



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ANÁLISIS DE REORDENAMIENTOS DEL RECEPTOR DE
ANTÍGENO (TCR Y BCR) EN UN GRUPO DE PACIENTES
CON INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS**

Nicolas Villamizar Rivera

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Morfología

Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2018

ANÁLISIS DE REORDENAMIENTOS DEL RECEPTOR DE ANTÍGENO (TCR Y BCR) EN UN GRUPO DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Nicolas Villamizar Rivera

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Directora:

Ph.D., MD., Natalia Olaya Morales

Codirectoras:

MSc., Ph.D., Claudia Milena Trujillo

MSc., MD., Clara Arteaga

Línea de Investigación:

Inmunodeficiencias primarias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Morfología

Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2018

A mi familia, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, ser la guía en toda mi educación y formación, por su apoyo incondicional a lo largo del tiempo. A mis amigos y las personas que estuvieron conmigo en este largo proceso

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Agradecimientos

A mi tutora Dra. Natalia Olaya Morales por su paciencia, su acompañamiento durante todo mi proceso de formación, por depositar su confianza en mí y apoyarme en el largo camino de aprendizaje.

A la Dra. Claudia Trujillo, y todo el grupo de Inmunodeficiencias primarias de la Universidad de Antioquia por apoyarme y permitirme realizar el trabajo en colaboración con ellos.

A Jesús Armando Álvarez por su ayuda en el análisis de datos citométricos y el apoyo con la obtención de las muestras.

A los profesores de la Maestría en Genética Humana de la Universidad Nacional por su formación y su compañía durante este proceso

A mi mamá Carmenza Rivera por su apoyo y compañía durante toda mi vida, estar incondicionalmente en cada una de las etapas de mi vida y cuya compañía inspiró siempre el desarrollo del trabajo. A mi hermana Daniela Villamizar por su carisma, su compañía y paciencia en los momentos más difíciles y todo el cariño que me brindó. A mi tía Helena Rivera por sus enseñanzas, su acompañamiento y todo el apoyo recibido en estos años. A todos los miembros de mi familia por su ayuda incondicional.

A los pacientes y sus familias.

A todos mis amigos por estar siempre apoyándome y sacando una sonrisa.

A todos Gracias!.

Resumen

Los reordenamientos del receptor de antígeno son un proceso fisiológico que ocurre de manera secuencial durante la ontogénesis de los linfocitos. El análisis de estos reordenamientos se utiliza en el diagnóstico clínico para determinar si una proliferación linfoide es clonal o no, lo cual, en general, quiere decir si es maligna o no. Los métodos de análisis han cambiado a lo largo del tiempo y actualmente se evalúan mediante PCR y secuenciación.

Hay un modelo natural que podría servir para estudiar la linfomagénesis, que son las inmunodeficiencias. Las inmunodeficiencias primarias en su mayoría son genéticas, algunas con patrones de herencia mendelianos y se clasifican en celulares y humorales. En general, son poco frecuentes, pero en muchas de ellas hay alteraciones en el número y la función linfocitaria; las inmunodeficiencias secundarias son generadas por factores externos.

En general, los procesos de reordenamiento de receptor de antígeno en situaciones patológicas, con excepción de las leucemias y linfomas, se desconocen. Con el fin de explorar este mecanismo biológico en inmunodeficiencias primarias con alteración de la función linfocitaria, utilizamos los protocolos de análisis de reordenamientos en un grupo de pacientes con inmunodeficiencia común variable y deficiencia de IgA.

De acuerdo con nuestros resultados, la distribución de reordenamientos de los linfocitos en numerosos pacientes no es la esperada en una persona sana. Se encuentra alterada y se parece más a la distribución de los reordenamientos en linfomas que a la curva de Gauss de la población linfocitaria normal. Inclusive podría considerarse que existe una categoría intermedia entre distribución normal y distribución propia de las proliferaciones clonales. Esta categoría especial se correlaciona con algunos grupos de células evaluadas por citometría de flujo como los linfocitos B sin cambio de isotipo (CD19+, CD27+, IgM-, IgD-), con cambio de isotipo (CD19+, CD27+, IgM-, IgD+), linfocitos T CD4+ vírgenes (CD4+, CD3hi, TCR α/β hi) y CD4+ de memoria efectora (CD4+, CD3, TCR α/β hi, CXCR3+, CD62L-, CCR7-).

Por otra parte, las alteraciones de reordenamientos parecen correlacionarse con manifestaciones clínicas como alergias, enfermedades gastrointestinales, del sistema endocrino, alteraciones en la piel y mucosas e infecciones profundas.

En conclusión, en estos pacientes la evaluación de reordenamientos de receptor de antígeno podría utilizarse para el seguimiento a largo plazo de pacientes. Con el fin de complementar y confirmar estos resultados, sería aconsejable realizar nuevos estudios con series más grandes y prospectivo, de manera que pudieran aislarse poblaciones específicas de células linfoides para su caracterización.

Palabras clave: Clonalidad, reordenamiento, Receptor de antígeno, inmunodeficiencias primarias

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XV
1. Capítulo 1: Marco teórico	1
1.1 Ontogenia e inmunofenotipo de los linfocitos	1
1.2 Genes del receptor de antígeno	4
1.2.1 Inmunoglobulinas.....	4
1.2.2 Receptor de linfocitos T (TCR).....	5
1.3 Reordenamiento del gen y generación del repertorio	8
1.4 Evaluación de los reordenamientos en tejidos.....	11
1.5 Inmunodeficiencias Primarias.....	13
1.5.1 Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia	15
1.5.2 Agammaglobulinemia Ligada al X.....	18
1.5.3 Inmunodeficiencia común variable (IDCV)	19
1.5.4 Deficiencia selectiva de IgA (DslgA)	19
1.6 Inmunodeficiencias primarias y cáncer.....	20
1.7 OBJETIVOS	24
1.7.1 Objetivo General.....	24
1.7.2 Objetivos Específicos.....	24
2. Capítulo 2: Metodología.....	25
2.1 Tipo de estudio.....	25
2.2 Recolección de casos	25
2.2.1 Fase 1	25
2.2.2 Fase 2	25
2.2.3 Fase 3	26
2.2.4 Criterios diagnósticos de las enfermedades.....	27
2.3 Citometría de Flujo.....	28
2.4 Fuente de Datos.....	28
2.5 Descripción de las variables	28
2.6 Recepción de muestras.....	30
2.7 Preparación de las muestras.....	30
2.7.1 Médula ósea y Sangre.....	30
2.7.2 Tejido Fijado en Formalina y Embebido en Parafina (FFEP).....	31
2.7.3 Extracción de ADN	31
2.8 PCR multiplex	32
2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida	33
2.10 Análisis de fragmentos	34
2.11 Interpretación de los resultados.....	34
2.12 Plan de análisis estadístico	35

2.13	Consideraciones éticas.....	35
3.	Capítulo 3: Resultados	37
3.1	Fase 1.....	37
3.2	Fase 2.....	37
3.2.1	Proliferaciones de células T.....	40
3.2.2	Proliferaciones de células B	40
3.3	Fase 3.....	42
4.	Discusión.....	59
5.	Conclusiones y recomendaciones	65
5.1	Conclusiones	65
5.2	Recomendaciones	66

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Desarrollo de los linfocitos humanos e inmunofenotipo en las diferentes etapas.	2
Figura 2. Locus de los genes del receptor de antígeno.....	6
Figura 3. Estructura germinal de las cadenas del receptor de antígeno.....	7
Figura 4. Proceso de recombinación de los genes del receptor del antígeno.....	10
Figura 5. Desarrollo general de los linfocitos y principales inmunodeficiencias primarias implicadas.....	15
Figura 6. Ejemplos de resultados de clonalidad.....	38
Figura 7. Distribución del tipo de tejido y el diagnóstico general de las proliferaciones estudiadas.....	39
Figura 8. Análisis de las subpoblaciones de linfocitos.....	50
Figura 9. Perfil Irregular.....	52
Figura 10. Distribución del perfil irregular de un paciente con IDCV.....	53
Figura 11. Reordenamientos de los pacientes con IDP estudiadas.....	55
Figura 12. Posibles condiciones de reordenamientos en la maduración normal de los linfocitos y posible manera de cómo se forman los perfiles irregulares.....	63

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Frecuencia relativa de subpoblaciones de linfocitos en sangre y tejidos linfoides	3
Tabla 2. Principales inmunodeficiencias y genes involucrados.....	16
Tabla 3. Niveles de Ig secretada y recuento de células B en las IDP estudiadas.....	20
Tabla 4. Variables del estudio.....	28
Tabla 5. Grupos de reordenamientos estudiados y tamaño esperado en pares de bases.....	32
Tabla 6. Distribución de los diagnósticos finales de cada uno de los casos recibidos.....	41
Tabla 7. Datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes.....	42
Tabla 8. Síntomas de los pacientes agrupados por diagnóstico de cada inmunodeficiencia primaria.....	45
Tabla 9. Correlación de Fisher.....	57

Lista de Símbolos y abreviaturas

IgA: Inmunoglobulina A

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

IDP: Inmunodeficiencias Primarias

IDS: Inmunodeficiencias Secundarias

IDCV: Inmunodeficiencia Común Variable

DslgA: Deficiencia Selectiva de IgA

HGI: Hipogammaglobulinemia de la infancia

ALX: Agammaglobulinemia ligada al X

TCR: Receptor de linfocitos T

TCR α : Cadena alfa del receptor de linfocitos T

TCR β : Cadena beta del receptor de linfocitos T

TCR γ : Cadena gamma del receptor de linfocitos T

TCR δ : Cadena delta del receptor de linfocitos T

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

EBV: Epstein-Barr virus

LNH: Linfoma No-Hodgkin

PFTK1: Protein Kinasa Serina/Treonina PFTAIRE-1

ORC4: Subunidad 4 del complejo de reconocimiento del origen

ESID: Sociedad Europea para las inmunodeficiencias

CLP: Célula Linfoide Pluripotente

CNK: Célula NK

CProT: Célula Pro-T

CPreT, Célula Pre-T

CDP: Célula Doble Positiva

CD8+: Célula CD8+

CD4+: Célula CD4+

CTc: Célula T citotóxica

Cth: Célula T helper (ayudadora)

CProB: Célula Pro-B

CPreB1: Célula PreB1

CPreB2: Célula PreB1

CBI: Célula B inmadura

CBM: Célula B Madura

CB: Célula B

CBMe: Célula B de memoria

CP: Célula plasmática.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

1. Capítulo 1: Marco teórico

En este marco teórico se revisarán los temas más relevantes para la comprensión de este proyecto: la ontogenia de linfocitos, los reordenamientos del receptor de antígeno, la generación de clonalidad y las inmunodeficiencias primarias, haciendo énfasis en su relación con el desarrollo de linfomas y leucemias.

