCs, and immunoglobulin (*Ig*) soluble levels of the same IgH isotype and isotype subclasses through life. *Lines* correspond to median absolute numbers of MBCs (gray), PCs (black), and soluble immunoglobulin plasma levels (in milligram per deciliter; red) per age group. *LOD*, Limit of detection; *NB*, newborn.



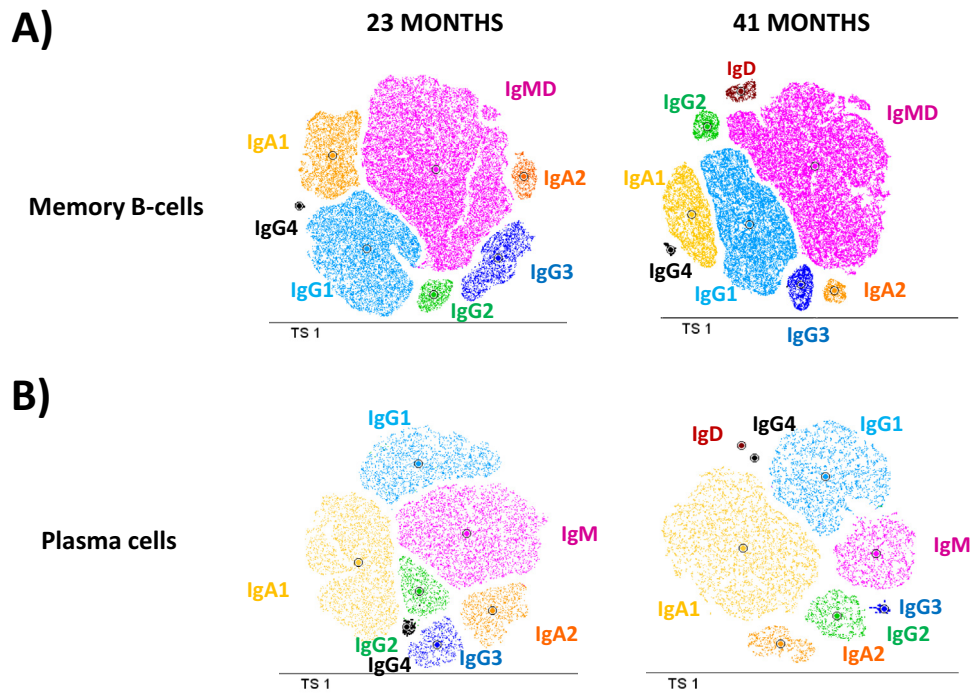
**FIG E6.** Comparison of the distribution of CB/PB MBCs and PCs, as well as soluble immunoglobulin plasma levels, through life: total IgA and IgG versus individual cellular and soluble compartments of IgA and IgG subclasses. Lines link median values of total IgA (black), IgA<sub>1</sub> (orange), and IgA<sub>2</sub> (yellow) MBCs (A), PCs (B), and soluble immunoglobulin plasma levels (C) plus total IgG (gray), IgG<sub>1</sub> (light blue), IgG<sub>2</sub> (light green), IgG<sub>3</sub> (dark blue), and IgG<sub>4</sub> (dark green) MBCs (D), PCs (E), and soluble immunoglobulin plasma levels (F). LOD, Limit of detection; NB, newborn.



**FIG E7.** Pattern of expression of CD21 in CD11c<sup>+</sup> in MBCs. Dot plots illustrating CD11c expression with MBCs of a representative healthy child and a healthy adult are shown. In both types of samples, CD11c<sup>+</sup> MBCs systematically corresponded to CD21<sup>-</sup> MBCs in line with previous findings reported in the literature.<sup>27,71</sup>



**FIG E8.** Relative distribution of typical, atypical, and other CD21<sup>-</sup> B cells within each compartment of MBCs expressing different IgH isotypes and subclasses through life. **A,** Representative dot plot of MBCs grouped according to CD21 and CD27 expression. **B,** Bars represent percentage values of typical (CD27<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>), atypical (CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>), other CD21<sup>-</sup> B cells (CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>) and CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup> MBCs within each subset of MBCs expressing different IgH isotypes and subclasses. \**P* < .05, #*P* < .01, and §*P* < .001 versus the previous age group, respectively. *NB*, Newborn.



**FIG E9.** t-Distributed stochastic neighbor embedding plots showing the relative size of different subsets of MBCs and PCs expressing distinct IgH isotypes and subclasses in a single child at 2 different ages (23 and 41 months). Please note the relative decrease in, for example, IgG<sub>3</sub> MBCs (**A**) and both IgM and IgG<sub>3</sub> PCs at the expense of a larger IgA<sub>1</sub> and IgG<sub>1</sub> PC area (**B**).



**TABLE E1.** Demographics of children younger than 4 years included in the study

Environmental factors	Age group				
	0-5 mo	6-11 mo	12-17 mo	18-23 mo	2-4 y
Breast-feeding ever	80%	100%	71%	86%	92%
Breast-feeding until 6 mo	—	60%	30%	50%	50%
Day care	20%	40%	71%	43%	83%
Pets	20%	20%	14%	0%	25%
Rural environment	0%	40%	43%	29%	17%
Smoking parents	60%	20%	14%	29%	25%
Smoking during pregnancy	20%	40%	14%	14%	17%
Delivery					
Vaginal	100%	60%	86%	71%	92%
Caesarean	0%	20%	14%	29%	8%

Percentage of subjects analyzed presenting each environmental factor per age group.

**TABLE E2.** EuroFlow 12- color IgH isotype B-cell tube

Fluorochrome conjugated to antibody reagent	BV421	BV510	BV711	BV650	BV786	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PE-Cy7	APC	APC-H7
Antibody marker	CD27	smIgM	CD21	CD24	CD19	smIgG <sub>3</sub> + smIgG <sub>2</sub>	smIgA <sub>1</sub> + smIgA <sub>2</sub>	smIgG <sub>1</sub> + smIgG <sub>2</sub>	smIgD	CD5	smIgG <sub>4</sub> + smIgA <sub>1</sub>	CD38
Antibody clone	M-T271	MHM-88	B-ly4	ML5	SJ25C1	SAG3/SAG2	SAA1/SAA2	SAG1/SAG2	IA6-2	L17F12	SAG4/SAA1	HB7
Antibody manufacturer	BD Biosciences, San Jose, Calif	BioLegend, San Diego, Calif	BD Biosciences	BD Biosciences	BD Biosciences	Cytognos, Salamanca, Spain	Cytognos	Cytognos	BD Biosciences	BD Biosciences	Cytognos	BD Biosciences

Combination of fluorochrome-conjugated antibodies used for the immunophenotypic analysis of PB samples by flow cytometry.  
*APC*, Allophycocyanin; *FITC*, fluorescein isothiocyanate; *PE*, phycoerythrin; *PerCP*, peridinin-chlorophyll-protein complex.

**TABLE E3.** Absolute number of PB lymphocytes, total B cells, and maturation-associated B-cell subsets in healthy control subjects distributed per age group

	CB (n = 19)	NB (n = 14)	1-5 mo (n = 11)	6-11 mo (n = 7)	12-17 mo (n = 12)	18-23 mo (n = 12)	2-4 y (n = 25)	5-9 y (n = 22)	10-17 y (n = 14)	18-39 y (n = 32)	40-59 y (n = 27)	60-79 y (n = 27)	>80 y (n = 12)
Lymphocytes	3,710 (2,041-5,687)	5,049 (2,581-8,360)	6,771 (2,443-9,955)	5,709 (5,150-8,531)	6,547 (4,611-9,924)	5,014 (3,798-11,033)	4,184 (1,620-6,856)	3,134 (1,967-4,564)	3,109 (1,749-3,739)	2,504 (1,479-3,681)	2,273 (1,280-3,192)	2,408 (1,531-4,891)	2,386 (938-2,793)
Total B cells	502 (313-1,280)	357 (108-1,322)	1533 (470-4,327)	1,294 (869-2,316)	1,186 (692-1,737)	965 (268-1,559)	825 (302-1,637)	451 (157-725)	360 (174-630)	220 (41-470)	148 (91-413)	173 (36-384)	141 (42-283)
Immature B cells	116 (40-316)	65 (15-343)	449 (228-1,398)	268 (111-384)	157 (105-389)	120 (39-300)	108 (36-314)	41 (12-84)	37 (11-111)	5.6 (0.25-24)	6.0 (0.84-23)	6.1 (0.69-36)	5.7 (1.3-23)
Naive B cells	426 (214-962)	298 (71-976)	981 (186-2,620)	812 (508-1,686)	677 (232-1,293)	678 (181-1,254)	473 (204-1,064)	265 (68-505)	189 (75-401)	111 (13-288)	83 (26-244)	109 (20-280)	80 (15-210)
Memory B cells	0.3 (<0.01-3.0)	0.4 (<0.01-2.3)	73 (20-283)	115 (48-219)	111 (79-291)	131 (44-241)	182 (48-343)	123 (64-282)	68 (31-160)	91 (23-221)	70 (25-173)	56 (13-128)	30 (8.1-119)
PCs	<0.01	0.3 (<0.01-4.2)	21.2 (1.6-48)	53 (24-104)	28 (8.1-82)	43 (4.8-144)	18 (4.1-52)	13 (3.5-45)	8.5 (1.3-27)	4.4 (1.1-25)	2.7 (0.6-9.7)	1.2 (0.3-7.1)	1.5 (0.14-18)

Results are expressed as median number of cells per microliter (range).  
NB, Newborn.

**TABLE E4.** Percentage of cases with detectable numbers of PB MBCs and PCs expressing different IgH isotypes and isotype subclasses and their absolute numbers per age group

	CB (n = 19)	NB (n = 14)	1-5 mo (n = 11)	6-11 mo (n = 7)	12-17 mo (n = 12)	18-23 mo (n = 12)	2-4 y (n = 25)	5-9 y (n = 22)	10-17 y (n = 14)	18-39 y (n = 32)	40-59 y (n = 27)	60-79 y (n = 27)	>80 y (n = 12)
MBC subsets													
IgMD <sup>+</sup>													
Cases	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01	61 (8.6-245)	84 (21-170)	76 (45-186)	81 (31-153)	92 (24-207)	54 (23-147)	29 (17-78)	38 (7.9-122)	36 (12-114)	27 (7.4-72)	11 (2-56)
IgD <sup>+</sup>													
Cases	0%	0%	9%	57%	50%	78%	96%	95%	79%	69%	57%	48%	25%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01	<0.01	0.1 (<0.01-1.4)	0.4 (<0.01-2.1)	0.4 (<0.01-5.6)	2.0 (<0.01-6.9)	1.1 (<0.01-2.9)	0.3 (<0.01-1.7)	0.2 (<0.01-2.4)	0.06 (<0.01-0.9)	0.01 (<0.01-1.2)	0.01 (<0.01-0.4)
IgG <sub>1</sub> <sup>+</sup>													
Cases	63%	86%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	0.1 (<0.01-0.6)	0.2 (<0.01-0.8)	2.3 (0.1-13)	12.5 (6.9-28)	19 (11-65)	28 (6.9-69)	49 (11-130)	30 (12-86)	18 (7-42)	18 (3.2-40)	11 (2.8-30)	9.1 (1.3-22)	6.7 (2.0-31)
IgG <sub>2</sub> <sup>+</sup>													
Cases	37%	21%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	0 (<0.01-0.2)	0.04 (<0.01-0.2)	0.3 (<0.01-1.2)	0.6 (0.4-3.5)	1.4 (0.5-3.4)	2.9 (0.6-6.1)	3.4 (0.8-11)	4.4 (0.7-15)	3.0 (0.7-10)	5.9 (1.6-30)	4.7 (0.6-14)	3.6 (1.0-11)	2.4 (0.4-12)
IgG <sub>3</sub> <sup>+</sup>													
Cases	74%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	0.06 (<0.01-0.7)	0.03 (<0.01-0.5)	0.9 (0.4-4.7)	2.8 (1.4-6.2)	4.3 (1.6-14)	5.5 (1.5-12)	6.0 (1.8-17)	7.4 (2.4-16)	3.0 (1.1-8.3)	3.0 (0.5-8.4)	2.1 (0.7-6.6)	2.3 (0.4-8.1)	2.0 (0.7-6.5)
IgG <sub>4</sub> <sup>+</sup>													
Cases	0%	0%	18%	71%	83%	92%	76%	86%	86%	91%	89%	92%	92%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01	<0.01 (<0.01-0.6)	0.07 (<0.01-0.4)	0.3 (<0.01-1.4)	0.1 (<0.01-0.5)	0.1 (<0.01-1.9)	0.4 (<0.01-2.0)	0.2 (<0.01-2.9)	0.4 (<0.01-2.4)	0.4 (<0.01-4.1)	0.4 (<0.01-2.1)	0.3 (<0.01-2.3)
IgA <sub>1</sub> <sup>+</sup>													
Cases	90%	79%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	0.1 (<0.01-1.2)	0.1 (<0.01-1.1)	2.3 (0.4-8.6)	6.7 (3.9-13)	7.5 (5.5-33)	11 (1.5-22)	14 (5.7-28)	12 (4.6-24)	9.0 (2.9-21)	11 (2.1-43)	8.1 (2.5-27)	6.2 (2.2-22)	4.7 (1.7-25)
IgA <sub>2</sub> <sup>+</sup>													
Cases	63%	36%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	0.04 (0-0.3)	<0.01 (<0.01-0.3)	0.7 (0.07-1.7)	1.3 (0.6-4.3)	1.5 (0.3-7.9)	2.5 (0.5-5.6)	2.5 (0.8-18)	3.2 (1.0-13)	2.7 (0.8-5.9)	4.1 (1.2-18)	3.6 (0.4-14)	3.4 (0.7-9.0)	2.5 (0.6-11)
PC subsets													
IgM <sup>+</sup>													
Cases	0%	79%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	0.3 (<0.01-2.9)	3.9 (0.3-12)	8.3 (4.8-52)	4.7 (1.1-8)	8.5 (0.6-40)	2.6 (0.6-7.2)	1.4 (0.6-14)	0.8 (0.2-5.7)	0.4 (0.05-4.7)	0.2 (0.04-1.0)	0.1 (0.01-0.8)	0.1 (0.02-1.1)
IgD <sup>+</sup>													
Cases	0%	0%	0%	14%	50%	33%	84%	55%	36%	31%	19%	15%	17%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01	<0.01 (<0.01-0.2)	<0.01 (<0.01-0.7)	<0.01 (<0.01-0.8)	<0.01 (<0.01-2.4)	0.3 (<0.01-2.3)	0.04 (<0.01-0.8)	<0.01 (<0.01-2.0)	<0.01 (<0.01-1.1)	<0.01 (<0.01-0.1)	<0.01 (<0.01-0.2)	<0.01 (<0.01-0.02)
IgG <sub>1</sub> <sup>+</sup>													
Cases	0%	14%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	93%	100%	92%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01 (<0.01-0.5)	4.5 (0.5-16)	10 (4.7-19.3)	8.5 (0.4-14)	8.5 (1.7-26)	3.3 (0.3-13)	1.9 (0.1-7.7)	1.1 (0.1-4.8)	0.4 (0.05-4.4)	0.2 (<0.01-1.7)	0.1 (0.01-0.6)	0.1 (<0.01-1.6)

(Continued)

TABLE E4. (Continued)

	CB (n = 19)	NB (n = 14)	1-5 mo (n = 11)	6-11 mo (n = 7)	12-17 mo (n = 12)	18-23 mo (n = 12)	2-4 y (n = 25)	5-9 y (n = 22)	10-17 y (n = 14)	18-39 y (n = 32)	40-59 y (n = 27)	60-79 y (n = 27)	>80 y (n = 12)
<b>IgG<sub>2</sub><sup>+</sup></b>													
Cases	0%	25%	82%	100%	75%	100%	100%	100%	100%	97%	96%	96%	100
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01 (<0.01-0.1)	0.3 (<0.01-1.0)	1.1 (0.4-2.4)	0.3 (<0.01-2.4)	1.3 (1.3-4.7)	0.5 (0.02-1.5)	0.7 (0.07-2.3)	0.5 (0.08-0.8)	0.2 (<0.01-2.6)	0.2 (<0.01-0.7)	0.09 (<0.01-1.6)	0.1 (0.03-1.6)
<b>IgG<sub>3</sub><sup>+</sup></b>													
Cases	0%	0%	100%	100%	93%	92%	68%	76%	86%	59%	63%	27%	67%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01	0.2 (0.05-1.3)	0.7 (0.1-1.5)	0.6 (<0.01-3.4)	0.6 (<0.01-2.5)	0.1 (<0.01-2.1)	0.2 (<0.01-1.3)	0.08 (<0.01-0.4)	0.03 (<0.01-0.3)	0.02 (<0.01-0.2)	<0.01 (<0.01-0.2)	<0.01 (<0.01-0.23)
<b>IgG<sub>4</sub><sup>+</sup></b>													
Cases	0%	0%	9%	14%	48%	50%	20%	50%	43%	44%	30%	27%	33%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01	<0.01 (<0.01-0.15)	<0.01 (<0.01-0.1)	<0.01 (<0.01-0.4)	<0.01 (<0.01-0.3)	<0.01 (<0.01-0.2)	0.02 (<0.01-0.2)	<0.01 (<0.01-0.2)	<0.01 (<0.01-0.4)	<0.01 (<0.01-0.1)	<0.01 (<0.01-0.1)	<0.01 (<0.01-0.02)
<b>IgA<sub>1</sub><sup>+</sup></b>													
Cases	0%	14%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01 (<0.01-0.3)	6.1 (0.3-17)	17 (10-44)	9.6 (3.4-33)	10 (1.2-80)	7.3 (1.3-20)	4.4 (0.6-16)	3.1 (0.5-14)	1.7 (0.3-6.9)	0.9 (0.2-3.8)	0.4 (0.04-3.3)	0.6 (0.03-7.1)
<b>IgA<sub>2</sub><sup>+</sup></b>													
Cases	0%	7%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	92%
Cells/ $\mu$ L	<0.01	<0.01 (<0.01-0.1)	1.2 (0.04-4.0)	2.8 (1.6-9.0)	1.6 (0.3-15)	2.6 (0.4-4.5)	1.1 (0.3-4.4)	1.5 (0.3-3.5)	1.0 (0.3-3.6)	0.7 (0.2-4.2)	0.3 (0.04-2.9)	0.3 (0.06-1.2)	0.2 (<0.01-1.2)

Results are expressed as percentages of cases and median absolute numbers of cells per microliter (range).  
NB, Newborn.