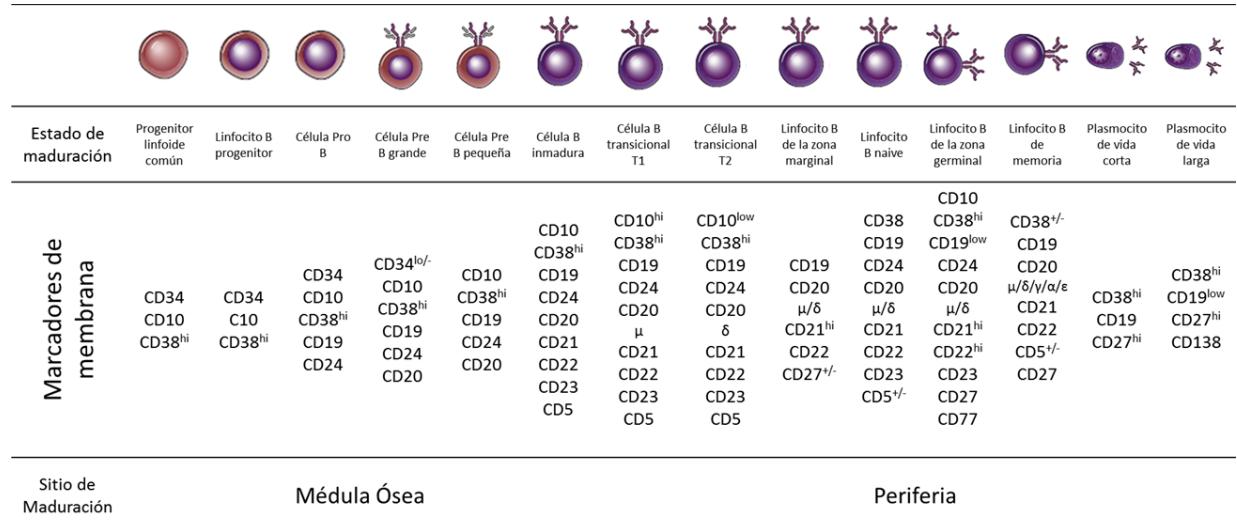
1.1 Ontogenia e inmunofenotipo de los linfocitos

Los linfocitos son células hematológicas que hacen parte del sistema inmunológico. Existen dos tipos de linfocitos: los B (por su maduración en la médula ósea "*Bone marrow*") y los T (por su maduración en el Timo). Los linfocitos B producen anticuerpos que son utilizados para atacar los agentes externos como bacterias, virus y toxinas. Los linfocitos T destruyen las células propias que han sido alteradas por virus o se han transformado en cancerígenas (1).

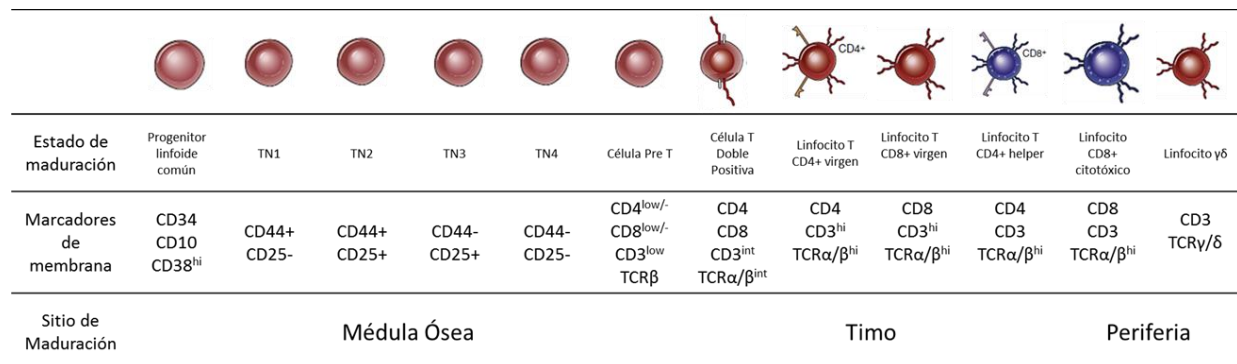
La ontogenia general de los linfocitos es necesaria para tener células viables y funcionales; cada paso de este desarrollo se caracteriza por una variación en las proteínas de la membrana que cambia en cada una de las fases de maduración (2,3). Los marcadores de membrana son una herramienta importante para clasificar linfocitos en sangre periférica, médula ósea o timo (Figura 1A y B).

Figura 1. Desarrollo de los linfocitos humanos e inmunofenotipo en las diferentes etapas.

A.



B.



A. Desarrollo de los linfocitos B. B. Desarrollo de los linfocitos T. El proceso de maduración de los linfocitos es un proceso secuencial caracterizado por la expresión de ciertos marcadores citoplásmicos o de membrana. TN: Triple negativo (CD3-, CD4-, CD8-) (Las imágenes de los linfocitos fueron tomadas y adaptadas de Abbas immunology 8va edición, 2012).

Los recuentos de linfocitos y la inmunotipificación son utilizados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, trastornos linfoproliferativos e inmunodeficiencias. Los valores relativos y absolutos de las sub-poblaciones de linfocitos son variables durante la infancia dada la maduración y expresión del sistema inmunológico en los primeros años de vida (4) (Tabla 1). Existe una disminución a lo largo de la vida de los linfocitos totales, los linfocitos B (CD19+), los linfocitos B naïve (CD27– IgD+) y los linfocitos B transicionales (CD24++CD38++) (5).

Tabla 1. Frecuencia relativa de subpoblaciones de linfocitos en sangre y tejidos linfoides (4).

	Sangre periférica			Nódulos linfáticos	Amígdala	Bazo
	2 a 5 años	5 a 15 años	Adultos			
Linfocitos B						
CD19+	24%	17%	12%	41%	51%	56%
Linfocitos T						
CD3+	64%	68%	72%	56%	49%	31%
CD4+	37%	38%	44%	48%	42%	17%
CD8+	24%	26%	24%	10%	6%	14%
Linfocitos NK	10%	13%	13%	1%	<1%	15%

Los linfocitos B expresan receptores tipo inmunoglobulinas, los cuales están formados por dos cadenas pesadas (IgH, por sus siglas en inglés Inmunoglobulin Heavy Chain), y dos cadenas ligeras, una llamada kappa κ (Immunoglobulin Kappa Chain) y una Lambda λ (Immunoglobulin Lambda Chain). La molécula de Inmunoglobulina está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, unidas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está unida a una cadena ligera, y las cadenas pesadas están unidas entre ellas. Cada cadena pesada tiene una región N-terminal variable que contiene el sitio de ligamiento del anticuerpo y una región C-terminal codificada por un gen individual para

la región C. Esta región determina el isotipo del anticuerpo y tiene señales efectoras o de señalización (6).

Por su parte, los linfocitos T están conformados por un receptor principal (TCR por sus siglas en inglés T – cell receptor) el cual es una proteína trans-membranal compuesta por dos cadenas, alfa y beta (en el 10% de los casos son cadenas gamma – delta), unidas por puentes disulfuro. Además, poseen un correceptor acompañante denominado CD3 (7).

1.2 Genes del receptor de antígeno

Los genes del receptor de antígeno tienen una estructura particular, conformados principalmente por una región variable (V) y una región de unión (J); en el caso específico de la IgH, el TCR α y el TCR δ , existe una región adicional denominada de diversidad (D), además de sus regiones constantes y sufren un proceso conocido como reordenamiento V(D)J.

A continuación se describirá cada uno de los genes de manera específica y posteriormente el proceso de reordenamiento que tiene cada uno de estos.

1.2.1 Inmunoglobulinas

- IgH

El gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32.33) (Figura 2), tiene una longitud aproximada de 1250 kb. En total tienen 80 segmentos V, de los cuales ~50 son funcionales y están precedidos de una secuencia líder. Estos se agrupan en 7 familias diferentes. Además existen 27 segmentos funcionales D y 6 segmentos funcionales J. Además de sus regiones constantes C. Los segmentos V tienen tres regiones marco y dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs). (Figura 3).

- Ig κ

El gen de la cadena Kappa (κ) es una de las dos cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 2 (2q11.2) (Figura 2), tiene una longitud aproximada de 1820 kb. En total tienen 35 segmentos V, precedidos de una secuencia líder; seguida de 5 segmentos J y una única región constante que permite realizar el clivaje con la cadena pesada (Figura 3).