**TABLE E5.** Soluble plasma levels of different immunoglobulin isotypes and isotype subclasses through life

IgH isotypes/ subclasses	CB (n = 18)	NB (n = 10)	1-5 mo (n = 9)	6-11 mo (n = 7)	12-17 mo (n = 12)	18-23 mo (n = 12)	2-4 y (n = 25)	5-9 y (n = 22)	10-17 y (n = 14)	18-39 y (n = 31)	40-59 y (n = 27)	60-79 y (n = 21)	>80 y (n = 11)
Total immunoglobulin	748 (516-1484)	1108 (818-1223)	433 (267-634)	607 (377-915)	837 (542-1317)	866 (469-1092)	946 (596-1559)	1213 (814-1654)	1234 (686-1716)	1532 (1082-2182)	1430 (1073-1852)	1546 (978-1922)	1682 (1087-1804)
IgM	8.6 (<LOD-142)	15 (<LOD-23)	71 (<LOD-158)	52 (37-193)	59 (6-110)	82 (42-142)	89 (54-135)	89 (32-210)	75 (42-94)	107 (35-200)	104 (56-225)	84 (43-240)	79 (52-245)
IgD	<LOD	<LOD	0.3 (<LOD-0.7)	LOD (<LOD-3.7)	0.4 (<LOD-3.1)	0.9 (<LOD-5.2)	1.8 (<LOD-22)	1.3 (<LOD-96)	0.7 (<LOD-6)	1.4 (<LOD-13)	1.1 (<LOD-5.9)	1.0 (<LOD-8.7)	0.4 (<LOD-1.4)
IgG <sub>1</sub>	560 (368-893)	833 (514-915)	241 (142-434)	424 (142-563)	506 (394-718)	628 (321-958)	616 (328-1200)	691 (459-942)	642 (405-931)	652 (390-1040)	592 (357-963)	657 (477-986)	649 (451-1100)
IgG <sub>2</sub>	187 (101-400)	200 (133-256)	75 (46-115)	50 (29-104)	62 (21-632)	108 (72-223)	102 (59-223)	186 (61-403)	240 (125-361)	370 (172-771)	377 (204-587)	377 (173-543)	336 (226-518)
IgG <sub>3</sub>	25 (12-66)	26 (15-36)	16 (9.6-38)	29 (20-70)	28 (21-236)	25 (12-58)	34 (11-86)	40 (20-74)	34 (21-72)	38 (11-86)	40 (23-188)	41 (20-96)	45 (24-85)
IgG <sub>4</sub>	34 (8-222)	34 (13-114)	9.0 (1.8-20)	1.8 (1.3-19)	22 (0.6-74)	8 (1.8-46)	13 (0.9-138)	38 (2.2-138)	56 (1.1-198)	92 (0.7-335)	45 (3.4-127)	46 (6.2-174)	55 (13-104)
IgA <sub>1</sub>	<LOD (<LOD-48)	<LOD	13 (3.7-20.4)	23 (6.5-73)	27 (14-81)	31 (7-101)	52 (7-308)	87 (29-233)	146 (37-299)	138 (70-327)	139 (66-286)	156 (77-377)	214 (60-493)
IgA <sub>2</sub>	0.5 (<LOD-9)	<LOD (<LOD-0.6)	2.3 (0.7-7.2)	6.6 (0.7-7.7)	2.5 (1.0-11)	6.0 (2.6-35)	7.1 (1.4-39)	13 (1.0-35)	19 (7.1-44)	30 (11-131)	48 (14-80)	47 (14-122)	41 (25-114)
IgE	<LOD	<LOD	<LOD (<LOD-11)	<LOD (<LOD-10)	14 (<LOD-202)	4.8 (<LOD-45)	16 (<LOD-102)	8.4 (<LOD-139)	33 (<LOD-444)	20 (<LOD-269)	22 (<LOD-45)	13 (<LOD-196)	28 (<LOD-105)

Results are expressed as medians (ranges). Total immunoglobulin and IgM, IgD, IgG, and IgA subclasses are expressed in milligrams per deciliter. IgE levels are expressed in international units per milliliter. *LOD*, Limit of detection; *NB*, newborn.

## ARTÍCULO 3

### **La disección de los defectos de las poblaciones de linfocitos B de memoria y células plasmáticas que expresan diferentes subclases de inmunoglobulinas proporciona una base sólida para una (nueva) re-clasificación de la IDVC y de los déficits de subclases de inmunoglobulinas**

En esta sección se recogen: 1) resultados correspondientes a la distribución alterada de las poblaciones de linfocitos B CD21<sup>+</sup> y CD27<sup>+</sup> en pacientes con IDP-Ac (*Supplementary results*); 2) la estrategia de identificación de las poblaciones de linfocitos B por estadio madurativo y expresión de distinto isotipo y subclase de Ig (*Supplementary Figure 1*); 3) los números absolutos de las poblaciones de linfocitos B naïve y de memoria definidas por el patrón de expresión de CD21 y CD27 en SP de donantes sanos, pacientes con déficit selectivo de IgA, déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA e IDVC (*Supplementary Figure 2*); 4) los números absolutos de las poblaciones de linfocitos B definidas en función del estadio madurativo y de la expresión de distinto isotipo y subclase de Ig en SP de donantes sanos, pacientes con déficit selectivo de IgA, déficit de subclases de IgG asociado a déficit de IgA e IDVC (*Supplementary Figure 3*); 5) la combinación de Acs monoclonales utilizados en el estudio: tubo EuroFlow de 12 colores para la evaluación de los isotipos y subclases de Igs (*Supplementary Table 1*); 6) la distribución por grupo de edad de los donantes sanos y pacientes con diferente diagnóstico incluidos en el estudio (*Supplementary Table 2*); 7) la frecuencia de pacientes con inmunodeficiencia predominantemente de Acs que presentaban números reducidos o indetectables de subpoblaciones de linfocitos B definidas por estadio madurativo y expresión de los distintos isotipos y subclases de Igs (*Supplementary Table 3*); 8) la relación existente entre los subgrupos de pacientes con déficit selectivo de IgA e IDVC de nuestra serie clasificados de acuerdo a las clasificaciones ESID y EUROclass, respectivamente (*Supplementary Table 4*); 9) Manifestaciones clínicas y antecedentes familiares de IDP-Ac de los subgrupos de pacientes con déficit selectivo de IgA identificados en nuestro estudio (*Supplementary Table 5*); 10) Manifestaciones clínicas y antecedentes familiares de IDP-Ac de los pacientes incluidos en los distintos subgrupos de IDVC identificados en nuestro estudio (*Supplementary Table 6*).

*Journal of Allergy and Clinical Immunology*  
(sometido para publicación y en revisión)

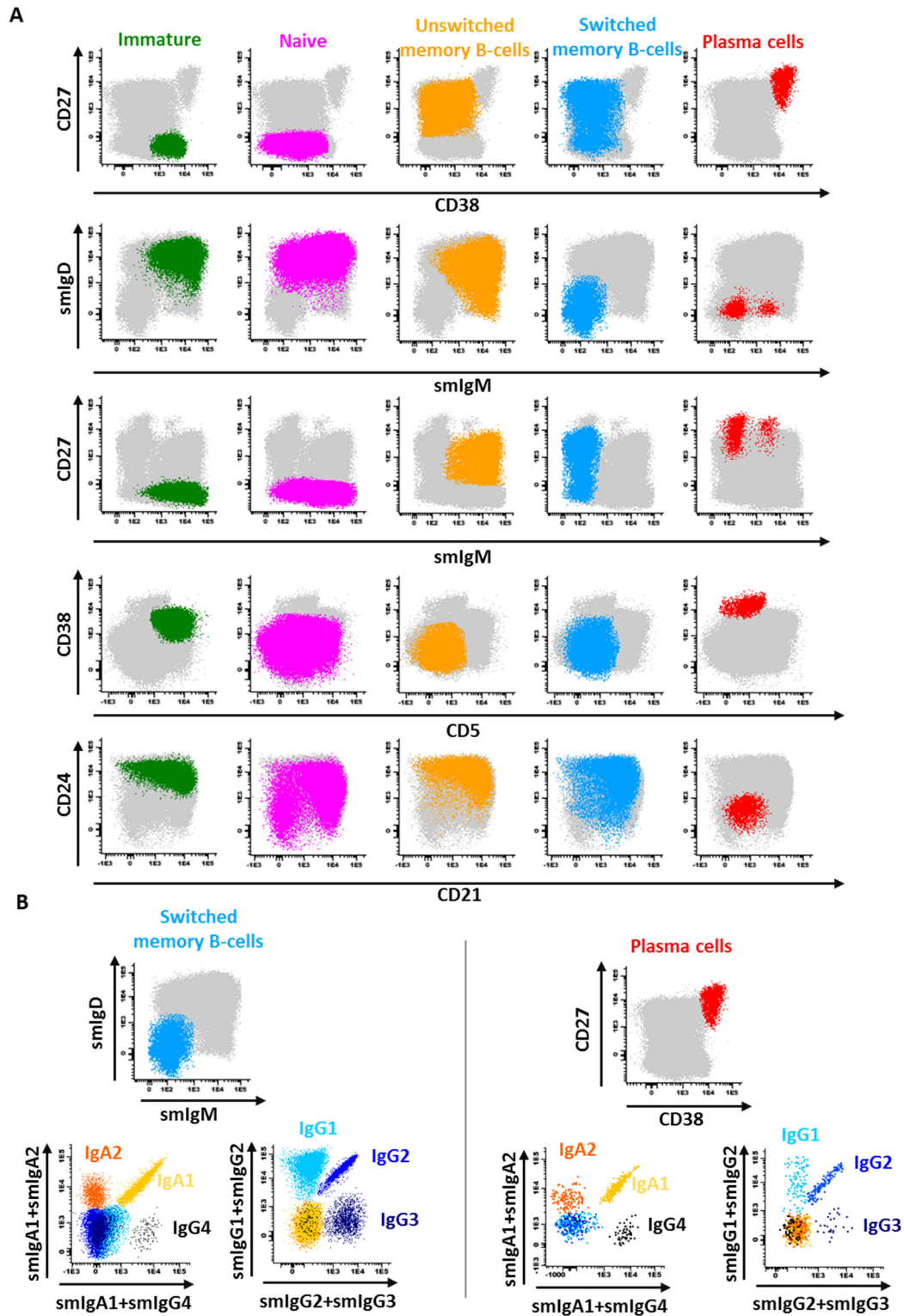




## SUPPLEMENTARY RESULTS

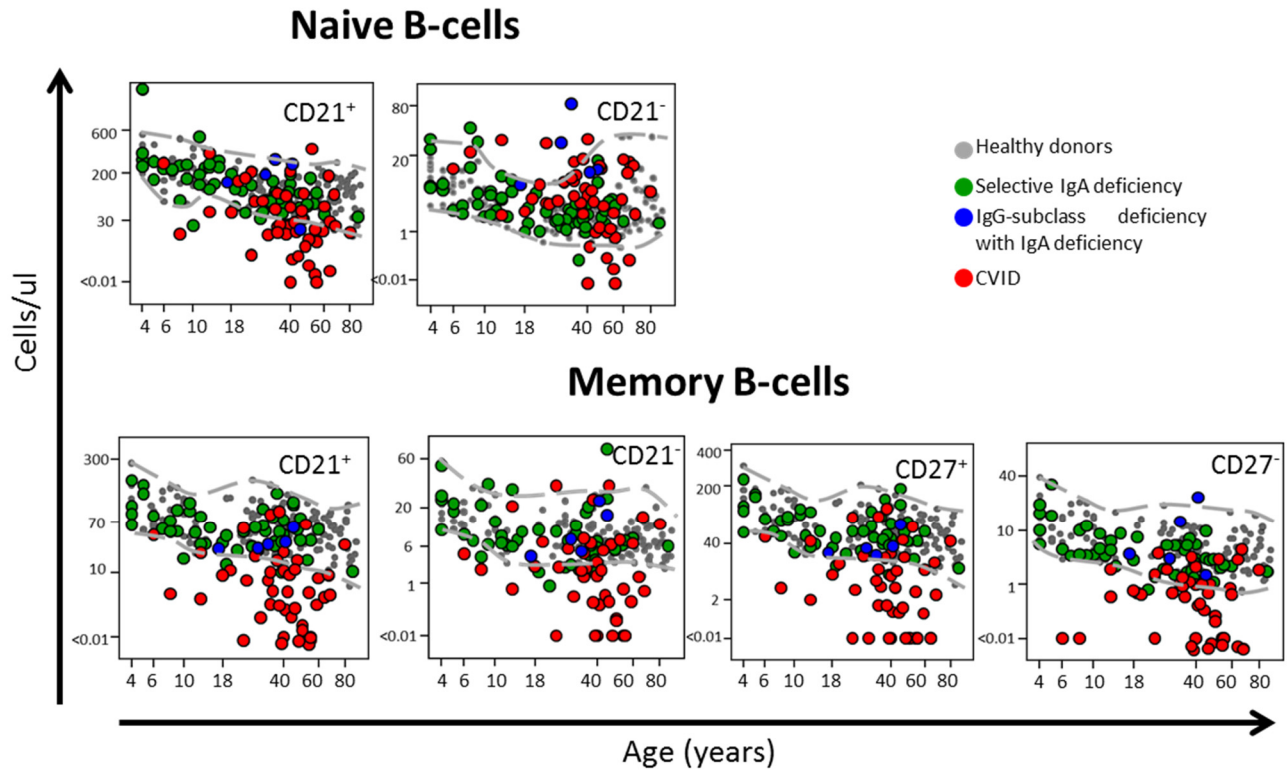
**Altered distribution of PB CD21<sup>+</sup> and CD27<sup>+</sup> B-cell subsets.** In CVID, reduced naive B-cell (34%) and MBC (70%) counts were mostly at the expense of CD21<sup>+</sup> cells (40% vs. 11% for CD21<sup>-</sup> naive B-cells and 79% vs. 55% for CD21<sup>-</sup> MBCs, respectively) (Supplementary Figure 3; Supplementary Table 3). In contrast, a similar frequency of reduced CD27<sup>+</sup> vs. CD27<sup>-</sup> MBCs was found in CVID (68% vs. 70%, respectively) and IgADef patients (7% vs. 10%, respectively) (Supplementary Figure 3; Supplementary Table 3).

Supplementary Figure 1.



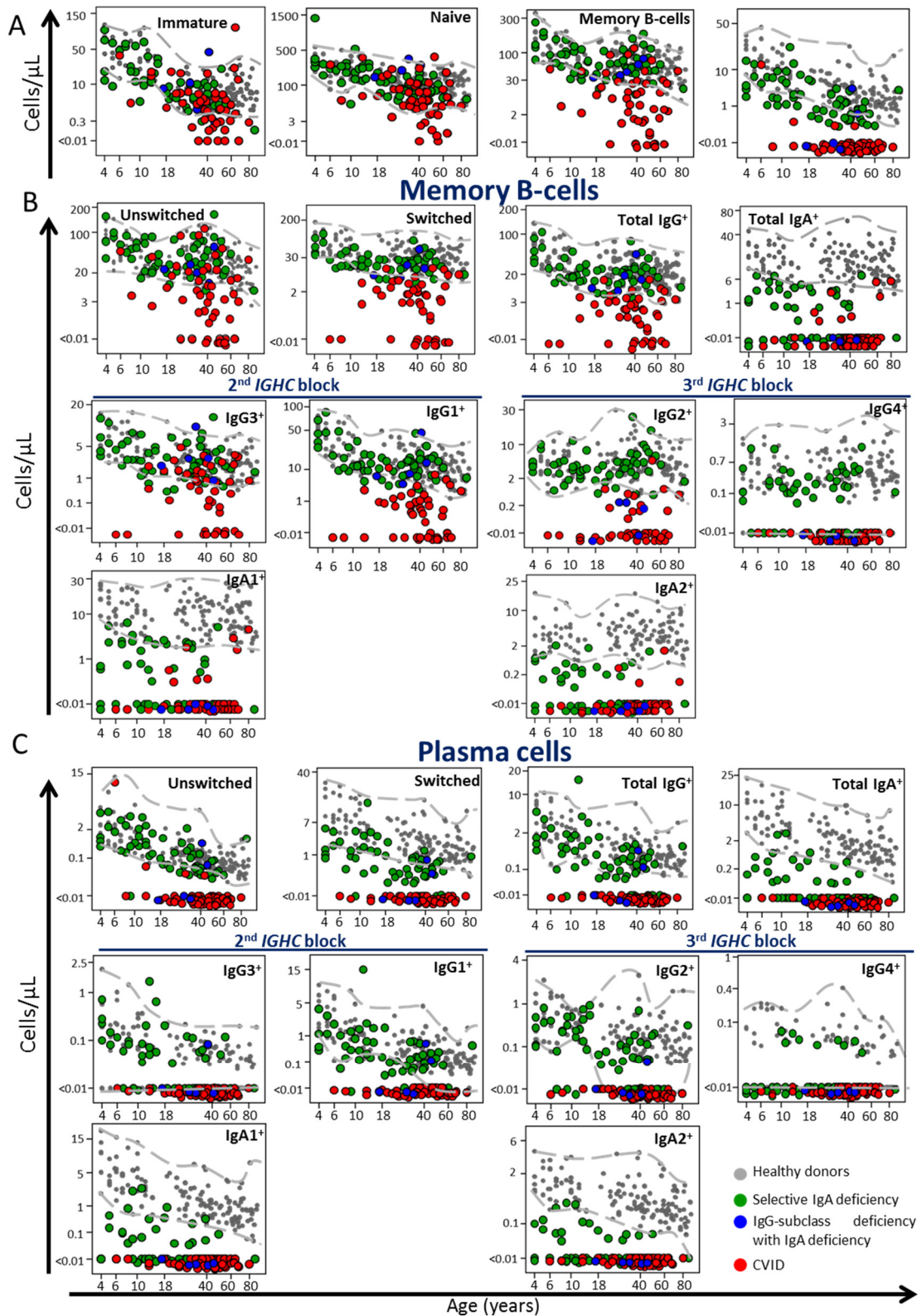
Supplementary Figure 1. Gating strategy used for the identification of the distinct major (maturation-associated) B-cell and plasma cell subpopulations in peripheral blood (Panel A) as well as their subsets of switched-memory B-cells and plasma cells (Panel B). Illustrating bivariate dot-plot graphical representations of the gating strategy used to identify immature, naive, unswitched- and switched-memory B-cells and plasma cells, according to their pattern of expression of CD27, CD38, CD5, CD24, CD21, smlgM and smlgD (panel A). Illustrating bivariate dot-plot graphical representation of the gating strategy used to classify switched memory B-cells and plasma cells according to their differential expression of distinct IgG<sub>1-4</sub> and IgA<sub>1-2</sub> subclasses (panel B).

Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 2. Peripheral blood distribution of subsets of naive (panel A) and memory B-cells (panel B) as defined by the pattern of expression of CD21 and CD27, in patients with selective IgA deficiency (n=59), IgG subclass deficiency with IgA deficiency (n=5) and CVID (n=47) vs. healthy donors distributed by age. Individual cases are represented by green (selective IgA deficiency), blue (IgG subclass deficiency with IgA deficiency), red (CVID), and grey dots (healthy donors). Dotted grey lines represent age-associated maximum and minimum normal reference (range) values. CVID: common variable immunodeficiency.

Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 3. Absolute counts of distinct maturation-associated subpopulations of blood B-cells and plasma cells (Panel A), and the Ig-isotype and Ig-subclass subsets of memory B-cells (Panel B) and plasma cells (Panel C) in CVID (n=47), IgG-subclass deficiency with IgA deficiency (n=5) and selective IgA deficiency patients (n=59) vs. healthy donors (n=140) distributed by age. Individual cases are represented by green (selective IgA deficiency), blue (IgG-subclass deficiency with IgA deficiency), red (CVID), and grey dots (healthy donors). Dotted grey lines represent maximum and minimum age-associated reference (range) values. CVID: common variable immunodeficiency.

**Supplementary Table 1. Euroflow Ig-isotype B-cell tube.** Combination of fluorochrome-conjugated antibodies used for the immunophenotypic analysis of PB samples by flow cytometry.

Fluorochrome conjugated to the Ab reagent												
	BV421	BV510	BV711	BV650	BV786	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PECy7	APC	APCH7
Antibody marker	CD27	smlgM	CD21	CD24	CD19	smlgG3 + smlgG2	smlgA1 + smlgA2	smlgG1 + smlgG2	smlgD	CD5	smlgG4 + smlgA1	CD38
Antibody clone	M-T271	MHM-88	B-ly4	ML5	SJ25C1	SAG3/SAG2	SAA1/SAA2	SAG1/SAG2	IA6-2	L17F12	SAG4/SAA1	HB7
Antibody reagent manufacturer	BD	Biolegend	BD	BD	BD	Cytognos	Cytognos	Cytognos	BD	BD	Cytognos	BD

BD, Becton/Dickinson Biosciences (San José, CA); Biolegend (San Diego, CA); Cytognos SL (Salamanca, Spain).

**Supplementary Table 2. Distribution per age group of all predominantly antibody deficiency patients (grouped per disease category) and healthy donors analyzed in this study.**

<b>Age group</b>	<b>IgADef</b>	<b>IgG/Adef</b>	<b>CVID</b>	<b>Healthy donors</b>
4-5y	7	0	0	13
6-9y	8	0	2	15
10-17y	11	0	2	14
18-39y	21	3	17	32
40-59y	10	2	19	27
60-79y	1	0	6	27
>80y	1	0	1	12
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>5</b>	<b>47</b>	<b>140</b>

Results expressed as number of individuals. Y: years; IgADef: selective IgA deficiency; IgG/Adef: IgG subclass deficiency with IgA deficiency; CVID: common variable immunodeficiency.

**Supplementary Table 3. Frequency of predominantly antibody deficiency patients presenting with abnormally decreased counts of PB subsets of maturation-associated B-cells and plasma cells expressing distinct Ig-isotypes and Ig-subclasses.**

PB B-cell subset	Decreased (<LLN)				Absent (<LOD)			
	IgADef (n=59)	IgG/Adef (n=5)	CVID (n=47)	P-values	IgADef (n=59)	IgG/Adef (n=5)	CVID (n=47)	P-values
<b>Total B-cells</b>	2%	0%	51%	≤0.04 <sup>a,b</sup>	0%	0%	0%	NS
<b>Immature</b>	12%	20%	34%	0.006 <sup>a</sup>	0%	0%	11%	0.02 <sup>a</sup>
<b>Naive</b>	2%	0%	34%	<0.001 <sup>a</sup>	0%	0%	4%	NS
CD21 <sup>+</sup>	3%	20%	40%	<0.001 <sup>a</sup>	0%	0%	4%	NS
CD21 <sup>-</sup>	2%	0%	11%	NS	0%	0%	4%	NS
<b>Memory B-cells</b>	9%	0%	70%	≤0.004 <sup>a,b</sup>	0%	0%	17%	0.001 <sup>a</sup>
CD27 <sup>+</sup>	7%	0%	68%	≤0.006 <sup>a,b</sup>	0%	0%	26%	<0.001 <sup>a</sup>
CD27 <sup>-</sup>	10%	0%	70%	≤0.004 <sup>a,b</sup>	0%	0%	30%	<0.001 <sup>a</sup>
CD21 <sup>+</sup>	9%	0%	79%	≤0.001 <sup>a,b</sup>	0%	0%	17%	0.001 <sup>a</sup>
CD21 <sup>-</sup>	14%	0%	55%	≤0.03 <sup>a,b</sup>	0%	0%	17%	0.001 <sup>a</sup>
Unswitched	3%	20%	62%	<0.001 <sup>a</sup>	0%	0%	26%	<0.001 <sup>a</sup>
Switched	20%	40%	89%	≤0.03 <sup>a,b</sup>	0%	0%	30%	<0.001 <sup>a</sup>
IgG <sup>+</sup>	10%	0%	87%	<0.001 <sup>a,b</sup>	0%	0%	30%	<0.001 <sup>a</sup>
IgG <sub>3</sub> <sup>+</sup>	9%	0%	53%	≤0.03 <sup>a,b</sup>	0%	0%	30%	<0.001 <sup>a</sup>
IgG <sub>1</sub> <sup>+</sup>	9%	0%	89%	<0.001 <sup>a,b</sup>	0%	0%	40%	<0.001 <sup>a</sup>
IgG <sub>2</sub> <sup>+</sup>	7%	100%	94%	<0.001 <sup>a,c</sup>	0%	40%	70%	≤0.005 <sup>a,c</sup>
IgG <sub>3</sub> <sup>+</sup> or IgG <sub>1</sub> <sup>+</sup> or IgG <sub>2</sub> <sup>+</sup>	15%	100%	96%	<0.001 <sup>a,c</sup>	0%	40%	70%	≤0.005 <sup>a,c</sup>
IgA <sup>+</sup>	95%	100%	96%	NS	51%	100%	83%	≤0.04 <sup>a,c</sup>
IgA <sub>1</sub> <sup>+</sup>	86%	100%	96%	NS	51%	100%	83%	<0.04 <sup>a,c</sup>
IgA <sub>2</sub> <sup>+</sup>	92%	100%	98%	NS	63%	100%	92%	<0.001 <sup>a</sup>
IgA <sub>1</sub> <sup>+</sup> or IgA <sub>2</sub> <sup>+</sup>	98%	100%	98%	NS	63%	100%	92%	<0.001 <sup>a</sup>
<b>Plasma cells</b>	46%	80%	98%	<0.001 <sup>a</sup>	0%	60%	92%	<0.001 <sup>a,c</sup>
Unswitched	10%	60%	96%	≤0.04 <sup>a,b,c</sup>	2%	60%	92%	≤0.001 <sup>a,c</sup>
Switched	66%	80%	100%	<0.001 <sup>a</sup>	9%	60%	100%	≤0.02 <sup>a,b,c</sup>
IgG <sup>+</sup>	29%	60%	100%	≤0.008 <sup>a,b</sup>	10%	60%	100%	≤0.02 <sup>a,b,c</sup>
IgA <sup>+</sup>	95%	100%	100%	NS	61%	100%	100%	<0.001 <sup>a</sup>
IgA <sub>1</sub> <sup>+</sup>	88%	100%	100%	0.01 <sup>a</sup>	63%	100%	100%	<0.001 <sup>a</sup>
IgA <sub>2</sub> <sup>+</sup>	93%	100%	100%	NS	71%	100%	100%	<0.001 <sup>a</sup>
IgA <sub>1</sub> <sup>+</sup> or IgA <sub>2</sub> <sup>+</sup>	97%	100%	100%	NS	73%	100%	100%	<0.001 <sup>a</sup>

Results expressed as percentage of cases showing absolute counts of specific B-cell subsets below the lower limit of normal values (<LLN) in PB, compared to previously defined reference range values per age group (Blanco et al.), or below the limit of detection (<LOD) of the method (<0.01 cels/ul). <sup>a</sup>IgADef vs. CVID; <sup>b</sup>IgG/Adef vs. CVID; <sup>c</sup>IgADef vs. IgG/Adef IgADef: selective IgA deficiency; IgG/Adef: IgG subclass deficiency with IgA deficiency; CVID: common variable immunodeficiency. NS: no significant differences.

**Supplementary Table 4. Correspondence between the subgroups of selective IgA deficiency (IgADef) and CVID patients here identified based on the pattern of alteration of distinct PB maturation-associated B-cell and plasma cell subsets expressing distinct Ig-isotypes and Ig-subclasses and both the ESID classification of IgADef patients diagnosed by the IUIS criteria (panel A) and the Euroclass classification of CVID (panel B).**

<b>A</b>	<b>IgADef PATIENT CLUSTERS</b>	
	<b>IgAdef-1 (n=27)</b>	<b>IgAdef-2 (n=32)</b>
<b>ESID criteria</b>		
<b>ESID (Symptomatic or affected family member) (n=34)</b>	38%	62%
<b>Non ESID (asymptomatic and/or no family member affected) (n=25)</b>	56%	44%

Results expressed as percentage of cases. IgAdef: selective IgA deficiency.

<b>B</b>	<b>CVID PATIENT CLUSTERS</b>					
	<b>CVID-1 (n=4)</b>	<b>CVID-2 c (n=5)</b>	<b>CVID-3 (n=15)</b>	<b>CVID-4 (n=6)</b>	<b>CVID-5 (n=7)</b>	<b>CVID-6 (n=10)</b>
<b>Euroclass CVID subgroup</b>						
<b>B+ (n=38)</b>	10%	13%	40%	13%	16%	8%
<b>SmB+ (n=8)</b>	50%	25%	25%	0%	0%	0%
<b>SmB+ CD21norm (n=5)</b>	40%	40%	20%	0%	0%	0%
<b>SmB+ CD21lo (n=3)</b>	67%	0%	33%	0%	0%	0%
<b>SmB- (n=37)</b>	0%	10%	45%	16%	19%	10%
<b>SmB- CD21norm (n=11)</b>	0%	9%	46%	18%	9%	18%
<b>SmB- CD21lo (n=19)</b>	0%	11%	42%	16%	26%	5%
<b>B- (n=9)</b>	0%	0%	0%	11%	11%	78%

Results expressed as percentage of cases. CVID: common variable immunodeficiency.



**Supplementary Table 5. Frequency of selective IgA deficiency patients (IgAdef) presenting with different clinical manifestations of the disease and their corresponding family history of primary antibody deficiency, according to the subgroups of IgAdef patients defined on the basis of the pattern of alteration of their PB maturation-associated B-cell and plasma cell subsets expressing distinct Ig-isotypes and Ig-subclasses.**

Clinical manifestations of the disease	IgAdef PATIENT CLUSTERS			P-values
	Total (n=59)	IgAdef-1 (n=26)	IgAdef-2 (n=33)	
IgG at diagnosis	1404±291	<b>1285±324</b>	<b>1477±248<sup>#</sup></b>	<b>0.03</b>
IgM at diagnosis	134±82	133±98	135±67	NS
IgA at diagnosis	<7	<7	<7	NS
Age (years)	23±19	<b>18±13</b>	<b>31±19<sup>#</sup></b>	<b>0.01</b>
Age at diagnosis (years)	28±45	<b>15±14</b>	<b>29±20<sup>#</sup></b>	<b>0.04</b>
Gender (male/female)	29/30	14/12	18/15	NS
Affected family members	13%	<b>0%</b>	<b>22%<sup>#</sup></b>	<b>0.02</b>
Infectious disease				
Respiratory infections	32%	30%	34%	NS
Bronchiectasias	2%	0%	3%	NS
Other infections	10%	<b>0%</b>	<b>19%<sup>#</sup></b>	<b>0.02</b>
TOTAL	34%	30%	38%	NS
Autoimmune diseases				
Tissue-specific autoimmunity	19%	<b>7%</b>	<b>28%<sup>#</sup></b>	<b>0.04</b>
Systemic autoimmunity	19%	15%	22%	NS
TOTAL	31%	19%	41%	NS
Enteropathy	2%	0%	3%	NS
Solid tumors	2%	0%	3%	NS
Allergy	26%	36%	20%	NS

Results expressed as percentage of patients presenting with clinical manifestation of the disease. None of the cases presented cytopenias, splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenopathy, granuloma or hematologic tumors. <sup>#</sup>  $P \leq 0.05$  vs. IgAdef-1. IgAdef: selective IgA deficiency NS: no statistically significant differences were found.

**Supplementary Table 6. Frequency of CVID patients presenting with clinical manifestations and family records of primary antibody deficiency according to the distinct clusters here defined based on the patterns of alteration of PB maturation-associated B-cell and plasma cell subsets expressing distinct Ig-isotypes and Ig-subclasses.**

Clinical manifestations of the disease	CVID PATIENT CLUSTERS							P-values
	TOTAL (n=47)	CVID-1 (n=4)	CVID-2 (n=5)	CVID-3 (n=15)	CVID-4 (n=6)	CVID-5 (n=7)	CVID-6 (n=10)	
	231±171	153±143	287±176	237±183	284±245	325±137	147±122	NS
IgM at diagnosis	35±56	<b>7±9<sup>b</sup></b>	<b>47±28</b>	59±97	34±29	18±19	22±29	0.03
IgA at diagnosis	7±16	22±38	4±5	6±13	11±16	2±3	5±9	NS
Age (years)	41±17	59±22	<b>34±12</b>	<b>36±12</b>	37±25	41±17	<b>48±11<sup>b,c</sup></b>	≤0.04
Age at diagnosis (years)	31±16	51±17	25±12	31±13	25±22	29±19	29±11	NS
Gender (male/female)	25/22	3/1	2/3	8/7	3/3	5/2	4/6	NS
Affected family members	19%	0%	0%	25%	17%	33%	23%	NS
Infectious diseases								
Respiratory infections	82%	75%	80%	83%	67%	71%	100%	NS
<b>Bronchiectasis</b>	33%	75%	40%	<b>25%</b>	33%	<b>14%</b>	<b>80%<sup>c,e</sup></b>	≤0.02
Other infections	71%	50%	60%	58%	67%	86%	90%	NS
TOTAL	96%	100%	100%	92%	83%	100%	100%	NS
Autoimmune diseases								
<b>Tissue-specific autoimmunity</b>	23%	0%	20%	33%	<b>0%</b>	<b>67%<sup>d</sup></b>	<b>10%<sup>e</sup></b>	≤0.04
Systemic autoimmunity	18%	25%	0%	17%	50%	0%	20%	NS
<b>Cytopenias</b>	27%	0%	0%	<b>8%</b>	<b>67%<sup>c</sup></b>	29%	<b>50%<sup>c</sup></b>	≤0.04
TOTAL	63%	<b>25%</b>	<b>25%</b>	58%	<b>100%<sup>a,b</sup></b>	86%	60%	≤0.03
Organomegalies								
Splenomegaly	50%	50%	20%	50%	50%	57%	67%	≤0.02
<b>Hepatomegaly</b>	32%	50%	20%	<b>0%</b>	33%	<b>57%<sup>c</sup></b>	<b>56%<sup>c</sup></b>	≤0.009
TOTAL	52%	50%	40%	50%	50%	57%	67%	NS
Lymphadenopathy	31%	25%	20%	33%	0%	43%	50%	NS
<b>Enteropathy</b>	39%	50%	<b>0%</b>	<b>17%</b>	<b>67%<sup>b</sup></b>	29%	<b>78%<sup>b,c</sup></b>	<0.05
Granuloma	7%	0%	0%	0%	0%	0%	30%	NS
Solid tumors	11%	50%	20%	0%	0%	0%	20%	NS
Hematologic tumors	5%	0%	0%	0%	0%	14%	11%	NS
Allergy	2%	0%	0%	0%	0%	0%	10%	NS

Results expressed as percentage of patients presenting with each type of clinical manifestation of the disease. a  $P \leq 0.05$  vs. CVID-1; b  $P \leq 0.05$  vs. CVID-2; c  $P \leq 0.05$  vs. CVID-3; d  $P \leq 0.05$  vs. CVID-4. CVID: common variable immunodeficiency; NS: no statistically significant differences detected ( $P > 0.05$ ).





# Referencias bibliográficas



- 1 Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, 2015.
- 2 Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. *Roitt's Essential Immunology*. 12th ed. Wiley-Blackwell: London, UK, 2014.
- 3 Mix E, Goertsches R, Zett UK. Immunoglobulins - Basic considerations. *J Neurol* 2006; **253**: 9–17.
- 4 Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; **11**: 137–154.
- 5 Schroeder HWJ, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: S41–S52.
- 6 Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. Garland Science: New York, NY, 2017.
- 7 Hamilton RG. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1987; **33**: 1707–1725.
- 8 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol* 2014; **5**: 1–17.
- 9 Normansell DE. Human immunoglobulin subclasses. *Diagn Clin Immunol* 1987; **5**: 115–128.
- 10 Kerr M. The structure and function of human IgA. *Biochem J* 1990; **271**: 285–96.
- 11 Abinun M, Albert M, Buckland SBCM, Bustamante J, Cant A, Casanova J-L *et al*. ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID. 2017. Disponible en <https://esid.org/Working-Parties/Registry/New-ESID-Registry>.
- 12 Spickett GP, Misbah SA, Chapel HM. Primary antibody deficiency in adults. *Lancet* 1991; **337**: 281–4.
- 13 Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol* 2017; **85**: 3–12.
- 14 Vale AM, Schroeder HW. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 778–787.
- 15 Abramson N, Schur PH. The IgG subclasses of red cell antibodies and relationship to monocyte binding. *Blood* 1972; **40**: 500–8.
- 16 Meulenbroek A. *Useful Diagnostic Markers for Immunocompetence*. 3rd ed. Sanquin: Amsterdam, The Netherlands, 2008.
- 17 Aalberse RC, Van Milligen F, Tan KY, Stapel SO. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy* 1993; **48**: 559–69.
- 18 Shakib F. The IgG4 subclass. *Monogr Allergy* 1986; **19**: 223–226.
- 19 Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 367–86.
- 20 Vandermeulen E, Verleden SE, Bellon H, Ruttens D, Lammertyn E, Claes S *et al*. Humoral immunity in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction: A broncho-alveolar lavage fluid analysis. *Transpl Immunol* 2016; **38**: 27–32.
- 21 Mestecky J, Strober W, Russell M, Cheroutre H, Lambrecht BN KB. *Mucosal Immunology*. 3rd ed. Elsevier: Oxford, UK, 2005.
- 22 Reddy PS, Corley RB. The contribution of ER quality control to the biologic functions of secretory IgM. *Immunol Today* 1999; **20**: 582–8.
- 23 McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Lang JE, Heath V, Craddock CG. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. *J Immunol* 1972; **109**: 1386–1394.
- 24 Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed. Elsevier Saunders: St. Louis, MO, 2012.
- 25 van de Winkel JG, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol* 1991; **49**: 511–524.
- 26 Kim K, Keller MA, Heiner DC. Immunoglobulin G subclasses in human colostrum, milk and saliva. *Acta*

- Paediatr* 1992; **81**: 113–118.
- 27 Kaschka WP, Theilkaes L, Eickhoff K, Skvaril F. Disproportionate elevation of the immunoglobulin G1 concentration in cerebrospinal fluids of patients with multiple sclerosis. *Infect Immun* 1979; **26**: 933–941.
- 28 Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispen T. Immunoglobulin G4: An odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**: 469–477.
- 29 Woof JM, Ken MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 2006; **208**: 270–282.
- 30 Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011; **4**: 590–597.
- 31 Kazeeva TN, Shevelev a. B. Unknown functions of immunoglobulins A. *Biochem* 2007; **72**: 485–494.
- 32 Roberts-Thomson PJ, Shepherd K. Molecular size heterogeneity of immunoglobulins in health and disease. *Clin Exp Immunol* 1990; **79**: 328–334.
- 33 Danilova N, Amemiya CT. Going adaptive: The saga of antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1168**: 130–155.
- 34 Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B *et al.* Regulation of mucosal IgA responses: Lessons from primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1238**: 132–144.
- 35 Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 273–93.
- 36 Monteiro RC, Van De Winkel JGJ. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 177–204.
- 37 Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, Van Es LA, Daha MR. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol* 1987; **17**: 321–326.
- 38 Hiemstra PS, Biewenga J, Gorter A, Stuurman ME, Faber A, van Es LA *et al.* Activation of complement by human serum IgA, secretory IgA and IgA1 fragments. *Mol Immunol* 1988; **25**: 527–533.
- 39 Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Borte M, Schubert S, Riedel F *et al.* Establishment of age-dependent reference values for IgA subclasses. *Clin Chim Acta* 2003; **328**: 129–133.
- 40 Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 2005; **206**: 64–82.
- 41 Mestecky J, Lue C, Tarkowski A, Ladjeva I, Peterman JH, Moldoveanu Z *et al.* Comparative Studies of the Biological Properties of Human IgA Subclasses. In: Poulik MD (ed). *Protides of the Biological Fluids*. Elsevier: London, UK, 1989, pp 173–182.
- 42 Vladutiu AO. Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; **7**: 131–140.
- 43 Putnam FW, Takahashi N, Tetaert D, Debuire B, Lin LC. Amino acid sequence of the first constant region domain and the hinge region of the delta heavy chain of human IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**: 6168–6172.
- 44 Plebani A, Mira E, Mevio E, Monafa V, Notarangelo LD, Avanzini A *et al.* IgM and IgD concentrations in the serum and secretions of children with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 1983; **53**: 689–696.
- 45 Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengtén E *et al.* Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* 2009; **10**: 889–98.
- 46 Chen K, Cerutti A. The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr Opin Immunol* 2011; **23**: 345–352.
- 47 Riesbeck K, Nordstrom T. Structure and immunological action of the human pathogen *Moraxella catarrhalis* IgD-binding protein. *Crit Rev Immunol* 2006; **26**: 353–76.
- 48 Mimura T, Usui T, Mori M, Aixinjueluo W, Funatsu H, Noma H *et al.* Immunochromatographic assay for measurement of total IgE in tears, nasal mucus, and saliva of patients with allergic rhinoconjunctivitis. *J Asthma* 2010; **47**: 1153–1160.
- 49 Poole JA, Matangkasombut P, Rosenwasser LJ. Targeting the IgE molecule in allergic and asthmatic diseases: Review of the IgE molecule and clinical efficacy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **115**: 375–385.
- 50 Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: S73–80.



- 51 Lebien TW, Tedder TF. ASH 50th anniversary review B lymphocytes : how they develop and function. *Am Soc Hematol* 2008; **112**: 1570–1580.
- 52 Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 107–116.
- 53 Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J *et al*. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78 Suppl 1**: S47-60.
- 54 Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; **27**: 190–202.
- 55 Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**: 575–581.
- 56 Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 959–971.
- 57 Ichii M, Oritani K, Kanakura Y. Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 421–31.
- 58 Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J *et al*. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; **22**: 1175–1183.
- 59 van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EFE, Reinders MJT *et al*. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol* 2005; **175**: 5912–5922.
- 60 Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 1994; **56**: 27–150.
- 61 Hardy RR, Hayakawa K. B Cell Development Pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 595–621.
- 62 Berkowska MA, van der Burg M, van Dongen JJM, van Zelm MC. Checkpoints of B cell differentiation: Visualizing Ig-centric processes. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1246**: 11–25.
- 63 Clavarino G, Delouche N, Vettier C, Laurin D, Pernollet M, Raskovalova T *et al*. Novel strategy for phenotypic characterization of Human B lymphocytes from precursors to effector cells by flow cytometry. *PLoS One* 2016; **11**: 1–16.
- 64 van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; **60**: 1–13.
- 65 Agrawal S, Smith SABC, Tangye SG, Sewell WA. Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clin Exp Immunol* 2013; **174**: 53–59.
- 66 Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 1996; **5**: 505–511.
- 67 Chen C, Radic MZ, Erikson J, Camper SA, Litwin S, Hardy RR *et al*. Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J Immunol* 1994; **152**: 1970–1982.
- 68 Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology* 2003; **110**: 411–420.
- 69 Tangye SG. Thucydides and longer-lived plasma cells. *Blood* 2015; **125**: 1684–5.
- 70 Lanzavecchia A, Sallusto F. Human B cell memory. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**: 298–304.
- 71 Tarlinton D, Good-Jacobson K. Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility. *Science* 2013; **341**: 1205–1211.
- 72 Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005; **105**: 4390–8.
- 73 Fearon DT, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 393–422.
- 74 Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes.

- Science* 1992; **256**: 105–107.
- 75 Riley JK, Sliwkowski MX. CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol* 2000; **27**: 17–24.
- 76 Justement LB, Brown VK, Lin J. Regulation of B-cell activation by CD45: a question of mechanism. *Immunol Today* 1994; **15**: 399–406.
- 77 Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* 2012; **13**: 439–447.
- 78 Sen G, Bikah G, Venkataraman C, Bondada S. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 3319–3328.
- 79 Gary-Gouy H, Harriague J, Dalloul A, Donnadiou E, Bismuth G. CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 2002; **168**: 232–239.
- 80 Fujimoto M, Bradney AP, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. *Immunity* 1999; **11**: 191–200.
- 81 Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol* 1993; **150**: 3671–3680.
- 82 Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol* 2010; **185**: 3117–3125.
- 83 Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* 2012; **247**: 52–63.
- 84 Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 2012; **120**: 2240–2248.
- 85 Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 2016; **45**: 471–482.
- 86 Allen CDC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N *et al*. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004; **5**: 943–52.
- 87 Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* 2016; **270**: 8–19.
- 88 Stavnezer J, Schrader CE. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J Immunol* 2014; **193**: 5370–5378.
- 89 Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**: 517–531.
- 90 Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000; **102**: 553–63.
- 91 Briere F, Servedi-Delprat C, Bridon JM, Saint-Remy JM, Banchereau J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med* 1994; **179**: 757–762.
- 92 Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Casali P. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *J Immunol* 1998; **161**: 5217–5225.
- 93 Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G *et al*. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 3730–3734.
- 94 Horns F, Vollmers C, Croote D, Mackey SF, Swan GE, Dekker CL *et al*. Lineage tracing of human B cells reveals the in vivo landscape of human antibody class switching. *Elife* 2016; **5**. doi:10.7554/eLife.16578.
- 95 Collins AM, Jackson KJL. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol* 2013;

- 4: 235.
- 96 Jackson KJL, Wang Y, Collins AM. Human immunoglobulin classes and subclasses show variability in VDJ gene mutation levels. *Immunol Cell Biol* 2014; **92**: 729–733.
- 97 de Jong BG, IJspeert H, Marques L, van der Burg M, van Dongen JJ, Loos BG *et al*. Human IgG2- and IgG4-expressing memory B cells display enhanced molecular and phenotypic signs of maturity and accumulate with age. *Immunol Cell Biol* 2017; **95**: 744–752.
- 98 van Zelm MC. B cells take their time: sequential IgG class switching over the course of an immune response? *Immunol Cell Biol* 2014; **92**: 645–646.
- 99 Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 444–448.
- 100 Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997; **388**: 133–134.
- 101 Mesin L, Di Niro R, Thompson KM, Lundin KEA, Sollid LM. Long-lived plasma cells from human small intestine biopsies secrete immunoglobulins for many weeks in vitro. *J Immunol* 2011; **187**: 2867–2874.
- 102 Landsverk OJB, Snir O, Casado RB, Richter L, Mold JE, Reu P *et al*. Antibody-secreting plasma cells persist for decades in human intestine. *J Exp Med* 2017; **214**: 309–317.
- 103 Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* 2013; **251**: 177–188.
- 104 Yu X, Tsibane T, McGraw PA, House FS, Keefer CJ, Hicar MD *et al*. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 2008; **455**: 532–536.
- 105 Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 2003; **171**: 4969–4973.
- 106 Seifert M, Kuppers R. Human memory B cells. *Leukemia* 2016; **30**: 2283–2292.
- 107 Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 349–354.
- 108 Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 2000; **176**: 154–170.
- 109 Defrance T, Taillardet M, Genestier L. T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* 2011; **23**: 330–336.
- 110 van Zelm MC, Bartol SJW, Driessen GJ, Mascart F, Reisli I, Franco JL *et al*. Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**: 135–144.
- 111 Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A *et al*. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 2011; **118**: 2150–2158.
- 112 Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012; **257**: 2432–2437.
- 113 Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ *et al*. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol* 2006; **176**: 1506–1516.
- 114 Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol* 2009; **182**: 4116–4126.
- 115 Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ *et al*. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* 2010; **115**: 519–529.
- 116 Said JW, Hoyer KK, French SW, Rosenfelt L, Garcia-Lloret M, Koh PJ *et al*. TCL1 oncogene expression in B cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B cell lymphoma. *Lab Invest* 2001; **81**: 555–564.
- 117 Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM *et al*. Circulating human B and plasma cells. Age-

- associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010; **95**: 1016–20.
- 118 Lee J, Sim J-H, Kim I-J. Peripheral immature B cells: modulators of autoimmunity. *Int J Rheum Dis* 2015; **18**: 200–207.
- 119 Isnardi I, Ng Y, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I *et al.* Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 2010; **115**: 5026–36.
- 120 Thorarinsdottir K, Camponeschi A, Gjertsson I, Mårtensson I-L. CD21 -/low B cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease. *Scand J Immunol* 2015; **82**: 254–61.
- 121 Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; **188**: 1679–89.
- 122 Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998; **188**: 1691–1703.
- 123 Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 2006; **177**: 3728–3736.
- 124 Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J *et al.* A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 2007; **178**: 6624–6633.
- 125 Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Pellicano M, Vitello S, Lio D *et al.* A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev* 2009; **130**: 681–690.
- 126 Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O’Shea MA *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 2008; **205**: 1797–1805.
- 127 Thorarinsdottir K, Camponeschi A, Cavallini N, Grimsholm O, Jacobsson L, Gjertsson I *et al.* CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. *Clin Exp Immunol* 2016; **185**: 252–62.
- 128 Portugal S, Obeng-Adjei N, Moir S, Crompton PD, Pierce SK. Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. *Cell Immunol* 2017; **321**: 18–25.
- 129 Pupovac A, Good-Jacobson KL. An antigen to remember: regulation of B cell memory in health and disease. *Curr Opin Immunol* 2017; **45**: 89–96.
- 130 van Zelm MC. Human CD27+IgM+IgD+ B cells: T-cell or TLR-dependent? *Blood* 2012; **120**: 4905–4906.
- 131 Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol* 2005; **35**: 3433–3441.
- 132 Martin V, Bryan Wu Y-C, Kipling D, Dunn-Walters D. Ageing of the B-cell repertoire. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; **370**: 20140237.
- 133 Seifert M, Steimle-Grauer SA, Goossens T, Hansmann ML, Bräuninger A, Küppers R. A model for the development of human IgD-only B cells: Genotypic analyses suggest their generation in superantigen driven immune responses. *Mol Immunol* 2009; **46**: 630–639.
- 134 Forsgren A, Grubb AO. Many bacterial species bind human IgD. *J Immunol* 1979; **122**: 1468–1472.
- 135 Johansen F-E, Baekkevold ES, Carlsen HS, Farstad IN, Soler D, Brandtzaeg P. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood* 2005; **106**: 593–600.
- 136 Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 2010; **162**: 271–9.
- 137 Huck K, Feyen O, Ghosh S, Beltz K, Bellert S, Niehues T. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin Immunol* 2009; **131**: 50–59.
- 138 Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz R *et al.* Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. 2009; **113**: 2461–2469.

- 139 Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G *et al.* Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 2005; **105**: 1614–1621.
- 140 Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002; **99**: 2154–2161.
- 141 Sundstrom P, Lundin SB, Nilsson L-A, Quiding-Jarbrink M. Human IgA-secreting cells induced by intestinal, but not systemic, immunization respond to CCL25 (TECK) and CCL28 (MEC). *Eur J Immunol* 2008; **38**: 3327–3338.
- 142 Liston A, Carr EJ, Linterman MA. Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol* 2016; **37**: 637–646.
- 143 Carr EJ, Dooley J, Garcia-Perez JE, Lagou V, Lee JC, Wouters C *et al.* The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol* 2016; **17**: 461–468.
- 144 van den Heuvel D, Jansen MAE, Nasserinejad K, Dik WA, van Lochem EG, Bakker-Jonges LE *et al.* Effects of nongenetic factors on immune cell dynamics in early childhood: The Generation R Study. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**: 1923–1934.e17.
- 145 Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings Biol Sci* 2015; **282**: 20143085.
- 146 Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A. Immunosenescence and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; **75**: 165–172.
- 147 Yoshikawa TT. Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2000; **30**: 931–933.
- 148 Cooper MD. Current concepts. B lymphocytes. Normal development and function. *N Engl J Med* 1987; **317**: 1452–1456.
- 149 Zhang X, Zhivaki D, Lo-Man R. Unique aspects of the perinatal immune system. *Nat Rev Immunol* 2017; **17**: 495–507.
- 150 Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H. Evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Transplant Proc* 1995; **27**: 196–199.
- 151 Crosbie OM, Reynolds M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O’Farrelly C. In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology* 1999; **29**: 1193–1198.
- 152 Siegrist C-A, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 185–194.
- 153 Kirkland JL, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol* 2002; **37**: 757–767.
- 154 Jensen K, Schaffer L, Olstad OK, Bechensteen AG, Hellebostad M, Tjonnfjord GE *et al.* Striking decrease in the total precursor B-cell compartment during early childhood as evidenced by flow cytometry and gene expression changes. *Pediatr Hematol Oncol* 2010; **27**: 31–45.
- 155 Pihlgren M, Friedli M, Tougne C, Rochat A-F, Lambert P-H, Siegrist C-A. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. *J Immunol* 2006; **176**: 165–72.
- 156 Pihlgren M, Schallert N, Tougne C, Bozzotti P, Kovarik J, Fulurija A *et al.* Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 939–946.
- 157 Lusciati P, Hubschmid T, Cottier H, Hess MW, Sobin LH. Human lymph node morphology as a function of age and site. *J Clin Pathol* 1980; **33**: 454–461.
- 158 Barzanji AJ, Emery JL. Germinal centers in the spleens of neonates and stillbirths. *Early Hum Dev* 1978; **1**: 363–369.
- 159 Ahmadi O, McCall JL, Stringer MD. Does senescence affect lymph node number and morphology? A systematic review. *ANZ J Surg* 2013; **83**: 612–618.
- 160 Hadamitzky C, Spohr H, Debertin AS, Guddat S, Tsokos M, Pabst R. Age-dependent histoarchitectural changes