- Ig λ

El gen de la cadena Lambda (λ) pesada de las inmunoglobulinas, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.22) (Figura 2), tiene una longitud de 1050 kb. En total tienen 30 segmentos V y están precedidos de una secuencia líder. Existen 4 segmentos J y C los cuales se encuentran intercalados, para seleccionarse en parejas. (Figura 3).

1.2.2 Receptor de linfocitos T (TCR)

- TCR β

El gen de la cadena β (Beta) del TCR se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q.34) (Figura 2), está conformado estructuralmente igual que el de las inmunoglobulinas, una región V con aproximadamente 50 fragmentos diferentes. Además, dos regiones D y J, acompañadas por la región constante del receptor. Dada la naturaleza del gen y las probabilidades de reordenamiento, la cadena Beta es la que permite la variabilidad de los reordenamientos de los linfocitos T alfa – Beta $\alpha\beta$ (Figura 3).

- TCR α /TCR δ

La cadena α (alfa) ubicada en el brazo largo del cromosoma 14 (14q11.2) (Figura 2) está conformada por aproximadamente 45 regiones V precedidas de una secuencia Líder. No tiene segmentos D por lo que hay más de 55 segmentos J y una única región constante. Este gen posee dos segmentos silenciadores que bloquean el reordenamiento del gen en

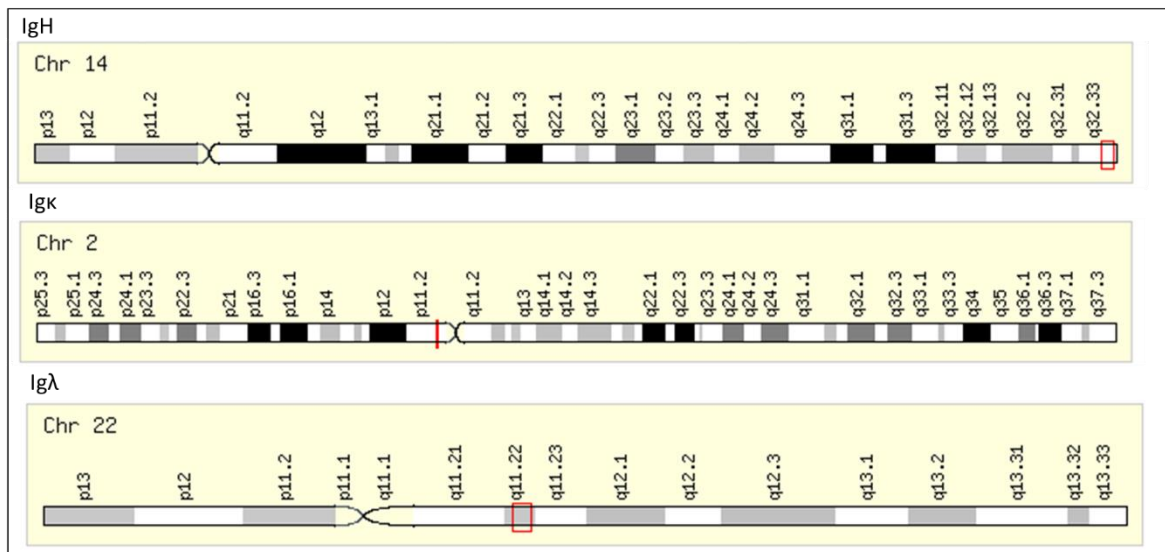
caso que la ontogenia requiera linfocitos gamma – delta $\gamma\delta$. Dentro de este gen (entre las regiones Variables y de Unión) se encuentra la secuencia de la cadena δ (Delta). Conformada por 2 regiones V, 3 regiones D y 4 regiones J y una única región C al final de la secuencia. Esta disposición de un gen dentro del otro otorga la selectividad celular al momento de especializar un linfocito T en $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (Figura 3).

- TCR γ

La cadena γ (Gamma) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (7p14.1) (Figura 2) cuenta con 5 regiones V con su respectiva secuencia líder. Además de 2 grupos de regiones J acompañadas cada una por una región C. En este gen también hay dos secuencias silenciadoras que permiten que el gen no se reordene cuando se está reordenando la cadena Beta y alfa (Figura 3).

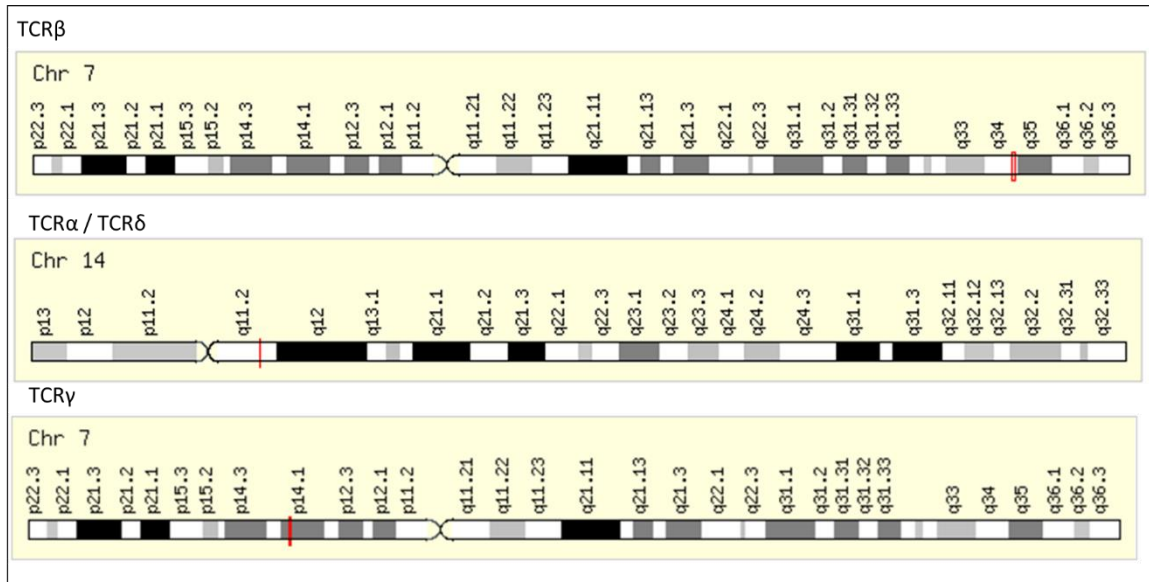
Figura 2. Locus de los genes del receptor de antígeno.

A.



Tomado de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IGK> (10 / Ene / 2018)

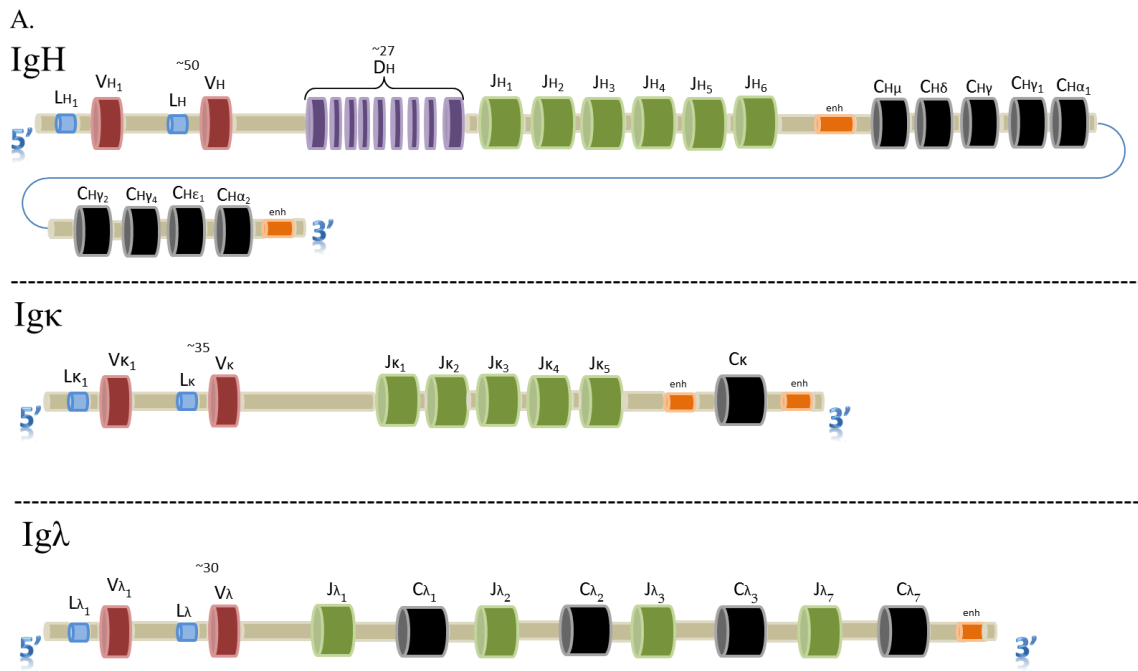
B.