- in human lymph nodes: an underestimated process with clinical relevance? *J Anat* 2010; **216**: 556–562.
- 161 Tsakraklides V, Tsakraklides E, Good RA. An autopsy study of human axillary lymph node histology. *Am J Pathol* 1975; **78**: 7–22.
- 162 Sjogren YM, Tomicic S, Lundberg A, Bottcher MF, Bjorksten B, Sverremark-Ekstrom E *et al.* Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**: 1842–1851.
- 163 Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; **83**: F186–F192.
- 164 Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; **28**: 19–25.
- 165 Bennet R, Nord CE. Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection* 1987; **15**: 332–336.
- 166 Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; **118**: 511–521.
- 167 Wall R, Ross RP, Ryan CA, Hussey S, Murphy B, Fitzgerald GF *et al.* Role of gut microbiota in early infant development. *Clin Med Pediatr* 2009; **3**: 45–54.
- 168 Alkan Ozdemir S, Ozer EA, Kose S, Ilhan O, Ozturk C, Sutcuoglu S. Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; **29**: 972–6.
- 169 Hanson LA, Korotkova M, Lundin S, Haversen L, Silfverdal SA, Mattsby-Baltzer I *et al.* The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **987**: 199–206.
- 170 Allansmith M, McClellan BH, Butterworth M, Maloney JR. The development of immunoglobulin levels in man. *J Pediatr* 1968; **72**: 276–290.
- 171 Vlug A, Nieuwenhuys EJ, van Eijk R V, Geertzen HG, van Houte AJ. Nephelometric measurements of human IgG subclasses and their reference ranges. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994; **52**: 561–567.
- 172 Linder N, Waintraub I, Smetana Z, Barzilai a, Lubin D, Mendelson E *et al.* Placental transfer and decay of varicella-zoster virus antibodies in preterm infants. *J Pediatr* 2000; **137**: 85–9.
- 173 Linder N, Tallen-Gozani E, German B, Duvdevani P, Ferber A, Sirota L. Placental transfer of measles antibodies: Effect of gestational age and maternal vaccination status. *Vaccine* 2004; **22**: 1509–1514.
- 174 van den Berg JP, Westerbeek E a M, Berbers G a M, van Gageldonk PGM, van der Klis FRM, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, haemophilus influenzae type b, and Neisseria meningitidis serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J* 2010; **29**: 801–805.
- 175 Ben-Hur H, Gurevich P, Elhayany A, Avinoach I, Schneider DF, Zusman I. Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *Int J Mol Med* 2005; **16**: 401–407.
- 176 Borte S, Janzi M, Pan-Hammarström Q, von Döbeln U, Nordvall L, Winiarski J *et al.* Placental transfer of maternally-derived iga precludes the use of Guthrie card eluates as a screening tool for primary immunodeficiency diseases. *PLoS One* 2012; **7**: 1–8.
- 177 Malek A, Sager R, Schneider H. Transport of proteins across the human placenta. *Am J Reprod Immunol* 1998; **40**: 347–51.
- 178 Nathan DG, Oski FA. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 7th ed. Saunders: Philadelphia, PA, 2008.
- 179 Gurevich P, Ben-Hur H, Moldavsky M, Szvalb S, Shperling I, Zusman I. An immunohistochemical study of the secretory immune system in human fetal endocrine glands and their precursors. *Early Pregnancy* 2001; **5**: 191–200.
- 180 Stiehm ER, Fudenberg HH. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics* 1966; **37**: 715–727.

- 181 van der Giessen M, Rossouw E, van Veen T, van Loghem E, Zegers BJ, Sander PC. Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clin Exp Immunol* 1975; **21**: 501–509.
- 182 Bird D, Duffy S, Isaacs D, Webster ADB. Reference children for IgG subclasses in preschool. 1985; : 204–207.
- 183 Berth M, Delanghe J, Langlois M, De Buyzere M. Reference values of serum IgA subclasses in caucasian adults by immunonephelometry. *Clin Chem* 1999; **45**: 309–310.
- 184 Haraldsson A, Weemaes CMR, Jonasdottir S, Olafsson O, Van De Wiel G, Goertz J *et al.* Serum immunoglobulinD in infants and children. *Scand J Immunol* 2000; **51**: 415–418.
- 185 Martins TB, Bandhauer ME, Bunker AM, Roberts WL, Hill HR. New childhood and adult reference intervals for total IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; **133**: 589–591.
- 186 French MA, Harrison G. Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal antisera. *Clin Exp Immunol* 1984; **56**: 473–5.
- 187 Plebani A, Ugazio AG, Avanzini MA, Massimi P, Zonta L, Monafo V *et al.* Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts. *Eur J Pediatr* 1989; **149**: 164–167.
- 188 Duchamp M, Sterlin D, Diabate A, Uring-Lambert B, Guérin-El Khourouj V, Le Mauff B *et al.* B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immunity, Inflamm Dis* 2014; **2**: 131–40.
- 189 Piątosza B, Wolska-Kuśnierz B, Pac M, Siewiera K, Gałkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78**: 372–81.
- 190 van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL *et al.* Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol* 2009; **133**: 95–107.
- 191 Comans-Bitter WM, De Groot R, Van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K *et al.* Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood: Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997; **130**: 388–393.
- 192 Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, Leuvenink J, van Hout RWNM, van der Burg M *et al.* Age-matched Reference Values for B-lymphocyte Subpopulations and CVID Classifications in Children. *Scand J Immunol* 2011; **74**: 502–510.
- 193 Walker JC, Smolders MAJC, Gemen EFA, Antonius TAJ, Leuvenink J, de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol* 2011; **73**: 53–58.
- 194 Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood* 2007; **110**: 2948–2954.
- 195 Elliott SR, Robertson DM, Zola H, Macardle PJ. Expression of the costimulator molecules, CD40 and CD154, on lymphocytes from neonates and young children. *Hum Immunol* 2000; **61**: 378–388.
- 196 Driessen GJ, Dalm VASH, van Hagen PM, Grashoff HA, Hartwig NG, van Rossum AMC *et al.* Common variable immunodeficiency and idiopathic primary hypogammaglobulinemia: two different conditions within the same disease spectrum. *Haematologica* 2013; **98**: 1617–1623.
- 197 Dunn-Walters DK. The ageing human B cell repertoire: A failure of selection? *Clin Exp Immunol* 2016; **183**: 50–56.
- 198 Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER *et al.* Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **112**: 973–80.
- 199 Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* 2004; **72**: 203–212.
- 200 Rabe H, Lundell A-C, Andersson K, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher proportions of circulating FOXP3+ and CTLA-4+ regulatory T cells are associated with lower fractions of memory CD4+ T cells in infants. *J Leukoc Biol* 2011; **90**: 1133–1140.
- 201 Cossarizza A, Ortolani C, Paganelli R, Barbieri D, Monti D, Sansoni P *et al.* CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech*

- Ageing Dev* 1996; **86**: 173–195.
- 202 Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannet I, Hulstaert F, Hamilton C *et al.* Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992; **120**: 216–222.
- 203 Gilmour KC, Walshe D, Heath S, Monaghan G, Loughlin S, Lester T *et al.* Immunological and genetic analysis of 65 patients with a clinical suspicion of X linked hyper-IgM. *Mol Pathol* 2003; **56**: 256–262.
- 204 Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, Lewis DB, Ito S, Aruffo A *et al.* Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* 1995; **95**: 66–75.
- 205 McGreal EP, Hearne K, Spiller OB. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. *Immunobiology* 2012; **217**: 176–186.
- 206 Al-Hertani W, Yan SR, Byers DM, Bortolussi R. Human newborn polymorphonuclear neutrophils exhibit decreased levels of MyD88 and attenuated p38 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Clin Invest Med* 2007; **30**: E44-53.
- 207 Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa A-R, Hayde M, Herkner K *et al.* Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis* 2007; **195**: 296–302.
- 208 Filias A, Theodorou GL, Mouzopoulou S, Varvarigou AA, Mantagos S, Karakantza M. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr* 2011; **11**: 29.
- 209 Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T *et al.* International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* 2018; **38**: 96–128.
- 210 Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME *et al.* Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**: 1161–1178.
- 211 Driessen G, van der Burg M. Educational paper: primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr* 2011; **170**: 693–702.
- 212 Wood PM. Primary antibody deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol* 2010; **17**: 356–361.
- 213 Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 519–533.
- 214 Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD (eds.). *Primary Immunodeficiency Diseases*. Springer: Berlin, Heidelberg, 2008.
- 215 Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks AW *et al.* X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine (Baltimore)* 2006; **85**: 193–202.
- 216 Ochs H, Smith C, Puck, JM (eds.). *Primary Immunodeficiency Diseases*. 3rd ed. Oxford University Press: Oxford, UK, 2013.
- 217 van der Burg M, van Zelm MC, Driessen GJA, van Dongen JJM. New frontiers of primary antibody deficiencies. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 59–73.
- 218 Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I *et al.* Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; **72**: 279–290.
- 219 Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F *et al.* The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; **361**: 226–233.
- 220 Yel L, Minegishi Y, Coustan-Smith E, Buckley RH, Trubel H, Pachman LM *et al.* Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1996; **335**: 1486–1493.
- 221 Minegishi Y, Coustan-Smith E, Wang YH, Cooper MD, Campana D, Conley ME. Mutations in the human lambda5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med* 1998; **187**: 71–77.
- 222 Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME. Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1115–1121.
- 223 Dobbs AK, Yang T, Farmer D, Kager L, Parolini O, Conley ME. Cutting edge: a hypomorphic mutation in Igbeta (CD79b) in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development. *J Immunol* 2007; **179**:



- 2055–2059.
- 224 Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, Lederman HM, Pappu R, Campana D *et al.* An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* 1999; **286**: 1954–1957.
- 225 Lopez Granados E, Porpiglia AS, Hogan MB, Matamoros N, Krasovec S, Pignata C *et al.* Clinical and molecular analysis of patients with defects in micro heavy chain gene. *J Clin Invest* 2002; **110**: 1029–1035.
- 226 Sicherer SH, Winkelstein JA. Primary immunodeficiency diseases in adults. *JAMA* 1998; **279**: 58–61.
- 227 Stubbs A, Bangs C, Shillitoe B, Edgar JD, Burns SO, Thomas M *et al.* Bronchiectasis and deteriorating lung function in agammaglobulinaemia despite immunoglobulin replacement therapy. *Clin Exp Immunol* 2018; **191**: 212–219.
- 228 Abolhassani H, Hirbod-Mobarakeh A, Shahinpour S, Panahi M, Mohammadinejad P, Mirminachi B *et al.* Mortality and morbidity in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2015; **43**: 62–66.
- 229 Shillitoe B, Gennery A. X-Linked Agammaglobulinaemia: Outcomes in the modern era. *Clin Immunol* 2017; **183**: 54–62.
- 230 Cooper MD, Faulk WP, Fudenberg HH, Good RA, Hitzig W, Kunkel H *et al.* Classification of primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1973; **288**: 966–967.
- 231 Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT *et al.* International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; **4**: 38–59.
- 232 Ameratunga R, Brewerton M, Slade C, Jordan A, Gillis D, Steele R *et al.* Comparison of diagnostic criteria for common variable immunodeficiency disorder. *Front Immunol* 2014; **5**: 415.
- 233 Bertinchamp R, Gérard L, Boutboul D, Malphettes M, Fieschi C, Oksenhendler E *et al.* Exclusion of Patients with a Severe T-Cell Defect Improves the Definition of Common Variable Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; **4**: 1147–1157.
- 234 Chapel H. Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) - Diagnoses of Exclusion, Especially Combined Immune Defects. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; **4**: 1158–1159.
- 235 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**: 709–727.
- 236 Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; **1**: 545–56.
- 237 Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999; **93**: 190–7.
- 238 Ameratunga R, Woon S-T, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* 2013; **174**: 203–211.
- 239 Grimbacher B, ESID Registry Working Party. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry 2014. *Clin Exp Immunol* 2014; **178** Suppl: 18–20. Disponible en <https://esid.org/Working-Parties/Registry/New-ESID-Registry>.
- 240 Sanchez-Ramon S, de Gracia J, Garcia-Alonso AM, Rodriguez Molina JJ, Melero J, de Andres A *et al.* Multicenter study for the evaluation of the antibody response against salmonella typhi Vi vaccination (EMPATHY) for the diagnosis of Anti-polysaccharide antibody production deficiency in patients with primary immunodeficiency. *Clin Immunol* 2016; **169**: 80–84.
- 241 Daly TM, Hill HR. Use and clinical interpretation of pneumococcal antibody measurements in the evaluation of humoral immune function. *Clin Vaccine Immunol* 2015; **22**: 148–152.
- 242 Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT *et al.* Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**: 1178–1186.
- 243 Dorsey MJ, Orange JS. Impaired specific antibody response and increased B-cell population in transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; **97**: 590–595.

- 244 Gathmann B, Mahlaoui N, Gerard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze I *et al.* Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**: 116–126.
- 245 Slade CA, Bosco JJ, Binh Giang T, Kruse E, Stirling RG, Cameron PU *et al.* Delayed Diagnosis and Complications of Predominantly Antibody Deficiencies in a Cohort of Australian Adults. *Front Immunol* 2018; **9**: 694.
- 246 Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2012; **2012**: 301–305.
- 247 Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* 2012; **119**: 1650–1657.
- 248 Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999; **92**: 34–48.
- 249 Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B *et al.* Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008; **112**: 277–286.
- 250 Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E *et al.* The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; **111**: 77–85.
- 251 Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C *et al.* Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2007; **27**: 308–316.
- 252 Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R *et al.* Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1547–1554.
- 253 Mouillot G, Carmagnat M, Gerard L, Garnier J-L, Fieschi C, Vince N *et al.* B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol* 2010; **30**: 746–755.
- 254 Bazregari S, Azizi G, Tavakol M, Asgardoon MH, Kiaee F, Tavakolinia N *et al.* Evaluation of infectious and non-infectious complications in patients with primary immunodeficiency. *Cent J Immunol* 2017; **42**: 336–341.
- 255 Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**: 658–664.
- 256 Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E *et al.* Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **130**: 1197–1198.
- 257 Feuille EJ, Anooshiravani N, Sullivan KE, Fuleihan RL, Cunningham-Rundles C. Autoimmune Cytopenias and Associated Conditions in CVID: a Report From the USIDNET Registry. *J Clin Immunol* 2018; **38**: 28–34.
- 258 Jolles S, Chapel H, Litzman J. When to initiate immunoglobulin replacement therapy (IGRT) in antibody deficiency: a practical approach. *Clin Exp Immunol* 2017; **188**: 333–341.
- 259 Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109**: 1001–1004.
- 260 Berger M, Jolles S, Orange JS, Sleasman JW. Bioavailability of IgG administered by the subcutaneous route. *J Clin Immunol* 2013; **33**: 984–990.
- 261 Jolles S, Borte M, Nelson RPJ, Rojavin M, Bexon M, Lawo J-P *et al.* Long-term efficacy, safety, and tolerability of Hizentra(R) for treatment of primary immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 2014; **150**: 161–169.
- 262 Haddad E, Berger M, Wang ECY, Jones CA, Bexon M, Baggish JS. Higher doses of subcutaneous IgG reduce resource utilization in patients with primary immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012; **32**: 281–289.
- 263 Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2000; **120**: 225–231.
- 264 Ashman RF, Schaffer FM, Kemp JD, Yokoyama WM, Zhu ZB, Cooper MD *et al.* Genetic and immunologic analysis of a family containing five patients with common-variable immune deficiency or selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 1992; **12**: 406–414.
- 265 Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet* 2016; **53**: 575–90.

- 266 Kienzler A-K, Hargreaves CE, Patel SY. The role of genomics in common variable immunodeficiency disorders. *Clin Exp Immunol* 2017; **188**: 326–332.
- 267 Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, Caswell R, Allen HL, De Franco E *et al.* Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet* 2014; **46**: 812–814.
- 268 Abolhassani H, Wang N, Aghamohammadi A, Rezaei N, Lee YN, Frugoni F *et al.* A hypomorphic recombination-activating gene 1 (RAG1) mutation resulting in a phenotype resembling common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**: 1375–1380.
- 269 Abolhassani H, Cheraghi T, Rezaei N, Aghamohammadi A, Hammarstrom L. Common Variable Immunodeficiency or Late-Onset Combined Immunodeficiency: A New Hypomorphic JAK3 Patient and Review of the Literature. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015; **25**: 218–220.
- 270 Chandra A, Zhang F, Gilmour KC, Webster D, Plagnol V, Kumararatne DS *et al.* Common variable immunodeficiency and natural killer cell lymphopenia caused by Ets-binding site mutation in the IL-2 receptor  $\gamma$  (IL2RG) gene promoter. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**: 940–942.
- 271 Volk T, Pannicke U, Reisli I, Bulashevska A, Ritter J, Bjorkman A *et al.* DCLRE1C (ARTEMIS) mutations causing phenotypes ranging from atypical severe combined immunodeficiency to mere antibody deficiency. *Hum Mol Genet* 2015; **24**: 7361–7372.
- 272 Tuijnenburg P, Lango Allen H, Burns SO, Greene D, Jansen MH, Staples E *et al.* Loss-of-function nuclear factor  $\kappa$ B subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *J Allergy Clin Immunol* 2018; En prensa desde Marzo de 2018. doi:10.1016/j.jaci.2018.01.039.
- 273 Pan-Hammarstrom Q, Salzer U, Du L, Bjorkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL *et al.* Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat. Genet.* 2007; **39**: 429–430.
- 274 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**: 496–502.
- 275 Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B *et al.* Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **127**: 1360–7.e6.
- 276 Li J, Jørgensen SF, Maggadottir SM, Bakay M, Warnatz K, Glessner J *et al.* Association of CLEC16A with human common variable immunodeficiency disorder and role in murine B cells. *Nat Commun* 2015; **6**: 6804.
- 277 van Schouwenburg PA, Davenport EE, Kienzler A-K, Marwah I, Wright B, Lucas M *et al.* Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. *Clin Immunol* 2015; **160**: 301–314.
- 278 Rodriguez-Cortez VC, Del Pino-Molina L, Rodriguez-Ubrega J, Ciudad L, Gomez-Cabrero D, Company C *et al.* Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naive-to-memory B-cell transition. *Nat Commun* 2015; **6**: 7335.
- 279 Vlkova M, Thon V, Sarfyova M, Blaha L, Svobodnik A, Lokaj J *et al.* Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol* 2006; **143**: 373–379.
- 280 Piętosza B, Pac M, Siewiera K, Pietrucha B, Kludel-Dreszler M, Heropolitańska-Pliszka E *et al.* Common variable immune deficiency in children - Clinical characteristics varies depending on defect in peripheral B cell maturation. *J Clin Immunol* 2013; **33**: 731–741.
- 281 Al Kindi M, Mundy J, Sullivan T, Smith W, Kette F, Smith A *et al.* Utility of peripheral blood B cell subsets analysis in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2012; **167**: 275–281.
- 282 Lougaris V, Baronio M, Masneri S, Lorenzini T, Cattivelli K, Tampella G *et al.* Correlation of bone marrow abnormalities, peripheral lymphocyte subsets and clinical features in uncomplicated common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Immunol* 2016; **163**: 10–13.
- 283 Ochtrop MLG, Goldacker S, May AM, Rizzi M, Draeger R, Hauschke D *et al.* T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood* 2011; **118**: 309–318.
- 284 Driessen GJ, van Zelm MC, van Hagen PM, Hartwig NG, Trip M, Warris A *et al.* B-cell replication history and

- somatic hypermutation status identify distinct pathophysiologic backgrounds in common variable immunodeficiency. *Blood* 2011; **118**: 6814–6823.
- 285 Bogaert DJA, De Bruyne M, Debacker V, Depuydt P, De Preter K, Bonroy C *et al.* The immunophenotypic fingerprint of patients with primary antibody deficiencies is partially present in their asymptomatic first-degree relatives. *Haematologica* 2017; **102**: 192–202.
- 286 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**: 1544–1551.
- 287 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**: 385–400.
- 288 Alachkar H, Taubenheim N, Haeney MR, Durandy A, Arkwright PD. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2006; **120**: 310–318.
- 289 Detkova D, de Gracia J, Lopes-da-Silva S, Vendrell M, Alvarez A, Guarner L *et al.* Common variable immunodeficiency: association between memory B cells and lung diseases. *Chest* 2007; **131**: 1883–1889.
- 290 Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2005; **116**: 37–41.
- 291 van de Ven AAJM, van Montfrans JM. Clinical complications in pediatric CVID are not restricted to patients with severely reduced class-switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; **22**: 347–8.
- 292 Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; **21**: 852–858.
- 293 Moratto D, Gulino AV, Fontana S, Mori L, Pirovano S, Soresina A *et al.* Combined decrease of defined B and T cell subsets in a group of common variable immunodeficiency patients. *Clin Immunol* 2006; **121**: 203–214.
- 294 Yazdani R, Seify R, Ganjalikhani-Hakemi M, Abolhassani H, Eskandari N, Golsaz-Shirazi F *et al.* Comparison of various classifications for patients with common variable immunodeficiency (CVID) using measurement of B-cell subsets. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2017; **45**: 183–192.
- 295 Westh L, Mogensen TH, Dalgaard LS, Bernth Jensen JM, Katzenstein T, Hansen A-BE *et al.* Identification and Characterization of a Nationwide Danish Adult Common Variable Immunodeficiency Cohort. *Scand J Immunol* 2017; **85**: 450–461.
- 296 Boileau J, Mouillot G, Gerard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E *et al.* Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *J Autoimmun* 2011; **36**: 25–32.
- 297 Goldacker S, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J *et al.* Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* 2007; **124**: 294–303.
- 298 Unger S, Seidl M, Schmitt-Graeff A, Bohm J, Schrenk K, Wehr C *et al.* Ill-defined germinal centers and severely reduced plasma cells are histological hallmarks of lymphadenopathy in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2014; **34**: 615–626.
- 299 Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM *et al.* Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2007; **178**: 3932–3943.
- 300 Nechvatalova J, Pavlik T, Litzman J, Vlkova M. Terminally differentiated memory T cells are increased in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Cent J Immunol* 2017; **42**: 244–251.
- 301 Arumugakani G, Wood PMD, Carter CRD. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21lo B lymphocytes. *J Clin Immunol* 2010; **30**: 292–300.
- 302 Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevskaya A, Frede N *et al.* The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN-gamma-associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **141**: 730–740.

- 303 Ebbo M, Gerard L, Carpentier S, Vely F, Cypowyj S, Farnarier C *et al.* Low Circulating Natural Killer Cell Counts are Associated With Severe Disease in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *EBioMedicine* 2016; **6**: 222–230.
- 304 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**: 239–248.
- 305 Rösel AL, Scheibenbogen C, Schliesser U, Sollwedel A, Hoffmeister B, Hanitsch L *et al.* Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and a memory B-cell functionality assay. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**: 198–208.
- 306 Qamar N, Fuleihan RL. The hyper IgM syndromes. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; **46**: 120–130.
- 307 de la Morena MT. Clinical Phenotypes of Hyper-IgM Syndromes. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; **4**: 1023–1036.
- 308 Gardes P, Forveille M, Alyanakian M-A, Aucouturier P, Ilencikova D, Leroux D *et al.* Human MSH6 deficiency is associated with impaired antibody maturation. *J Immunol* 2012; **188**: 2023–2029.
- 309 Kracker S, Di Virgilio M, Schwartzentruber J, Cuenin C, Forveille M, Deau M-C *et al.* An inherited immunoglobulin class-switch recombination deficiency associated with a defect in the INO80 chromatin remodeling complex. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**: 998–1007.e6.
- 310 Ramirez-Alejo N, Alcantara-Montiel JC, Yamazaki-Nakashimada M, Duran-McKinster C, Valenzuela-Leon P, Rivas-Larrauri F *et al.* Novel hypomorphic mutation in IKBKG impairs NEMO-ubiquitylation causing ectodermal dysplasia, immunodeficiency, incontinentia pigmenti, and immune thrombocytopenic purpura. *Clin Immunol* 2015; **160**: 163–171.
- 311 Lopez-Granados E, Keenan JE, Kinney MC, Leo H, Jain N, Ma CA *et al.* A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Hum Mutat* 2008; **29**: 861–868.
- 312 Minegishi Y, Lavoie A, Cunningham-Rundles C, Bedard PM, Hebert J, Cote L *et al.* Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. *Clin Immunol* 2000; **97**: 203–210.
- 313 Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O *et al.* Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000; **102**: 565–575.
- 314 Imai K, Slupphaug G, Lee W-I, Revy P, Nonoyama S, Catalan N *et al.* Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1023–1028.
- 315 Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaum A, Soresina AR, Loubser M *et al.* Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 12614–12619.
- 316 Boisson B, Puel A, Picard C, Casanova J-L. Human I kappa B alpha Gain of Function: a Severe and Syndromic Immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2017; **37**: 397–412.
- 317 Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R *et al.* The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; **82**: 373–384.
- 318 Hanson EP, Monaco-Shawver L, Solt LA, Madge LA, Banerjee PP, May MJ *et al.* Hypomorphic nuclear factor-kappaB essential modulator mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**: 1169–1177.e16.
- 319 de la Morena MT, Leonard D, Torgerson TR, Cabral-Marques O, Slatter M, Aghamohammadi A *et al.* Long-term outcomes of 176 patients with X-linked hyper-IgM syndrome treated with or without hematopoietic cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**: 1282–1292.
- 320 Quartier P, Bustamante J, Sanal O, Plebani A, Debre M, Deville A *et al.* Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clin Immunol* 2004; **110**: 22–29.
- 321 Allewelt H, Martin PL, Szabolcs P, Chao N, Buckley R, Parikh S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for CD40 Ligand Deficiency: Single Institution Experience. *Pediatr Blood Cancer* 2015; **62**: 2216–2222.

- 322 Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwara M, Nagasawa M *et al.* Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**: 1018–1024.
- 323 Agematsu K, Nagumo H, Shinozaki K, Hokibara S, Yasui K, Terada K *et al.* Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest* 1998; **102**: 853–860.
- 324 van der Burg, M., Kalina T, Pérez-Andrés M, Vlkova M, López-Granados E. The EuroFlow approach to flow cytometry in patients with primary immunodeficiencies. *Prep* 2018.
- 325 Rockey JH, Hanson LA, Heremans JF, Kunkel HG. Beta-2A aglobulinemia in two healthy men. *J Lab Clin Med* 1964; **63**: 205–212.
- 326 Ammann AJ, Hong R. Selective IgA deficiency: presentation of 30 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1971; **50**: 223–236.
- 327 Ammann AJ, Hong R. Selective IgA deficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 1971; **284**: 985–986.
- 328 Yazdani R, Latif A, Tabassomi F, Abolhassani H, Azizi G, Rezaei N *et al.* Clinical phenotype classification for selective immunoglobulin A deficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; **11**: 1245–1254.
- 329 Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2001; **21**: 303–309.
- 330 Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C *et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014; **5**: 162.
- 331 Kanoh T, Mizumoto T, Yasuda N, Koya M, Ohno Y, Uchino H *et al.* Selective IgA deficiency in Japanese blood donors: frequency and statistical analysis. *Vox Sang* 1986; **50**: 81–86.
- 332 Wang N, Hammarstrom L. IgA deficiency: what is new? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; **12**: 602–608.
- 333 Pereira LF, Sapina AM, Arroyo J, Vinuelas J, Bardaji RM, Prieto L. Prevalence of selective IgA deficiency in Spain: more than we thought. *Blood*. 1997; **90**: 893.
- 334 Brandtzaeg P, Guy-Grand D, Griscelli C. Intestinal salivary, and tonsillar IgA and J-chain production in a patient with severe deficiency of serum IgA. *Scand J Immunol* 1981; **13**: 313–325.
- 335 Klemola T. Immunohistochemical findings in the intestine of IgA-deficient persons: number of intraepithelial T lymphocytes is increased. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988; **7**: 537–543.
- 336 Nilssen DE, Friman V, Theman K, Bjorkander J, Kilander A, Holmgren J *et al.* B-cell activation in duodenal mucosa after oral cholera vaccination in IgA deficient subjects with or without IgG subclass deficiency. *Scand J Immunol* 1993; **38**: 201–208.
- 337 Nilssen DE, Brandtzaeg P, Froland SS, Fausa O. Subclass composition and J-chain expression of the 'compensatory' gastrointestinal IgG cell population in selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 1992; **87**: 237–245.
- 338 Brandtzaeg P, Karlsson G, Hansson G, Petruson B, Bjorkander J, Hanson LA. Immunohistochemical study of nasal mucosa in patients with selective IgA deficiency. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; **82**: 483–484.
- 339 Brandtzaeg P, Karlsson G, Hansson G, Petruson B, Bjorkander J, Hanson LA. The clinical condition of IgA-deficient patients is related to the proportion of IgD- and IgM-producing cells in their nasal mucosa. *Clin Exp Immunol* 1987; **67**: 626–636.
- 340 Norhagen G, Engstrom PE, Hammarstrom L, Soder PO, Smith CI. Immunoglobulin levels in saliva in individuals with selective IgA deficiency: compensatory IgM secretion and its correlation with HLA and susceptibility to infections. *J Clin Immunol* 1989; **9**: 279–286.
- 341 Barros MD, Porto MH, Leser PG, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MM. Study of colostrum of a patient with selective IgA deficiency. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1985; **13**: 331–334.
- 342 Latiff AHA, Kerr MA. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Ann Clin Biochem* 2007; **44**: 131–139.
- 343 Edwards E, Razvi S, Cunningham-Rundles C. IgA deficiency: clinical correlates and responses to pneumococcal vaccine. *Clin Immunol* 2004; **111**: 93–97.

- 344 AYTEKIN C, TUYGUN N, GOKCE S, DOGU F, IKINCI GULLARI A. Selective IgA deficiency: clinical and laboratory features of 118 children in Turkey. *J Clin Immunol* 2012; **32**: 961–966.
- 345 SHKALIM V, MONSELIZE Y, SEGAL N, ZAN-BAR I, HOFFER V, GARTY BZ. Selective IgA deficiency in children in Israel. *J Clin Immunol* 2010; **30**: 761–765.
- 346 DOMINGUEZ O, GINER MT, ALSINA L, MARTIN MA, LOZANO J, PLAZA AM. [Clinical phenotypes associated with selective IgA deficiency: a review of 330 cases and a proposed follow-up protocol]. *An Pediatr (Barc)* 2012; **76**: 261–267.
- 347 GOMEZ-CARRASCO JA, BARRERA-GOMEZ MJ, GARCIA-MOURINO V, ALVAREZ DE MON M, GARCIA DE FRIAS E. Selective and partial IgA deficiency in an adolescent male with bronchiectasis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1994; **22**: 261–263.
- 348 CHIPPS BE, TALAMO RC, WINKELSTEIN JA. IgA deficiency, recurrent pneumonias, and bronchiectasis. *Chest* 1978; **73**: 519–526.
- 349 YEL L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2010; **30**: 10–16.
- 350 ZINNEMAN HH, KAPLAN AP. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Am J Dig Dis* 1972; **17**: 793–797.
- 351 LUDVIGSSON JF, NEOVIUS M, HAMMARSTROM L. Risk of Infections Among 2100 Individuals with IgA Deficiency: a Nationwide Cohort Study. *J Clin Immunol* 2016; **36**: 134–140.
- 352 AGHAMOHAMMADI A, CHERAGHI T, GHARAGOZLOU M, MOVAHEDI M, REZAEI N, YEGANEH M *et al.* IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. *J Clin Immunol* 2009; **29**: 130–136.
- 353 LUDVIGSSON JF, NEOVIUS M, HAMMARSTROM L. Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: a population-based matched cohort study. *J Clin Immunol* 2014; **34**: 444–451.
- 354 AGHAMOHAMMADI A, MOHAMMADI J, PARVANEH N, REZAEI N, MOIN M, ESPANOL T *et al.* Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; **147**: 87–92.
- 355 ESPANOL T, CATALA M, HERNANDEZ M, CARAGOL I, BERTRAN JM. Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; **80**: 333–335.
- 356 LITZMAN J, STIKAROVSKA D, PIKULOVA Z, PAVLIK T, PESAK S, THON V *et al.* Change in referral diagnoses and diagnostic delay in hypogammaglobulinaemic patients during 28 years in a single referral centre. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; **153**: 95–101.
- 357 VO NGOC DTL, KRIST L, VAN OVERVELD FJ, RIJKERS GT. The long and winding road to IgA deficiency: causes and consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; **13**: 371–382.
- 358 AGHAMOHAMMADI A, SEDIGHIPOUR L, SAEED SE, KOUHKAN A, HEYDARZADEH M, POURPAK Z. Alterations in humoral immunity in relatives of patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; **18**: 266–271.
- 359 SOLER-PALACÍN P, COBOS-CARRASCO E, MARTÍN-NALDA A, CARACSEGGI F, HERNÁNDEZ M, FIGUERAS-NADAL C. Is familial screening useful in selective immunoglobulin A deficiency? *An Pediatr (Barc)* 2016; **84**: 70–8.
- 360 KOISTINEN J. Familial clustering of selective IgA deficiency. *Vox Sang* 1976; **30**: 181–190.
- 361 OEN K, PETTY RE, SCHROEDER ML. Immunoglobulin A deficiency: genetic studies. *Tissue Antigens* 1982; **19**: 174–182.
- 362 KRALOVICOVA J, HAMMARSTROM L, PLEBANI A, WEBSTER ADB, VORECHOVSKY I. Fine-scale mapping at IGAD1 and genome-wide genetic linkage analysis implicate HLA-DQ/DR as a major susceptibility locus in selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2003; **170**: 2765–2775.
- 363 DE LA CONCHA EG, FERNANDEZ-ARQUERO M, GUAL L, VIGIL P, MARTINEZ A, URCELAY E *et al.* MHC susceptibility genes to IgA deficiency are located in different regions on different HLA haplotypes. *J Immunol* 2002; **169**: 4637–4643.
- 364 GUAL L, MARTINEZ A, FERNANDEZ-ARQUERO M, GARCIA-RODRIGUEZ MC, FERREIRA A, FONTAN G *et al.* Major histocompatibility complex haplotypes in Spanish immunoglobulin A deficiency patients: a comparative fine mapping microsatellite study. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 671–677.
- 365 FERREIRA RC, PAN-HAMMARSTROM Q, GRAHAM RR, FONTAN G, LEE AT, ORTMANN W *et al.* High-density SNP mapping

- of the HLA region identifies multiple independent susceptibility loci associated with selective IgA deficiency. *PLoS Genet* 2012; **8**: e1002476.
- 366 Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G *et al.* Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med* 2011; **17**: 1383–1396.
- 367 Bronson PG, Chang D, Bhangale T, Seldin MF, Ortmann W, Ferreira RC *et al.* Common variants at PVT1, ATG13-AMBRA1, AHI1 and CLEC16A are associated with selective IgA deficiency. *Nat Genet* 2016; **48**: 1425–1429.
- 368 Ferreira RC, Pan-Hammarstrom Q, Graham RR, Gateva V, Fontan G, Lee AT *et al.* Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat Genet* 2010; **42**: 777–780.
- 369 Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C, Specchia F, Spadaro G, Danieli MG *et al.* Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes. *J Immunol Res* 2016; **2016**: 8390356.
- 370 Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L *et al.* TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 2005; **37**: 829–834.
- 371 Abolhassani H, Aghamohammadi A, Hammarstrom L. Monogenic mutations associated with IgA deficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 2016; **12**: 1321–1335.
- 372 Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L *et al.* Reexamining the role of TAC1 coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet* 2007; **39**: 430–1.
- 373 Kato T, Crestani E, Kamae C, Honma K, Yokosuka T, Ikegawa T *et al.* RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2015; **35**: 280–288.
- 374 Azizi G, Abolhassani H, Habibi S, Rahamooz T, Mohammadi H, Jafarnejhad-Ansariha F *et al.* Two Faces of LRBA Deficiency in Siblings: Hypogammaglobulinemia and Normal Immunoglobulin Levels. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018; **28**: 48–50.
- 375 Litzman J, Vlkova M, Pikulova Z, Stikarovska D, Lokaj J. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 2007; **147**: 249–254.
- 376 Bukowska-Strakova K, Kowalczyk D, Baran J, Siedlar M, Kobylarz K, Zembala M. The B-cell compartment in the peripheral blood of children with different types of primary humoral immunodeficiency. *Pediatr Res* 2009; **66**: 28–34.
- 377 Cipe FE, Dogu F, Guloglu D, Aytakin C, Polat M, Biyikli Z *et al.* B-cell subsets in patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy, partial IgA deficiency, and selective IgM deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013; **23**: 94–100.
- 378 Nechvatalova J, Pikulova Z, Stikarovska D, Pesak S, Vlkova M, Litzman J. B-lymphocyte subpopulations in patients with selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2012; **32**: 441–448.
- 379 Aghamohammadi A, Abolhassani H, Biglari M, Abolmaali S, Moazzami K, Tabatabaeiyan M *et al.* Analysis of switched memory B cells in patients with IgA deficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; **156**: 462–468.
- 380 Marasco E, Farroni C, Cascioli S, Marcellini V, Scarsella M, Giorda E *et al.* B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subsets and identifies specific defects in immunodeficient patients. *Eur J Immunol* 2017; **47**: 131–143.
- 381 Bateman EAL, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A *et al.* T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol* 2012; **170**: 202–211.
- 382 Soheili H, Abolhassani H, Arandi N, Khazaei HA, Shahinpour S, Hirbod-Mobarakeh A *et al.* Evaluation of natural regulatory T cells in subjects with selective IgA deficiency: from senior idea to novel opportunities. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; **160**: 208–214.
- 383 Friman V, Hanson LA, Bridon JM, Tarkowski A, Banchereau J, Briere F. IL-10-driven immunoglobulin production by B lymphocytes from IgA-deficient individuals correlates to infection proneness. *Clin Exp Immunol* 1996; **104**: 432–438.
- 384 Schur PH, Borel H, Gelfand EW, Alper CA, Rosen FS. Selective gamma-g globulin deficiencies in patients with