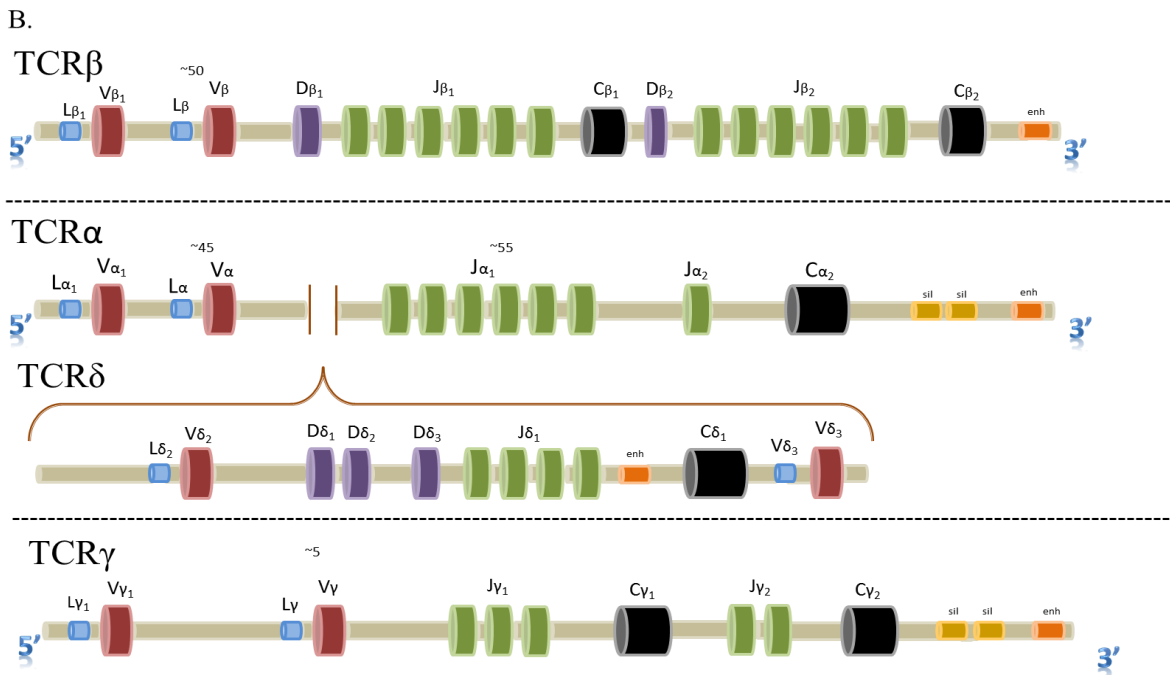


Tomado de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRB> (10 / Ene / 2018)

A. Inmunoglobulinas B. Receptor de células T. El locus se encuentra señalado en líneas rojas para cada cromosoma.

Figura 3. Estructura germinal de las cadenas del receptor de antígeno.





A. Inmunoglobulinas. B. Receptor de linfocitos T. Las cadenas que conforman los receptores de antígeno cuentan con un gran número de segmentos posibles. L: exón líder, V: regiones variables, D: regiones diversas, J: regiones de unión, C: regiones constantes y E: potenciadores. A partir de estos se crea el inmenso repertorio de los receptores. (Tomada y modificada de Villamizar-Rivera, 2016).

1.3 Reordenamiento del gen y generación del repertorio

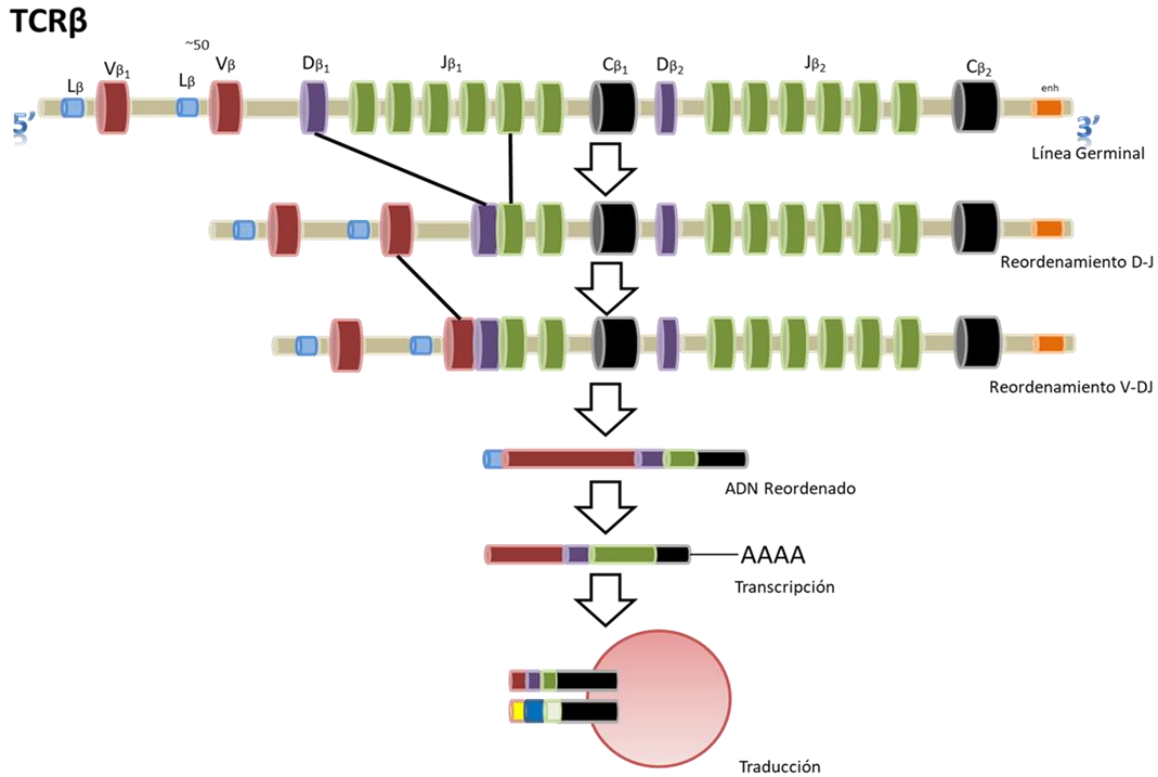
A partir de los genes del receptor de antígeno se generan las proteínas que tendrán funciones específicas en cada linfocito. Los receptores de antígeno son un grupo de proteínas solubles o de superficie que tienen funciones variadas, entre ellas los procesos de adhesión, reconocimiento y ligamiento entre las células del sistema inmune. Estas proteínas están constituidas por varias cadenas de polipéptidos unidas por puentes disulfuro. Los genes de las inmunoglobulinas y los genes del receptor de las células T (TCR) no se heredan como tal, sino que durante la maduración de los linfocitos sufren un fenómeno de recombinación mediante el cual se genera una gran diversidad proteica o repertorio combinatorio. Dicho repertorio es el que permite a las células B y T reconocer un enorme número de antígenos diferentes, que varía en número por las propiedades de

unión e hipermutación somática en cada una de las cadenas. Las posibilidades de reordenamiento funcional son para las inmunoglobulinas 10^{11} y para el receptor de linfocito T, TCR $\alpha\beta$ 10^{16} , TCR $\gamma\delta$ 10^{18} .

El proceso de reordenamientos ocurre en el ADN en el cual primero sucede una fusión de cualquier región Diversa (D) y una de unión (J). Posteriormente la unión con una región Variable (V), este proceso se conoce en inmunología como reordenamiento V (D) J; finalmente ocurre la unión con una región constante y este ADN reordenado será el que posteriormente se transcriba y se traduzca en la proteína funcional de los linfocitos (Figura 4). La secuencia restante del ADN será eliminada por un proceso de escisión. En el caso de la ontogenia de los linfocitos T, se produce primero el rearreglo del locus TCRD, luego del TCRG, y por último el TCRB y TCRA. En el caso de los linfocitos B, se producen primero en la cadena pesada de las inmunoglobulinas y posteriormente en los genes IGH e IGK.

En general, si una población linfoide presenta un reordenamiento dominante de los genes de receptor de antígeno, se considera que es clonal y, en general, neoplásico; por otra parte, si una población linfoide es policlonal, presentará una gran variedad de reordenamientos. Se desconoce cuál es el patrón de reordenamientos de genes de receptor de antígeno en la sangre de pacientes con inmunodeficiencias primarias, pero el hecho de que presenten disfunción del funcionamiento de poblaciones de linfocitos permite hipotetizar que podría haber alteraciones del proceso, las cuales podrían ser nocivas a largo plazo y predisponer al desarrollo de cáncer.

Los reordenamientos de los genes del receptor de antígeno son procesos fisiológicos altamente controlados que permiten un extenso repertorio de receptores de inmunoglobulina y TCR, necesarios para la adecuada maduración y funcionamiento de los linfocitos.

Figura 4. Proceso de recombinación de los genes del receptor del antígeno

En la figura se muestra el procesamiento de la cadena Beta del TCR, pero los procesos son similares para las demás cadenas del TCR y las pesadas y ligeras de las Ig. Este proceso permite obtener entre 1×10^{10} – 1×10^{18} combinaciones. Momentos antes de la transcripción del ADN se eliminan todos los segmentos constantes de la línea germinal excepto uno, y este es el que se expresa. El segmento líder no se traduce a proteína. (Tomada y modificada de Villamizar-Rivera, 2016).

Se conocen varias alteraciones de importancia que involucran los reordenamientos de los genes de receptor de antígeno:

Expansión clonal. En las leucemias y los linfomas, por definición, una clona de linfocitos transformados que comparte un reordenamiento de los genes de receptor de antígeno, está proliferando y reemplazando las poblaciones normales. En este tipo de cánceres el repertorio linfocitario suele estar disminuido y se produce expansión aberrante de otras células, tales como las clonas de células T acompañantes en pacientes con linfomas B. El fenómeno de la expansión clonal no es único del cáncer; se han encontrado clonas linfoides dominantes en pacientes con enfermedades autoinmunes tales como lupus y psoriasis, entre otras (8).

Translocaciones. Algunos linfomas y leucemias se caracterizan por tener translocaciones de estos genes con otras regiones del genoma; como t(14;18) en linfoma folicular, t(8;14) en linfoma de Burkitt, t(3;14) en linfoma B difuso de célula grande y t(11;14) en linfoma de células del manto, entre otros (9).

Alteraciones en enzimas requeridas para el proceso de reordenamiento de genes de receptor de antígeno. En un grupo de enfermedades genéticas raras, conocidas como inmunodeficiencias primarias (IDP) se han encontrado alteraciones en enzimas cruciales para el proceso de reordenamiento de genes de antígeno linfocitario, tales como las codificadas por los genes de la activación de la recombinación 1 y 2 (RAG) (8). Por ejemplo, se sabe que pacientes con alteraciones en RAG 1 pueden desarrollar fenotipo de inmunodeficiencia común variable.

Aunque en estas tres situaciones está implicado el proceso de reordenamiento de los genes de receptor de antígeno, los procesos patológicos que lo afectan y su contribución al desarrollo de los linfomas y las leucemias no se comprenden aún en su totalidad. El caso de las inmunodeficiencias primarias (IDP) es interesante y podría servir como modelo de estudio de linfomagénesis. Las IDP son un grupo heterogéneo de trastornos genéticos que se caracterizan por infecciones frecuentes y severas, enfermedades autoinmunes y cáncer (10).

1.4 Evaluación de los reordenamientos en tejidos

La teoría actual del origen del cáncer establece que las células somáticas sufren un proceso evolutivo gradual que les permite escapar de las limitaciones impuestas por el ambiente, tales como la división celular, el envejecimiento o la obtención de nutrientes (11). Estas células neoplásicas, generalmente, son clonales, pues se dividen a partir de un único precursor, de esta manera la población de células neoplásicas va a compartir las mismas características. Esta característica se utiliza actualmente para diagnosticar las linfoproliferaciones de células B y T.

Todos los linfocitos sufren rearrreglos de los genes de las inmunoglobulinas y del TCR durante la ontogenia. Estos rearrreglos les confieren especificidad y permiten determinar la

presencia de una población clonal. Igualmente permitirían identificar una neoplasia determinada y hacer seguimiento de la presencia de neoplasia mínima residual (12).

Por otra parte, existen anticuerpos que permiten determinar por medio de inmunohistoquímica o citometría de flujo, si hay restricción en la expresión de diversos fragmentos de los genes de inmunoglobulinas y del TCR (13). Sin embargo, la evaluación de estos resultados es difícil por la presencia de inmunoglobulinas circulantes, que producen una intensa señal de fondo

La determinación de la clonalidad en estas neoplasias se realiza de diferentes maneras: 1). Si una población celular evaluada por histopatología tiene la misma morfología, además de tener una expresión igual de marcadores de inmunohistoquímica. 2). Por citogenética demostrando la presencia de una alteración cromosomal recurrente, como translocaciones, deleciones o inserciones en las células analizadas, sin embargo, estas alteraciones se comparten solo en un grupo específico de linfomas y leucemias (14). 3). Por citometría de flujo evaluando anticuerpos de membrana, compartidos por la misma población celular (15). 4). Evaluando los reordenamientos de los genes del receptor de antígeno; estableciendo si una población compartía un mismo reordenamiento había tenido una expansión clonal.

El análisis de reordenamientos se realizó hasta 2003 por medio de Southern Blot (16,17), pero esta metodología generaba varios inconvenientes entre los cuales estaba la gran cantidad de ADN que se necesitaba por ensayo, además de que los resultados interlaboratorio no eran comparables por las diferencias técnicas entre protocolos (18). Este procedimiento de la evaluación de los reordenamientos fue adaptado posteriormente a una serie de protocolos de PCR, estandarizados por un consorcio europeo llamado EuroClonality (antes llamado BIOMED – 2) (19), los cuales definen la clonalidad como los reordenamientos compartidos por una población linfoide en un tejido específico; una población celular que tienen un mismo reordenamiento es denominada clonal (o monoclonal) y aquellas que tienen mayor variedad de reordenamientos son denominadas policlonales.

Los resultados de las diversas amplificaciones pueden leerse de varias maneras pero el proyecto BIOMED-2 sugiere dos de ellas; por medio de análisis de heterodupletas en geles

de poliacrilamida (heteroduplex) y análisis de fragmentos de ADN por medio del software GeneMapper®. Idealmente el laboratorio debería poseer ambos métodos de análisis, que son complementarios; sin embargo, según la literatura publicada por BIOMED-2, el método de análisis heteroduplex es el de elección cuando solo puede contarse con una de las dos. Cuando la población es clonal, el GeneMapped permite observar pocos picos o una sola curva Gaussiana. En el caso del análisis por heteroduplex, se observan bien sea bandas definidas o un barrido de ADN (20).

El diagnóstico y la clasificación de las lesiones linfoides pueden ser difíciles, pues los hallazgos no son siempre específicos y pueden variar entre enfermedades. Aunque la mayor parte de lesiones clonales son tumorales, clonalidad no necesariamente significa malignidad, pues se ha observado clonalidad en poblaciones linfoides que acompañan lesiones benignas, tales como linfocitosis T, gammapatías monoclonales benignas, pacientes inmunodeprimidos y proliferaciones cutáneas diversas, e incluso en individuos normales (21).

Existen casos donde el repertorio de reordenamientos se encuentra restringido como lo son la enfermedad celiaca, algunas enfermedades autoinmunes, el síndrome de Omenn (22) y las inmunodeficiencias primarias y secundarias (23). A continuación, se describirán brevemente las inmunodeficiencias primarias en general y algunas de las más frecuentes.

1.5 Inmunodeficiencias Primarias

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDP), son un grupo de más de 350 enfermedades de origen genético, desconocidas por muchos médicos generales, especialistas y trabajadores de la salud. Cerca de 200 de estas enfermedades tienen una alteración monogénica que tiene una herencia mendeliana, sin embargo, se ha detectado que algunas IDP son de origen poligénico. La penetrancia de cada enfermedad, la variabilidad de la expresión y la interacción entre la genética y el ambiente son factores que contribuyen en la diversidad fenotípica de la enfermedad (24).

Dada la heterogeneidad de las enfermedades es complejo agruparlas en un solo grupo, por lo que la clasificación de las IDP se realiza de acuerdo al componente del sistema inmune que esté afectando principalmente. En los defectos de la respuesta de la inmunidad adaptativa, defectos en los fagocitos, en la señalización del complemento y en el desarrollo

de los linfocitos (25) (Figura 5). La última clasificación existente las agrupa en 8 grupos principales (26):

1. Inmunodeficiencias de linfocitos B y T.
2. Deficiencias de anticuerpos.
3. Síndromes con inmunodeficiencias bien definidas.
4. Enfermedades por desregulación inmune.
5. Defectos congénitos del número y/o función de los fagocitos.
6. Defectos en la inmunidad innata.
7. Transtornos autoinflamatorios.
8. Deficiencias del complemento

Los pacientes con estas enfermedades presentan muchos signos y síntomas diferentes; no obstante, la mayor parte se caracterizan por la ocurrencia temprana e insidiosa de infecciones severas y recurrentes, y tienen un elevado riesgo para el desarrollo de cáncer, entre ellos leucemias, linfomas y carcinomas. La morbilidad y mortalidad es elevada, causan elevados costos socioeconómicos y los tratamientos son limitados.

La prevalencia y la incidencia real de estas enfermedades sigue siendo desconocida, y aunque se han considerado por muchos años como enfermedades raras, los estudios epidemiológicos no son concluyentes, pues según ellos la incidencia de las diversas inmunodeficiencias primarias fluctúa entre 4.6 y 2.4 por cada 100.000 nacidos vivos (27)(28). Estos valores son comparables con los obtenidos en reportes hechos para Colombia (29)(30).

Las IDP con alteraciones genéticas más frecuentes se encuentran enunciadas en la Tabla 2.

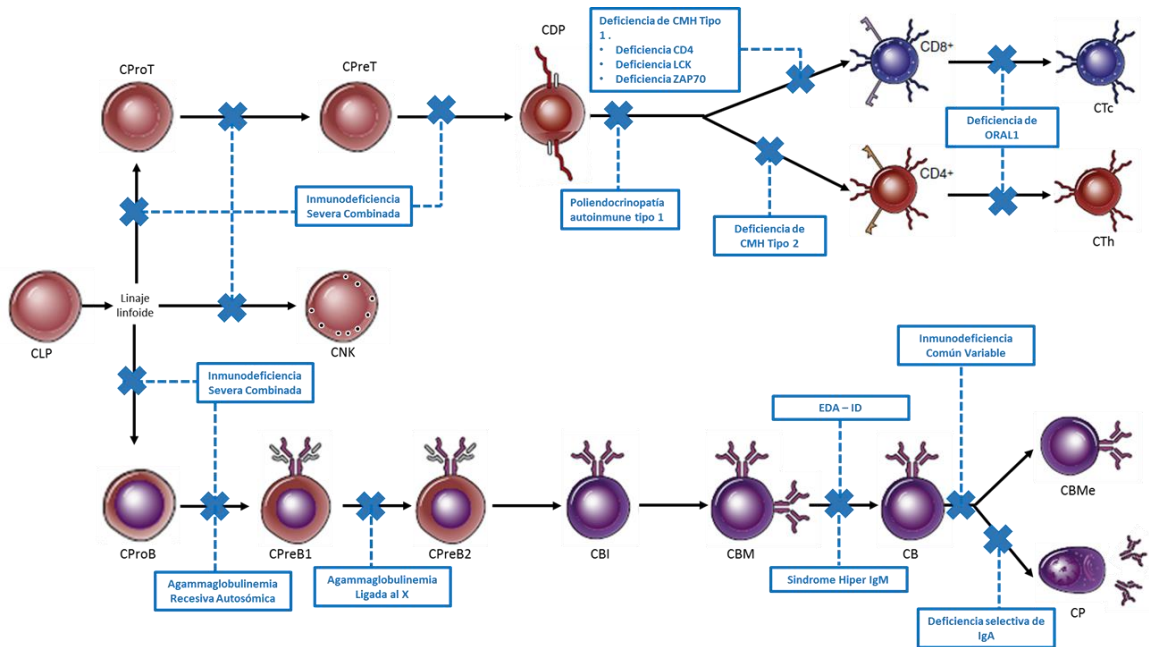
Las deficiencias de anticuerpos son las inmunodeficiencias primarias más frecuentes (31), principalmente la inmunodeficiencia común variable, la hipogammaglobulinemia transitoria

de la infancia, la agammaglobulinemia ligada al X (Agammaglobulinemia de Bruton) y la deficiencia selectiva de IgA (32). A continuación, se explicará cada una de ellas brevemente.