- recurrent pyogenic infections. *N Engl J Med* 1970; **283**: 631–634.
- 385 Buckley RH. Immunoglobulin G subclass deficiency: fact or fancy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; **2**: 356–360.
- 386 Wahn V, von Bernuth H. IgG subclass deficiencies in children: Facts and fiction. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; **28**: 521–524.
- 387 Plebani A, Monafo V, Avanzini MA, Ugazio AG, Burgio GR. Relationship between IgA and IgG subclass deficiencies: a reappraisal. *Monogr Allergy* 1986; **20**: 171–178.
- 388 Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109**: 581–591.
- 389 Hammarstrom L, Smith CI. IgG subclasses in bacterial infections. *Monogr Allergy* 1986; **19**: 122–133.
- 390 Bass JL, Nuss R, Mehta KA, Morganelli P, Bennett L. Recurrent meningococemia associated with IgG2-subclass deficiency. *N. Engl. J. Med.* 1983; **309**: 430.
- 391 Hanson LA, Söderström R, Nilssen DE, Theman K, Björkander J, Söderström T *et al.* IgG subclass deficiency with or without IgA deficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **61**: S70-7.
- 392 Aucouturier P, Lacombe C, Bremard C, Lebranchu Y, Seligmann M, Griscelli C *et al.* Serum IgG subclass levels in patients with primary immunodeficiency syndromes or abnormal susceptibility to infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; **51**: 22–37.
- 393 Morgan G, Levinsky RJ. Clinical significance of IgG subclass deficiency. *Arch Dis Child* 1988; **63**: 771–773.
- 394 Sarmiento E, Mora R, Rodriguez-Mahou M, Rodriguez-Molina J, Fernandez-Cruz E, Carbone J. [Autoimmune disease in primary antibody deficiencies]. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2005; **33**: 69–73.
- 395 Barton JC, Bertoli LF, Barton JC. Comparisons of CVID and IgGSD: referring physicians, autoimmune conditions, pneumovax reactivity, immunoglobulin levels, blood lymphocyte subsets, and HLA-A and -B typing in 432 adult index patients. *J Immunol Res* 2014; **2014**: 542706.
- 396 Depiero A, Kaminski DA, Halsey JF, Briles D, Burrows PD, Hostoffer RW. Immunologic compensation in a patient with a large IgH constant region deletion. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **107**: 1051–1055.
- 397 Pan Q, Hammarstrom L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunol Rev* 2000; **178**: 99–110.
- 398 Stavnezer-Nordgren J, Kekish O, Zegers BJ. Molecular defects in a human immunoglobulin kappa chain deficiency. *Science* 1985; **230**: 458–461.
- 399 Bernier GM, Gunderman JR, Ruyman FB. Kappa-chain deficiency. *Blood* 1972; **40**: 795–805.
- 400 Zegers BJ, Maertzdorf WJ, Van Loghem E, Mul NA, Stoop JW, Van Der Laag J *et al.* Kappa-chain deficiency. An immunoglobulin disorder. *N Engl J Med* 1976; **294**: 1026–1030.
- 401 Wall LA, Dimitriades VR, Sorensen RU. Specific Antibody Deficiencies. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015; **35**: 659–670.
- 402 Stiehm ER. The four most common pediatric immunodeficiencies. *J Immunotoxicol* 2008; **5**: 227–234.
- 403 Tiller TLJ, Buckley RH. Transient hypogammaglobulinemia of infancy: review of the literature, clinical and immunologic features of 11 new cases, and long-term follow-up. *J Pediatr* 1978; **92**: 347–353.
- 404 Chovancova Z, Kralickova P, Pejchalova A, Bloomfield M, Nechvatalova J, Vlkova M *et al.* Selective IgM Deficiency: Clinical and Laboratory Features of 17 Patients and a Review of the Literature. *J Clin Immunol* 2017; **37**: 559–574.
- 405 Goldstein MF, Goldstein AL, Dunsky EH, Dvorin DJ, Belecanech GA, Shamir K. Selective IgM immunodeficiency: retrospective analysis of 36 adult patients with review of the literature. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; **97**: 717–730.
- 406 Freeman J a, Crassini KR, Best OG, Forsyth CJ, Mackinlay NJ, Han P *et al.* Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; **54**: 99–104.
- 407 Zhang H, Li P, Wu D, Xu D, Hou Y, Wang Q *et al.* Serum IgG subclasses in autoimmune diseases. *Medicine (Baltimore)* 2015; **94**: e387.
- 408 Manz RA, Radbruch A. Plasma cells for a lifetime? *Eur. J. Immunol.* 2002; **32**: 923–927.

- 409 Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dorner T. Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 162–169.
- 410 Vlkova M, Froňkova E, Kanderova V, Janda A, Ruzickova S, Litzman J *et al.* Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency (CVID) reveals novel subsets of human naïve B-cells marked by CD24 expression. *J Immunol* 2010; **in press**. doi:10.4049/jimmunol.0903876.
- 411 Mestecky J, Hamilton RG, Magnusson CGM, Jefferis R, Vaerman JP, Goodall M *et al.* Evaluation of monoclonal antibodies with specificity for human IgA, IgA subclasses and allotypes and secretory component. Results of an IUIS/WHO collaborative study. *J Immunol Methods* 1996; **193**: 103–148.
- 412 Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G, Ling NR, Lowe J *et al.* Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study. *Immunol Lett* 1985; **10**: 223–52.
- 413 Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL *et al.* Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol Lett* 1992; **31**: 143–68.
- 414 Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naïve B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* 2008; **181**: 1767–79.
- 415 He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J *et al.* Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A2 Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine APRIL. *Immunity* 2007; **26**: 812–826.
- 416 Lighaam LC, Vermeulen E, den Bleker T, Meijlink KJ, Aalberse RC, Barnes E *et al.* Phenotypic differences between IgG4+ and IgG1+ B cells point to distinct regulation of the IgG4 response. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**: 267–270.e6.
- 417 Reimer CB, Phillips DJ, Aloisio CH, Black CM, Wells TW. Specificity and association constants of 33 monoclonal antibodies to human IgA epitopes. *Immunol Lett* 1989; **21**: 209–215.
- 418 Reimer CB, Phillips DJ, Aloisio CH, Moore DD, Galland GG, Wells TW *et al.* Evaluation of Thirty-One Mouse Monoclonal Antibodies to Human IgG Epitopes. *Hybridoma* 1984; **3**: 263–275.
- 419 Hamilton RG, Morrison SL. Epitope mapping of human immunoglobulin-specific murine monoclonal antibodies with domain-switched, deleted and point-mutated chimeric antibodies. *J Immunol Methods* 1993; **158**: 107–122.
- 420 Harada S, Hata S, Kosada Y, Kondo E. Identification of epitopes recognized by a panel of six anti-human IgG2 monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1991; **141**: 89–96.
- 421 Partridge LJ, Lowe J, Hardie DL, Ling NR, Jefferis R. Immunogenic and antigenic epitopes of immunoglobulins. II. Antigenic differences between secreted and membrane IgG demonstrated using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; **128**: 1–6.
- 422 Haralambidou S, Melo J V, Catovsky D. Different reactivity of monoclonal antibodies against common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CD10). *J Clin Pathol* 1987; **40**: 490–493.
- 423 Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; **15**: 1–13.
- 424 Hodge TW, Sasso DR, McDougal JS. Humans with OKT4-epitope deficiency have a single nucleotide base change in the CD4 gene, resulting in substitution of TRP240 for ARG240. *Hum Immunol* 1991; **30**: 99–104.
- 425 Zapata DA, Pacheco-Castro A, Torres PS, Ramiro AR, San José E, Alarcón B *et al.* Conformational and biochemical differences in the TCR.CD3 complex of CD8(+) versus CD4(+) mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35119–28.
- 426 Leino L, Sorvajärvi K. CD11b is a calcium-dependent epitope in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 195–200.
- 427 van Dongen JJ, Krissansen GW, Wolvers-Tettero IL, Comans-Bitter WM, Adriaansen HJ, Hooijkaas H *et al.* Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood* 1988; **71**: 603–12.
- 428 Bellido M, Rubiol E, Ubeda J, Estivill C, Lopez O, Manteiga R *et al.* Rapid and simple immunophenotypic

- characterization of lymphocytes using a new test. *Haematologica* 1998; **83**: 681–685.
- 429 Tembhare P, Yuan CM, Xi L, Morris JC, Liewehr D, Venzon D *et al.* Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by Vbeta repertoire analysis: detection of T-cell clonality at diagnosis and monitoring of minimal residual disease following therapy. *Am J Clin Pathol* 2011; **135**: 890–900.
- 430 van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J *et al.* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; **26**: 1908–1975.
- 431 Gao B, Moore C, Porcheray F, Rong C, Abidoglu C, DeVito J *et al.* Pretransplant IgG reactivity to apoptotic cells correlates with late kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2014; **14**: 1581–1591.
- 432 Karnell JL, Dimasi N, Karnell FG, Fleming R, Kuta E, Wilson M *et al.* CD19 and CD32b differentially regulate human B cell responsiveness. *J Immunol* 2014; **192**: 1480–1490.
- 433 Buckley RH, Dees SC, O'Fallon WM. Serum immunoglobulins. I. Levels in normal children and in uncomplicated childhood allergy. *Pediatrics* 1968; **41**: 600–611.
- 434 Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Borte M, Schubert S, Riedel F *et al.* IgG Subclass Concentrations in Certified Reference Material 470 and Reference Values for Children and Adults Determined with the Binding Site Reagents. *Clin Chem* 2003; **49**: 1924–1929.
- 435 Blanchard Rohner G, Snape MD, Kelly DF, John T, Morant A, Yu L-M *et al.* The magnitude of the antibody and memory B cell responses during priming with a protein-polysaccharide conjugate vaccine in human infants is associated with the persistence of antibody and the intensity of booster response. *J Immunol* 2008; **180**: 2165–2173.
- 436 Moller G, Wigzell H. Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced suppression of 19S and 7S antibody response. *J Exp Med* 1965; **121**: 969–989.
- 437 Cerottini JC, McConahey PJ, Dixon FJ. The immunosuppressive effect of passively administered antibody IgG fragments. *J Immunol* 1969; **102**: 1008–1015.
- 438 Bergström JJE, Xu H, Heyman B. Epitope-Specific Suppression of IgG Responses by Passively Administered Specific IgG: Evidence of Epitope Masking. *Front Immunol* 2017; **8**: 238.
- 439 Criado I, Blanco E, Rodríguez-Caballero A, Alcoceba M, Contreras T, Gutiérrez ML, Romero A, Fernández-Navarro P, González M, Solano F, Gómez C, Pérez-Andrés M, van Dongen, JJM OA. Residual normal B-cell profiles in monoclonal B-cell lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2018; En prensa desde Mayo de 2018.
- 440 Sanoja-Flores L, Paiva B, Flores-Montero J, Puig N, Burgos L, García O, Prosper F, Merino J Vidriales MB, Mateos MV, García R, Palomera L, Rios R, Cañizo MC, Durie B, van Dongen JJM, San Miguel J OA. Next Generation Flow (NGF): A High Sensitive Technique to Detect Circulating Peripheral Blood (PB) Clonal Plasma Cells (cPC) in Patients with Newly Diagnosed of Plasma Cell Neoplasms (PCN). *Blood* 2015; **126**: 4180.
- 441 Hannoun C, Megas F, Piercy J. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res* 2004; **103**: 133–138.
- 442 Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 2006; **24**: 1159–1169.
- 443 Melegaro A, Edmunds WJ. The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Part II. A cost-effectiveness analysis for invasive disease in the elderly in England and Wales. *Eur J Epidemiol* 2004; **19**: 365–375.
- 444 Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstien B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1078–1084.
- 445 Westerga J, Timens W. Immunohistological analysis of human fetal lymph nodes. *Scand J Immunol* 1989; **29**: 103–112.
- 446 Griffioen AW, Rijkers GT, Janssens-Korpela P, Zegers BJM. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect Immun* 1991; **59**: 1839–1845.
- 447 Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagena T *et al.* Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 801–810.e6.
- 448 Halista SM, Johnson-Robbins LA, El-Mohandes AE, Lees A, Mond JJ, Katona IM. Characterization of early

- activation events in cord blood B cells after stimulation with T cell-independent activators. *Pediatr Res* 1998; **43**: 496–503.
- 449 Pedraz C, Lorente F, Pedraz MJ, Salazar Villalobos V. Development of the serum levels of complement during the first year of life. *An Esp Pediatr* 1980; **13**: 571–576.
- 450 Naradikian MS, Hao Y, Cancro MP. Age-associated B cells: Key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. *Immunol Rev* 2016; **269**: 118–129.
- 451 Wang Z, Yunis D, Irigoyen M, Kitchens B, Bottaro A, Alt F. Discordance between IgA switching at the DNA level and IgA expression at the mRNA level in IgA-deficient patients. *Clin Immunol* 1999; **91**: 263–270.
- 452 Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O *et al*. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2018; En prensa desde Marzo de 2018. doi:10.1016/j.jaci.2018.02.017.
- 453 Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW *et al*. Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1032–1043.
- 454 Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A *et al*. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* 2014; **20**: 1410–1416.
- 455 Fliegau M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon S-T, Lehnert K *et al*. Haploinsufficiency of the NF-kappaB1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2015; **97**: 389–403.
- 456 Leven EA, Maffucci P, Ochs HD, Scholl PR, Buckley RH, Fuleihan RL *et al*. Hyper IgM Syndrome: a Report from the USIDNET Registry. *J Clin Immunol* 2016; **36**: 490–501.
- 457 O’Gorman MR, Zaas D, Paniagua M, Corrochano V, Scholl PR, Pachman LM. Development of a rapid whole blood flow cytometry procedure for the diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome patients and carriers. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **85**: 172–181.
- 458 Lougaris V, Gallizzi R, Vitali M, Baronio M, Salpietro A, Bergbreiter A *et al*. A novel compound heterozygous TACI mutation in an autosomal recessive common variable immunodeficiency (CVID) family. *Hum Immunol* 2012; **73**: 836–839.
- 459 Martinez-Pomar N, Detkova D, Arostegui JI, Alvarez A, Soler-Palacin P, Vidaller A *et al*. Role of TNFRSF13B variants in patients with common variable immunodeficiency. *Blood*. 2009; **114**: 2846–2848.
- 460 Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejun MB, Martinez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 468–476.
- 461 Romberg N, Chamberlain N, Saadoun D, Gentile M, Kinnunen T, Ng YS *et al*. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *J Clin Invest* 2013; **123**: 4283–4293.
- 462 Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, Bergbreiter A, Du L, Lu J *et al*. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2009; **29**: 777–785.
- 463 Almejun MB, Cols M, Zelazko M, Oleastro M, Cerutti A, Oppezzo P *et al*. Naturally occurring mutation affecting the MyD88-binding site of TNFRSF13B impairs triggering of class switch recombination. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 805–814.
- 464 Sathkumara HD, De Silva NR, Handunnetti S, De Silva AD. Genetics of common variable immunodeficiency: role of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor. *Int J Immunogenet* 2015; **42**: 239–253.
- 465 Kutukculer N, Gulez N, Karaca NE, Aksu G, Berdeli A. Three different classifications, B lymphocyte subpopulations, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF-R), TNFSF13 (APRIL) gene mutations, CTLA-4 and ICOS gene polymorphisms in Turkish patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012; **32**: 1165–1179.
- 466 Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, 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**: 820–828.
- 467 Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarstrom Q, Jennings S, Lougaris V *et al*. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B

- variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009; **113**: 1967–1976.
- 468 Germinaro M, Reynolds P, Knight V, Alam R. Association of B-cell activating factor receptor deficiency with the P21R polymorphism and common variable immunodeficiency. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 2015; **115**: 82–83.
- 469 Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Bohm J *et al.* B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 13945–13950.
- 470 Lougaris V, Baronio M, Moratto D, Cardinale F, Plebani A. Monoallelic BAFFR P21R/H159Y Mutations and Familial Primary Antibody Deficiencies. *J. Clin. Immunol.* 2016; **36**: 1–3.
- 471 Pieper K, Rizzi M, Speletas M, Smulski CR, Sic H, Kraus H *et al.* A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; **133**: 1222–1225.
- 472 Wang H-Y, Ma CA, Zhao Y, Fan X, Zhou Q, Edmonds P *et al.* Antibody deficiency associated with an inherited autosomal dominant mutation in TWEAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 5127–5132.
- 473 Maffucci P, Filion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova J-L *et al.* Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol* 2016; **7**: 220.
- 474 Lougaris V, Moratto D, Baronio M, Tampella G, van der Meer JWM, Badolato R *et al.* Early and late B-cell developmental impairment in nuclear factor kappa B, subunit 1-mutated common variable immunodeficiency disease. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**: 349–352.e1.
- 475 Kaustio M, Haapaniemi E, Goos H, Hautala T, Park G, Syrjanen J *et al.* Damaging heterozygous mutations in NFKB1 lead to diverse immunologic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **140**: 782–796.
- 476 Schipp C, Nabhani S, Bienemann K, Simanovsky N, Kfir-Erenfeld S, Assayag-Asherie N *et al.* Specific antibody deficiency and autoinflammatory disease extend the clinical and immunological spectrum of heterozygous NFKB1 loss-of-function mutations in humans. *Haematologica* 2016; **101**: e392–e396.
- 477 Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, Lakatos K, Kager L, Trapin D *et al.* NF-kappaB1 Haploinsufficiency Causing Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J Clin Immunol* 2016; **36**: 533–540.
- 478 Kuehn HS, Niemela JE, Sreedhara K, Stoddard JL, Grossman J, Wysocki CA *et al.* Novel nonsense gain-of-function NFKB2 mutations associated with a combined immunodeficiency phenotype. *Blood* 2017; **130**: 1553–1564.
- 479 Lal RA, Bachrach LK, Hoffman AR, Inlora J, Rego S, Snyder MP *et al.* A Case Report of Hypoglycemia and Hypogammaglobulinemia: DAVID Syndrome in a Patient With a Novel NFKB2 Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; **102**: 2127–2130.
- 480 Shi C, Wang F, Tong A, Zhang X-Q, Song H-M, Liu Z-Y *et al.* NFKB2 mutation in common variable immunodeficiency and isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency: A case report and review of literature. *Medicine (Baltimore)* 2016; **95**: e5081.
- 481 Lee CE, Fulcher DA, Whittle B, Chand R, Fewings N, Field M *et al.* Autosomal-dominant B-cell deficiency with alopecia due to a mutation in NFKB2 that results in nonprocessable p100. *Blood* 2014; **124**: 2964–2972.
- 482 Liu Y, Hanson S, Gurugama P, Jones A, Clark B, Ibrahim MAA. Novel NFKB2 mutation in early-onset CVID. *J Clin Immunol* 2014; **34**: 686–690.
- 483 Brue T, Quentien M-H, Khetchoumian K, Bensa M, Capo-Chichi J-M, Delemer B *et al.* Mutations in NFKB2 and potential genetic heterogeneity in patients with DAVID syndrome, having variable endocrine and immune deficiencies. *BMC Med Genet* 2014; **15**: 139.
- 484 Lindsley AW, Qian Y, Valencia CA, Shah K, Zhang K, Assa'ad A. Combined immune deficiency in a patient with a novel NFKB2 mutation. *J Clin Immunol* 2014; **34**: 910–915.
- 485 Chen K, Coonrod EM, Kumanovics A, Franks ZF, Durtschi JD, Margraf RL *et al.* Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF-kappaB pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2013; **93**: 812–824.
- 486 Lougaris V, Tabellini G, Vitali M, Baronio M, Patrizi O, Tampella G *et al.* Defective natural killer-cell cytotoxic activity in NFKB2-mutated CVID-like disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**: 1641–1643.

- 487 Carpiert J-M, Lucas CL. Epstein-Barr Virus Susceptibility in Activated PI3K $\delta$  Syndrome (APDS) Immunodeficiency. *Front Immunol* 2017; **8**: 2005.
- 488 Maccari ME, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Aiuti A, Aleinikova O, Bangs C *et al.* Disease Evolution and Response to Rapamycin in Activated Phosphoinositide 3-Kinase delta Syndrome: The European Society for Immunodeficiencies-Activated Phosphoinositide 3-Kinase delta Syndrome Registry. *Front Immunol* 2018; **9**: 543.
- 489 Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Screaton N *et al.* Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome: A large patient cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**: 597–606.e4.
- 490 Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L *et al.* Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**: 210–218.e9.
- 491 Kanegane H, Agematsu K, Futatani T, Sira MM, Suga K, Sekiguchi T *et al.* Novel mutations in a Japanese patient with CD19 deficiency. *Genes Immun* 2007; **8**: 663–670.
- 492 Vince N, Boutboul D, Mouillot G, Just N, Peralta M, Casanova J-L *et al.* Defects in the CD19 complex predispose to glomerulonephritis, as well as IgG1 subclass deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; **127**: 535–538.
- 493 van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJM, van Tol MJD *et al.* An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006; **354**: 1901–1912.
- 494 van Zelm MC, Smet J, van der Burg M, Ferster A, Le PQ, Schandene L *et al.* Antibody deficiency due to a missense mutation in CD19 demonstrates the importance of the conserved tryptophan 41 in immunoglobulin superfamily domain formation. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 1854–1863.
- 495 Skendros P, Rondeau S, Chateil J-F, Bui S, Bocly V, Moreau J-F *et al.* Misdiagnosed CD19 deficiency leads to severe lung disease. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; **25**: 603–6.
- 496 Wentink MWJ, Lambeck AJA, van Zelm MC, Simons E, van Dongen JJM, IJspeert H *et al.* CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clin Immunol* 2015; **161**: 120–127.
- 497 Vences-Catalan F, Kuo C-C, Sagi Y, Chen H, Kela-Madar N, van Zelm MC *et al.* A mutation in the human tetraspanin CD81 gene is expressed as a truncated protein but does not enable CD19 maturation and cell surface expression. *J Clin Immunol* 2015; **35**: 254–263.
- 498 Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM *et al.* CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 2010; **120**: 214–222.
- 499 Capitani N, Ariani F, Amedei A, Pezzicoli A, Matucci A, Vultaggio A *et al.* Vav1 haploinsufficiency in a common variable immunodeficiency patient with defective T-cell function. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; **25**: 811–817.
- 500 Alkhairy OK, Rezaei N, Graham RR, Abolhassani H, Borte S, Hultenby K *et al.* RAC2 loss-of-function mutation in 2 siblings with characteristics of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**: 1380–1384–5.
- 501 Compeer EB, Janssen W, van Royen-Kerkhof A, van Gijn M, van Montfrans JM, Boes M. Dysfunctional BLK in common variable immunodeficiency perturbs B-cell proliferation and ability to elicit antigen-specific CD4+ T-cell help. *Oncotarget* 2015; **6**: 10759–10771.
- 502 Keller MD, Pandey R, Li D, Glessner J, Tian L, Henrickson SE *et al.* Mutation in IRF2BP2 is responsible for a familial form of common variable immunodeficiency disorder. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**: 544–550.e4.
- 503 Jansen EJR, Timal S, Ryan M, Ashikov A, van Scherpenzeel M, Graham LA *et al.* ATP6AP1 deficiency causes an immunodeficiency with hepatopathy, cognitive impairment and abnormal protein glycosylation. *Nat Commun* 2016; **7**: 11600.
- 504 Chakraborty PK, Schmitz-Abe K, Kennedy EK, Mamady H, Naas T, Durie D *et al.* Mutations in TRNT1 cause congenital sideroblastic anemia with immunodeficiency, fevers, and developmental delay (SIFD). *Blood* 2014; **124**: 2867–2871.
- 505 Lougaris V, Chou J, Baronio M, Gazzurelli L, Lorenzini T, Soresina A *et al.* Novel biallelic TRNT1 mutations

- resulting in sideroblastic anemia, combined B and T cell defects, hypogammaglobulinemia, recurrent infections, hypertrophic cardiomyopathy and developmental delay. *Clin. Immunol.* 2018; **188**: 20–22.
- 506 Wedatilake Y, Niazi R, Fassone E, Powell CA, Pearce S, Plagnol V *et al.* TRNT1 deficiency: clinical, biochemical and molecular genetic features. *Orphanet J Rare Dis* 2016; **11**: 90.
- 507 Barton C, Kausar S, Kerr D, Bitetti S, Wynn R. SIFD as a novel cause of severe fetal hydrops and neonatal anaemia with iron loading and marked extramedullary haemopoiesis. *J Clin Pathol* 2018; **71**: 275–278.
- 508 Hull S, Malik ANJ, Arno G, Mackay DS, Plagnol V, Michaelides M *et al.* Expanding the Phenotype of TRNT1-Related Immunodeficiency to Include Childhood Cataract and Inner Retinal Dysfunction. *JAMA Ophthalmol* 2016; **134**: 1049–1053.
- 509 Bourgeois P, Esteve C, Chaix C, Bérout C, Lévy N, THES clinical consortium *et al.* Tricho-Hepato-Enteric Syndrome mutation update: Mutations spectrum of TTC37 and SKIV2L, clinical analysis and future prospects. *Hum Mutat* 2018; En prensa desde Marzo de 2018. doi:10.1002/humu.23418.
- 510 Schubert D, Klein M-C, Hassdenteufel S, Caballero-Oteyza A, Yang L, Proietti M *et al.* Plasma cell deficiency in human subjects with heterozygous mutations in Sec61 translocon alpha 1 subunit (SEC61A1). *J Allergy Clin Immunol* 2018; **141**: 1427–1438.
- 511 Salzer E, Santos-Valente E, Klaver S, Ban SA, Emminger W, Prengemann NK *et al.* B-cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C delta. *Blood* 2013; **121**: 3112–3116.
- 512 Kiykim A, Ogulur I, Baris S, Salzer E, Karakoc-Aydiner E, Ozen AO *et al.* Potentially Beneficial Effect of Hydroxychloroquine in a Patient with a Novel Mutation in Protein Kinase Cdelta Deficiency. *J Clin Immunol* 2015; **35**: 523–526.
- 513 Belot A, Kasher PR, Trotter EW, Foray A-P, Debaud A-L, Rice GI *et al.* Protein kinase cdelta deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis Rheum* 2013; **65**: 2161–2171.
- 514 Kuehn HS, Niemela JE, Rangel-Santos A, Zhang M, Pittaluga S, Stoddard JL *et al.* Loss-of-function of the protein kinase C delta (PKCdelta) causes a B-cell lymphoproliferative syndrome in humans. *Blood* 2013; **121**: 3117–3125.
- 515 Zhou Q, Lee G-S, Brady J, Datta S, Katan M, Sheikh A *et al.* A hypermorphic missense mutation in PLCG2, encoding phospholipase Cgamma2, causes a dominantly inherited autoinflammatory disease with immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2012; **91**: 713–720.
- 516 Ombrello MJ, Remmers EF, Sun G, Freeman AF, Datta S, Torabi-Parizi P *et al.* Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions. *N Engl J Med* 2012; **366**: 330–338.
- 517 Kucuk ZY, Charbonnier L-M, McMasters RL, Chatila T, Blessing JJ. CTLA-4 haploinsufficiency in a patient with an autoimmune lymphoproliferative disorder. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **140**: 862–864.e4.
- 518 Slatter MA, Engelhardt KR, Burroughs LM, Arkwright PD, Nademi Z, Skoda-Smith S *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for CTLA4 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**: 615–619.e1.
- 519 Navarini AA, Hruz P, Berger CT, Hou TZ, Schwab C, Gabrysch A *et al.* Vedolizumab as a successful treatment of CTLA-4-associated autoimmune enterocolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**: 1043–1046.e5.
- 520 Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K *et al.* A Patient with CTLA-4 Haploinsufficiency Presenting Gastric Cancer. *J Clin Immunol* 2016; **36**: 28–32.
- 521 Zeissig S, Petersen B-S, Tomczak M, Melum E, Huc-Claustre E, Dougan SK *et al.* Early-onset Crohn's disease and autoimmunity associated with a variant in CTLA-4. *Gut* 2015; **64**: 1889–1897.
- 522 Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT *et al.* Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 2014; **345**: 1623–1627.
- 523 Hou TZ, Olbrich P, Soto JML, Sanchez B, Moreno PS, Borte S *et al.* Study of an extended family with CTLA-4 deficiency suggests a CD28/CTLA-4 independent mechanism responsible for differences in disease manifestations and severity. *Clin Immunol* 2018; **188**: 94–102.
- 524 Schwab C, Gabrysch A, Olbrich P, Patiño V, Warnatz K, Wolff D *et al.* Phenotype, penetrance, and treatment of 133 CTLA-4-insufficient individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2018; En prensa desde Mayo de 2018. doi:10.1016/j.jaci.2018.02.055.

- 525 Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K *et al.* Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet* 2012; **90**: 986–1001.
- 526 Alangari A, Alsultan A, Adly N, Massaad MJ, Kiani IS, Aljebreen A *et al.* LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **130**: 481–488.e2.
- 527 Charbonnier L-M, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT *et al.* Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**: 217–227.
- 528 Gamez-Diaz L, August D, Stepensky P, Revel-Vilk S, Seidel MG, Noriko M *et al.* The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**: 223–230.
- 529 Alroqi FJ, Charbonnier L-M, Baris S, Kiykim A, Chou J, Platt CD *et al.* Exaggerated follicular helper T-cell responses in patients with LRBA deficiency caused by failure of CTLA4-mediated regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **141**: 1050–1059.e10.
- 530 Seidel MG, Hirschmugl T, Gamez-Diaz L, Schwinger W, Serwas N, Deutschmann A *et al.* Long-term remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; **135**: 1384–1388.
- 531 Kostel Bal S, Haskologlu S, Serwas NK, Islamoglu C, Aytekin C, Kendirli T *et al.* Multiple Presentations of LRBA Deficiency: a Single-Center Experience. *J Clin Immunol* 2017; **37**: 790–800.
- 532 Serwas NK, Kansu A, Santos-Valente E, Kuloglu Z, Demir A, Yaman A *et al.* Atypical manifestation of LRBA deficiency with predominant IBD-like phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2015; **21**: 40–47.
- 533 Bakhtiar S, Gamez-Diaz L, Jarisch A, Soerensen J, Grimbacher B, Belohradsky B *et al.* Treatment of Infantile Inflammatory Bowel Disease and Autoimmunity by Allogeneic Stem Cell Transplantation in LPS-Responsive Beige-Like Anchor Deficiency. *Front Immunol* 2017; **8**: 52.
- 534 Sari S, Dogu F, Hwa V, Haskologlu S, Dauber A, Rosenfeld R *et al.* A Successful HSCT in a Girl with Novel LRBA Mutation with Refractory Celiac Disease. *J. Clin. Immunol.* 2016; **36**: 8–11.
- 535 Alkhairy OK, Abolhassani H, Rezaei N, Fang M, Andersen KK, Chavoshzadeh Z *et al.* Spectrum of Phenotypes Associated with Mutations in LRBA. *J Clin Immunol* 2016; **36**: 33–45.
- 536 Revel-Vilk S, Fischer U, Keller B, Nabhani S, Gamez-Diaz L, Rensing-Ehl A *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease in patients with LRBA mutation. *Clin Immunol* 2015; **159**: 84–92.
- 537 Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C *et al.* AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* 2015; **349**: 436–40.
- 538 Schreiner F, Plamper M, Dueker G, Schoenberger S, Gamez-Diaz L, Grimbacher B *et al.* Infancy-Onset T1DM, Short Stature, and Severe Immunodysregulation in Two Siblings With a Homozygous LRBA Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; **101**: 898–904.
- 539 Chou J, Massaad MJ, Cangemi B, Bainter W, Platt C, Badran YR *et al.* A novel mutation in ICOS presenting as hypogammaglobulinemia with susceptibility to opportunistic pathogens. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**: 794–797.e1.
- 540 Robertson N, Engelhardt KR, Morgan N V, Barge D, Cant AJ, Hughes SM *et al.* Astute Clinician Report: A Novel 10 bp Frameshift Deletion in Exon 2 of ICOS Causes a Combined Immunodeficiency Associated with an Enteritis and Hepatitis. *J Clin Immunol* 2015; **35**: 598–603.
- 541 Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T *et al.* Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 2009; **182**: 5515–5527.
- 542 Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J *et al.* ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2004; **113**: 234–240.
- 543 Schepp J, Chou J, Skrabl-Baumgartner A, Arkwright PD, Engelhardt KR, Hambleton S *et al.* 14 Years after Discovery: Clinical Follow-up on 15 Patients with Inducible Co-Stimulator Deficiency. *Front Immunol* 2017; **8**: 964.



- 544 van Montfrans JM, Hoepelman AIM, Otto S, van Gijn M, van de Corput L, de Weger RA *et al.* CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 787–793.e6.
- 545 Alkhairy OK, Perez-Becker R, Driessen GJ, Abolhassani H, van Montfrans J, Borte S *et al.* Novel mutations in TNFRSF7/CD27: Clinical, immunologic, and genetic characterization of human CD27 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**: 703–712.e10.
- 546 Salzer E, Daschkey S, Choo S, Gombert M, Santos-Valente E, Ginzel S *et al.* Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica* 2013; **98**: 473–478.
- 547 Kotlarz D, Zietara N, Milner JD, Klein C. Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr* 2014; **26**: 704–712.
- 548 Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J *et al.* Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* 2013; **210**: 433–443.
- 549 Stepensky P, Keller B, Abuzaitoun O, Shaag A, Yaacov B, Unger S *et al.* Extending the clinical and immunological phenotype of human interleukin-21 receptor deficiency. *Haematologica* 2015; **100**: e72-76.
- 550 Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, Salzer E, Cagdas D, Esenboga S *et al.* Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R. *Haematologica*. 2015; **100**: e216-219.
- 551 Salzer E, Kansu A, Sic H, Majek P, Ikinciogullari A, Dogu FE *et al.* Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**: 1651–1659.e12.
- 552 Milner JD, Vogel TP, Forbes L, Ma CA, Stray-Pedersen A, Niemela JE *et al.* Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* 2015; **125**: 591–599.
- 553 Haapaniemi EM, Kaustio M, Rajala HLM, van Adrichem AJ, Kainulainen L, Glumoff V *et al.* Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. *Blood* 2015; **125**: 639–648.
- 554 Russell MA, Pigors M, Houssen ME, Manson A, Kelsell D, Longhurst H *et al.* A novel de novo activating mutation in STAT3 identified in a patient with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* 2018; **187**: 132–136.
- 555 Buchbinder D, Baker R, Lee YN, Ravell J, Zhang Y, McElwee J *et al.* Identification of patients with RAG mutations previously diagnosed with common variable immunodeficiency disorders. *J Clin Immunol* 2015; **35**: 119–124.