1.5.1 Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia

La hipogammaglobulinemia se define como la disminución de al menos una inmunoglobulina circulante. Los valores de IgG disminuyen hacia los 3 o 6 meses de vida, que es el tiempo en que el neonato comienza a producir sus propias inmunoglobulinas y luego se deben normalizar. En los casos que los niveles no vuelven a subir después de esos 6 meses de edad se define como hipogammaglobulinemia de la infancia (HGI). Se desconoce actualmente si es una alteración en la maduración de los linfocitos o en la síntesis de Ig por parte de los plasmocitos (33).

Figura 5. Desarrollo general de los linfocitos y principales inmunodeficiencias primarias implicadas



(Tomado y adaptado de KEGG pathways, consultado: 27 – Nov – 2018).

Tabla 2. Principales inmunodeficiencias y genes involucrados

Immunodeficiencia	Genes Afectados	Referencias
	DCLRE1C	Reparador de ADN por Cross-Link 1C (34)
	RAG 1 / 2	Gen Activador de la recombinación 1 y 2 (35)
	CD3 γ	CD3 gamma (36)
	CD3 ϵ	CD3 Épsilon
Immunodeficiencia Severa Combinada (IDSC)	ADA	Adenosina Deaminasa (37)
	IL7R α	Receptor de interleuquina 7 (38)
	IL2R γ	Receptor de la subunidad gamma de la interleuquina 2 (39)
	JAK3	Janus Quinasa 3 (40)
	CD45	Antígeno común de leucocitos (41)
Poliendocrinopatía autoinmune tipo 1	AIRE	Regulador Autoimmune (42,43)
Deficiencia de CMH Tipo 1.	TAP1 / TAP 2	Casete de unión de ATP de la subfamilia B 1 / 2. (44)
Deficiencia CD4	CD8 α	Cadena Alfa de la glicoproteína CD8 de la superficie de células T (45)
Deficiencia LCK	LCK	Proteína tirosina quinasa específica de linfocitos. (46)
Deficiencia ZAP70	ZAP70	Proteína tirosina quinasa ZAP-70 (47)

Deficiencia de CMH Tipo 2.	RAFX5	Factor Regulador x5	(48)
	RFXANK	Factor regulador x asociado a la proteína almacenadora de ankirina	
	RFXAP	Factor regulador x asociado a proteína	
	CIITA	Trans-activador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.	
Deficiencia de Orai1	Orai1	Proteína activadora del canal de liberación de calcio 1	(49)
Agammaglobulinemia Autosómica Recesiva	IgH	Cadena Pesada de las inmunoglobulinas	(50)
	CD79a	molécula CD79a	
	Igλ	Polipéptido inmunoglobulina lambda	
	BLNK	proteína de unión de las células B	
Agammaglobulinemia ligada al X	BTK	Tirosina Quinasa de la agammaglobulinemia de Burton	(51)
displasia ectodérmica anhidrótica con inmunodeficiencia	IKKy	sub unidad gamma del inhibidor del factor nuclear quinasa kappa - B	(52)
	CD40	Miembro 5 de la superfamilia del	(53)

		receptor del factor de necrosis tumoral	
Síndrome de Hiper IgM	CD40L	Ligando del miembro 5 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	(54)
	UNG	Uracilo - DNA glicosilasa	(55)
	AID	Deaminasa de citidina inducida por activación	
Inmunodeficiencia común variable	ICOS	Co-estimulador inducible de células T	(56)
	BAFFR	miembro 13c de la superfamilia del factor de necrosis tumoral	(57)
	CD19	Antígeno CD19 de linfocitos B	(58)
	TACI	miembro 13b de la superfamilia del factor de necrosis tumoral	(59)

1.5.2 Agammaglobulinemia Ligada al X

Catalogada como OMIM #300755, es una inmunodeficiencia hereditaria caracterizada por la ausencia de linfocitos B maduros (CD19+) que causan la ausencia completa de anticuerpos. Se manifiesta principalmente en los niños menores de 6 meses de edad. Afecta a 1 en 190.000 hombres nacidos vivos en Estados Unidos, no existen estadísticas para Colombia. Esta enfermedad está causada por mutaciones en el gen BRK (Tirosina quinasa de Bruton) ubicado en el brazo largo del cromosoma X (Xq22.1), la cual juega un papel crucial en la maduración de los linfocitos B (60), sin embargo, existen más de 544 mutaciones que se han asociado con la enfermedad, aunque no se han asociado con su severidad (Tabla 2) (61). Se diagnostica por concentraciones de IgG en suero de

<200mg/dL, niveles <1% de linfocitos CD19+ y falla en la generación anticuerpos a las vacunas puestas en los primeros años de edad(62).

1.5.3 Inmunodeficiencia común variable (IDCV)

Catalogada como OMIM # 607594, es, como su nombre lo indica, la más común y variable de las inmunodeficiencias primaria; se caracteriza porque al menos dos de las inmunoglobulinas circulantes en suero (IgA, IgG, IgM), se encuentran disminuidas dos desviaciones estándar respecto a los valores para el sexo y la edad. (Tabla 3). Por la heterogeneidad de la enfermedad se desarrolló un protocolo de sub-clasificación por un grupo europeo denominado EUROCLASS, los cuales agrupan la enfermedad de acuerdo a los resultados obtenidos por citometría de flujo de los linfocitos B totales (CD19+), con cambio de isotipo (CD19+, CD27+, IgM-, IgD+/-), el porcentaje de linfocitos CD21 (CD19+, CD20+, μ/δ +, CD21hi, CD22+, CD27+/-) y los linfocitos de transición (CD10hi, CD38hi, CD19+, CD24+, CD20+, μ/δ +, CD21+, CD22+, CD23+, CD5+) (63).

Los síntomas de la enfermedad incluyen infecciones de tracto sino-pulmonar como neumonías, bronquitis, sinusitis, otitis, enfermedades gastrointestinales por *Giardia lamblia*, *Helicobacter pylori*, manifestaciones inflamatorias y autoinmunes como enfermedades inflamatorias pulmonares, anemia hemolítica, trombocitopenia, anemia perniciosa, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, entre otros, así como el desarrollo de cáncer, principalmente linfomas no-Hodgkin y cáncer de estómago (64). Muchos pacientes son diagnosticados entre los 20 y 40 años de edad, pero aproximadamente el 20% de los pacientes con IDCV se diagnostican en menores de 20 años. Además, cerca de un 5% de los pacientes con IDCV no presentan infecciones significativas pero desarrollan complicaciones autoinmunes y auto-inflamatorias. Todos estos factores conllevan a un retardo de 6-7 años en el diagnóstico de esta enfermedad (65).

1.5.4 Deficiencia selectiva de IgA (DslgA)

(OMIM # 609529) Esta enfermedad se caracteriza por niveles disminuidos de Inmunoglobulina A en suero (<7 mg/dl) en individuos mayores de 4 años, con niveles

normales de otras inmunoglobulinas (IgG e IgM) (Tabla 2). Clínicamente es muy heterogénea, con pacientes completamente asintomáticos diagnosticados incidentalmente, y otros que pueden presentar fenotipos como: infecciones pulmonares recurrentes, alergias, autoinmunidad y otras complicaciones severas que pueden llevar a desarrollar IDCV como desórdenes gastrointestinales (66). No se conoce con exactitud la prevalencia de la DsIgA, algunos autores aseguran que es más frecuente que la IDCV, sin embargo, no se pueden conocer con precisión por los valores pues la enfermedad en muchos casos puede ser asintomática (67).

Tabla 3. Niveles de Ig secretada y recuento de células B en las IDP estudiadas.

IDP	Niveles				Recuento de células B
	IgG	IgA	IgE	IgM	
IDCV	Bajo	Bajo		Normal o bajo	Reducidos
DsIgA	Normal	Bajo o ausente	Normal	Normal	Normales
XLA	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Reducidos o nulos

1.6 Inmunodeficiencias primarias y cáncer

El riesgo general de desarrollar cáncer de una persona con IDP está entre el 4 y el 25%. Los linfomas y algunos carcinomas son los cánceres más frecuentemente asociados (68). Entre las IDP más comunes se encuentran las deficiencias de anticuerpos, particularmente la deficiencia selectiva de IgA (DsIgA), y la inmunodeficiencia común variable (IDCV) (69). Ambas enfermedades están relacionadas y se caracterizan por una alteración en la maduración de los linfocitos B y T en la médula ósea y el timo respectivamente. Como consecuencia, aunque no haya una reducción en el número de células, éstas no funcionan adecuadamente y los pacientes presentan síntomas (69).

La inmunodeficiencia común variable es una de las inmunodeficiencias primarias que tienen más riesgo de desarrollar cáncer. Cerca del 13.5% de los pacientes con estos trastornos desarrollan cáncer asociados al sistema inmune como linfomas y leucemias. Las neoplasias más frecuentes son los linfomas no-Hodgkin (70,71), entre ellos los linfomas del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), el linfoma folicular y otros (72,73). Se desconoce el mecanismo mediante el cual estos pacientes desarrollan linfomas.

En general, la inherente inestabilidad genética de los linfocitos y la sostenida activación y proliferación del sistema linfoide durante las infecciones incrementa el riesgo de transformaciones malignas. Estas características son particularmente marcadas en infecciones crónicas, condiciones autoinmunes e inmunodeficiencias que son reconocidas como factores de riesgo para el desarrollo de linfomas.

No obstante, aunque la infección crónica induce linfoproliferación, es poco probable que está sola sea suficiente para provocar una transformación maligna. La ausencia de infecciones en individuos inmunocompetentes y pacientes inmunodeficientes con malignidad linfoide sugiere que tales estímulos no son siempre necesarios.

Los linfomas que más se han asociado con las inmunodeficiencias primarias son extra nodales, particularmente sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, son de progresión clínica acelerada y pueden asociarse con la infección por el virus Epstein-Barr (74).

Por ejemplo, los pacientes con IDCV frecuentemente muestran una marcada infiltración linfoide de naturaleza reactiva en el tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma MALT), haciendo difícil la distinción histológica entre proliferaciones linfoides malignas y benignas (75). Aún es materia de discusión, tanto la estimación del pronóstico en estos pacientes pues se debe realizar seguimiento de la linfoproliferación como su manejo en términos de quimioterapia. Adicionalmente, se han reportado algunos pacientes con IDCV con hiperplasia nodular linfoide, que corresponde al desarrollo de proliferaciones "tumor-like" de tejido linfoide en tracto gastrointestinal, pero la gran mayoría tienen un curso clínico benigno. Los estudios para evaluar rearrreglos de células B son de gran utilidad para diferenciar linfomas MALT de la hiperplasia linfoide nodular, lo que contribuirá a un manejo más apropiado de estos pacientes de acuerdo a su diagnóstico (75).

La incidencia de tumores linfoides es mayor en pacientes con IDCV comparado con la población general. En 2002, un estudio realizado por Dinamarca y Suecia usando los registros de inmunodeficiencias y cáncer encontraron un incremento en la incidencia de alteraciones linfoides malignas de 12 veces en los pacientes con IDCV comparado con la población general (74). Por su parte, en una cohorte italiana de 224 pacientes con IDCV, 5 desarrollaron linfoma no-Hodgkin con un incremento de riesgo de 18 veces. En un estudio más reciente, las deficiencias de anticuerpos se encontraron más asociadas a un rango limitado de cánceres específicamente cáncer de estómago que otras inmunodeficiencias. Las razones para el incremento en la susceptibilidad al desarrollo de malignidades linfoides en pacientes IDCV aún no son claras.

Los tumores hematolinfoides no son los únicos asociados con IDCV y DsIgA, también los carcinomas del estómago, la mama, la vejiga y el cérvix se han encontrado con alguna frecuencia(76) .

Con el propósito de aclarar la asociación entre las complicaciones relacionadas a la IDCV y su pronóstico, se estudió una gran cohorte europea de pacientes con IDCV en la cual se definieron cinco fenotipos clínicos: infecciones únicamente, autoinmunidad, infiltración linfocítica policlonal, enteropatía y malignidades linfoides. Fenotipos diferentes se asociaron con diferentes tiempos de supervivencia: aquellos pacientes sin complicaciones (infecciones únicamente) sobrevivieron más tiempo que aquellos con autoinmunidad (riesgo relativo de mortalidad: 2.5), enteropatía (riesgo relativo de mortalidad: 3.0), infiltración linfocítica policlonal (riesgo relativo de mortalidad: 4.0) y para resaltar, linfoma (riesgo relativo de mortalidad: 5.5). De importancia, la infiltración linfocítica policlonal (en pulmón, nódulos linfoides y bazo) se asoció con un incremento de 5 veces de riesgo a desarrollar malignidades linfoides a largo plazo en pacientes con IDCV (63).

Por su parte, un hallazgo reciente demostró que la IDCV está más asociada a malignidades linfoides que las deficiencias de células T, lo que sugiere que la desregulación subyacente a los linfocitos B contribuye al incremento en el riesgo de malignidades en estos pacientes (77).

Los procesos fisiológicos de reordenamiento de los genes de receptor de antígeno se encuentran todavía en estudio. Por otra parte, los procesos patológicos que lo afectan y

su contribución al desarrollo de los linfomas y las leucemias no se comprenden aún en su totalidad. Las inmunodeficiencias primarias caracterizadas por alteración en la función linfocitaria presentan alteraciones numéricas y cualitativas de éstos y los pacientes afectados desarrollan linfomas y leucemias a largo plazo y con una frecuencia mayor que la población general. Por tal razón los consideramos un modelo interesante de estudio de los reordenamientos de receptor de antígeno.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo General

Describir los patrones de reordenamiento de genes de receptor de antígeno en sangre periférica de una serie de pacientes con inmunodeficiencias primarias de la Universidad de Antioquia entre los años 2015 – 2017 y su correlación con características clínicas e inmunofenotípicas.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Describir las características clínicas de un grupo de pacientes con inmunodeficiencias primarias.
- Establecer la frecuencia y el tipo de reordenamientos de estos pacientes diagnosticados con Inmunodeficiencias primarias.
- Explorar la asociación entre las características inmunológicas, clínicas y demográficas de estos pacientes con inmunodeficiencias primarias y el patrón de reordenamientos de los genes receptores de antígeno de los linfocitos T y B.

2. Capítulo 2: Metodología

2.1 Tipo de estudio

Estudio analítico, retrospectivo de cohorte

Para resolver los objetivos se desarrolló el proyecto en 3 fases principales. En primera medida se seleccionaron los casos de los que ya se conocía su origen clonal (o policlonal) y se evaluó con las técnicas enunciadas posteriormente (Fase 1). Posteriormente se evaluó una serie de casos de los que se desconocía su origen clonal y se determinó el diagnóstico definitivo de estas (Fase 2) y finalmente, ya conociendo la distribución de los reordenamientos en pacientes sanos y con neoplasias, se evaluaron en pacientes con inmunodeficiencias primarias.

2.2 Recolección de casos

2.2.1 Fase 1

Se ingresaron 20 casos en total retrospectivos, con diagnóstico de proliferaciones clonales (neoplasias) (n = 10) y policlonales (hiperplasias) (n = 10), diagnosticados por patólogos expertos en el Instituto Nacional de Cancerología. Se incluyeron los casos de los que existía material biológico en el archivo además de reporte completo de patología en el sistema de información.

2.2.2 Fase 2

Se ingresaron todos los casos enviados al grupo de patología oncológica en el Instituto Nacional de Cancerología, para el diagnóstico diferencial de clonalidad, entre los años

2015 a 2018. De estos pacientes se revisaron las bases de datos MED y SAP con el fin de extraer los resultados de las pruebas de clonalidad y revisarlos retrospectivamente.

- Criterios de inclusión

Pacientes de ambos sexos y de cualquier edad.

Pacientes recibidos en el grupo de patología oncológica para diagnóstico de la prueba de clonalidad.

- Tamaño de muestra

Se incluirán todos los pacientes que cumplan los criterios de elegibilidad.

2.2.3 Fase 3

Se incluyeron los pacientes que ingresaron al grupo de Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia para diagnóstico de inmunodeficiencias humorales, entre los años 2015 y 2017, que tuvieran historia clínica y datos inmunofenotípicos por citometría de flujo además que cumplieran con los criterios diagnósticos para Inmunodeficiencia común variable, Deficiencia Selectiva de IgA, Agammaglobulinemia ligada al X e Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia.

- Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los pacientes que cumplieran los siguientes criterios en el lapso de tiempo examinado.

Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado donde se especifique que se almacenaría el ADN y permitirían su utilización en estudios futuros.

Pacientes con datos clínicos e inmunológicos en el registro y con una cantidad de ADN suficiente para los análisis moleculares.

Pacientes con diagnóstico confirmado de acuerdo con los criterios de la ESID (European Society for immunodeficiencies) de alguna de las inmunodeficiencias primarias siguientes: IDCV, DslgA, ALX, HGI, en las que se deben de cumplir todos los criterios para confirmar la enfermedad.

2.2.4 Criterios diagnósticos de las enfermedades

- Inmunodeficiencia común variable

1. Hombre o mujer que tenga deficiencia marcada de inmunoglobulina G (IgG) al menos dos desviaciones estándar para el promedio de su edad (78) y disminución de al menos uno de los isotipos IgA o IgM.
2. Síndrome de infecciones recurrentes por más de dos años.
3. Pobre respuesta a las vacunas puestas en la primera infancia.

Deficiencia selectiva de IgA

Hombre o mujer mayor de 4 años que tenga los niveles de IgA en suero menores a 7mg/dl (0.07 g/l) pero cuyos niveles de IgG e IgM sean normales. Estos pacientes tienen respuesta de anticuerpos IgG normal a las vacunas.

- Agammaglobulinemia ligada al X

1. Hombre con menos del 2% de células B CD19+, para la edad, medido en sangre periférica.
2. Alguna de las siguientes opciones: mutación en el gen Btk (tirosina quinasa de Bruton), ausencia del ARNm de Btk en neutrófilos o monocitos, ausencia de la proteína Btk en monocitos o plaquetas.

- Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia

1. Prolongación de la hipogammaglobulinemia de la infancia de los 5 meses de vida.
2. En la mayoría de los casos, el nivel de IgG es menor de 400mg/dl.

- Criterios de exclusión

Pacientes que no cumplan cualquiera de los criterios de inclusión, tengan cantidad insuficiente de ADN o no tengan datos en su historia clínica.

2.3 Citometría de Flujo

Los datos de citometría fueron tomados de la base de datos de los pacientes en el grupo de IDP de la Universidad de Antioquia, se realizó la comparación con los valores esperados para el sexo y la edad y se determinó si los niveles eran normales, aumentados o disminuidos.

2.4 Fuente de Datos

Los datos demográficos de los pacientes se obtuvieron de la base de datos del grupo de Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia, los cuales fueron registrados en el momento que llegó el paciente para realizar el diagnóstico y durante las consultas siguientes.

2.5 Descripción de las variables

Las variables incluidas en el estudio fueron las siguientes:

Tabla 4. Variables del estudio.

VARIABLE	DEFINICIÓN	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDIDA
Edad	Años cumplidos	Cuantitativa	Razón	Años
Sexo	Sexo fenotípico	Cualitativa	Nominal	1. Masculino

				2. Femenino
Diagnóstico final	Resultado obtenido por el grupo de inmunodeficiencias primarias de la universidad de Antioquia.	Cualitativa	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inmunodeficiencia común variable 2. Agammaglobulinemia 3. Hipogammaglobulinemia 4. Deficiencia selectiva de IgA
Antecedentes	Enfermedades diagnosticadas por médico	Cualitativa	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alergia 2. Enfermedades Gastrointestinales 3. Enfermedades del Tracto respiratorio 4. Enfermedades de Piel / Mucosas 5. Infecciones del Tracto genito - urinario 6. Infecciones Profundas 7. Enfermedades Autoinmune 8. Complicaciones del sistema endocrino 9. Síndromes asociados a IDP
Características inmunológicas	Valores cuantificados de las diferentes poblaciones celulares tomados por citometría de flujo en sangre periférica al momento del diagnóstico	Cualitativa	Ordinal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Normal 2. Aumentada 3. Disminuida

Resultado prueba de clonalidad	Patrón de reordenamientos obtenido por PCR multiplex.	Cualitativa	Nominal	1. Clonal
				2. Policlonal
				3. Otro

2.6 Recepción de muestras

Para cada una de las fases del estudio se seleccionaron las muestras correspondientes. Para la fase 1 y 2 se tomaron: sangre o biopsia líquida de medula ósea en tubo con EDTA, muestras de tejido en solución salina y tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFEP) del Instituto Nacional de Cancerología. Mientras para la fase 3 se tomó una alícuota de ADN de 50µl en concentración de 100 ng/µl, se transportó el ADN desde el grupo de IDP de la Universidad de Antioquia. Manteniendo todos los parámetros necesarios para su correcta manipulación y transporte.

2.7 Preparación de las muestras

Dependiente del tejido se realiza un procedimiento diferente para preparar la muestra para su extracción.

2.7.1 Médula ósea y Sangre.

Se realizó la separación de leucocitos por gradiente de densidad mediante Histopaque®-1077 (Sigma – Aldrich, San Luis, Missouri, USA), adicionando 3ml del reactivo a un tubo cónico de 15ml (SPL Life sciences, Naechon-Myeon, Korea), posteriormente con una pipeta Pasteur se adicionaba la sangre por los bordes del mismo para evitar mezclas o salpicaduras. Se realizó una centrifugación a 1200 g en una centrífuga Labnet HERMLE Z366K (Edison, NJ, USA). Se tomó la capa de células blancas por pipeteo y se trasladaron a un nuevo tubo de 15ml. Posteriormente se adicionó 1ml de PBS para lavar las células y se realizó nuevamente una centrifugación a 1200 g, el sobrenadante fue descartado y el

precipitado de las células se tomó con 100ul de PBS y se pasaron a un tubo Eppendorf® Safe-Lock microcentrifuge tubes (Merck, Darmstadt, Alemania) de 1.5 ml y se mantuvieron así, hasta el momento de la extracción.

Tejido Fresco en solución salina

Los fragmentos de tejido fresco fueron embebidos en resina de congelación Tissue Freezing Medium (Leica biosystems, Wetzlar, Alemania) marca registrada, y se realizaron cortes de 3 micras en tejido congelado por medio de micrótomo, sobre lámina convencional. Se realizaba coloración de rutina de hematoxilina y eosina con el fin de evaluar el porcentaje y la distribución de las células problema. A continuación el tejido se descongelaba y se colocaba en un tubo Eppendorf® Safe-Lock microcentrifuge tubes (Merck, Darmstadt, Alemania) de 1.5ml, para proseguir inmediatamente con la extracción del ADN.

2.7.2 Tejido Fijado en Formalina y Embebido en Parafina (FFEP)

Se evalúan las láminas de hematoxilina/eosina de cada caso y se seleccionaba aquella que tuviera más del 10% de población linfocida problema; De los tejidos elegidos se realizaron 4 cortes a 10 µm con un micrótomo Leica RM2255 (Wetzlar, Alemania) y se depositaban en un tubo de 1.5ml. Posteriormente se realizó una desparafinización adicionando 1ml de Xilol y dejando incubar durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar para retirar el sobrenadante. Este paso se repitió 1 vez más. Adicionalmente se deshidrató el tejido adicionando 1ml de etanol grado biología molecular, e incubando 5 minutos la muestra a la misma temperatura, y luego mediante centrifugación se retiraba el exceso. El tejido se dejaba secar durante 1 hora a 56°C en una plancha de calentamiento con agitación y posteriormente se proseguía a la extracción de ADN.

2.7.3 Extracción de ADN

Los tejidos fueron puestos en incubación a 56°C en 500µl de buffer de incubación (450µl de 1mM de Tris pH 7,4, 1mM de EDTA, 250 mM de NaCl y 2% de SDS + 50 µl de

Proteinasa k 20mg/ml), durante 48 horas. Posteriormente se separan las fases orgánica y acuosa con cloroformo – alcohol isoamílico 24:1; al centrifugar se obtuvo el sobrenadante. El ADN se precipitó adicionando NaCl y Etanol grado biología molecular en proporción al volumen de sobrenadante obtenido, se dejó precipitando a – 30°C durante 1hr. Por centrifugación se retiraron los reactivos y el ADN fue diluido en Buffer Tris – EDTA (10mM Tris – HCl pH 7.4, 1mM EDTA pH 8.0). Se realizó la cuantificación en el equipo Nanodrop 2000c (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) utilizando como blanco el buffer de dilución utilizado, se tuvo como una concentración mínima 20ng/μl y una relación de pureza 260/280 de 1.8 a 2.0. Si se obtenía una concentración mayor el ADN era diluido hasta obtener la concentración esperada. En caso de obtener menor ADN se excluía el caso.

2.8 PCR multiplex

La PCR múltiplex se realizó de acuerdo con los protocolos diseñados en el consorcio BIOMED-2 (79) evaluando las familias más representativas de cada uno de los genes del receptor de antígeno (Tabla 5). Se utilizó IdentiClone™ IGH + IGK & TCRB + TCRG Gene Clonality Assay (Invivoscribe, San Diego, California, USA) y Gold Taq DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada montaje se realizó con un control positivo proveído en el mismo kit, el cual es específicamente diseñado para cada familia de reordenamientos, y un control negativo en el que se realizó la PCR pero se utilizó Agua grado biología molecular en lugar del ADN. Todas las PCR posteriores se realizaron por duplicado y los productos se analizaron, uno de ellos por heterodupletas y el otro por análisis de fragmentos.

Tabla 5. Grupos de reordenamientos estudiados y tamaño esperado en pares de bases.

Gen	Familia reordenamientos	de	Tamaño Esperado en pb
Ig	H	VH - FR1 - JH	310 - 360
		VH - FR2 - JH	250 - 295

		VH - FR3 - JH	100 - 170
	k	Vk - Jk	120 - 160 / 190 - 210 / 260 - 300
		Vk - Kde + intron Kde	210 - 250 / 270 - 300 / 350 - 390
TCR	β	V β + J β 1/2	240 - 285
		V β + J β 2	240 - 285
		D β + J β 1/2	170 - 210 / 285 - 325
	γ	V γ 1 - 8, V γ 10 + J γ	145 - 255
		V γ 9, V γ 11 + J γ	80 - 220

Se utilizó el siguiente ciclado.

Denaturación inicial	95°C	7 minutos
35 Ciclos		
Denaturación	95°C	45 segundos
Hibridación	60°C	45 segundos
Elongación	75°C	90 segundos
Elongación Final	72°C	10 minutos
Mantenimiento	15°C	

Formación de heterodupletas

Denaturación	95°C	5 minutos
Choque térmico	4°C	60 minutos

Visualización de productos de PCR

2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizó, la visualización en geles TBE Novex 6% (Life Technologies, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), utilizando buffer de corrido BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Thermo-

Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), en relación 1:3 con el producto de PCR; utilizando Buffer Novex TBE 1X para corrido electroforético (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), en cada montaje se utilizó como referente marcador de peso VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis Technologies Sdn. Bhd, Selangor Darul Ehsan, Malaysia). El corrido se realizó en una cámara de electroforesis System XCell SureLock™ Mini-Cell (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), a 110V constantes durante 80 minutos. Se reveló sumergiendo los geles en Bromuro de Etidio diluido en agua destilada (0,5µg/1ml) durante 10 minutos, posteriormente se lavaron en agua grado biología molecular 2 veces durante 10 minutos cada una. Los geles se revelaron en el equipo BioRad Gel Doc™ XR+ Imager (Hercules, California, Estados Unidos) y se tomó registro fotográfico de cada gel.

2.10 Análisis de fragmentos

Se realizó la electroforesis capilar en un ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo el siguiente protocolo. Antes de comenzar, se denaturó el producto de PCR a montar a 5°C durante 5 minutos y posteriormente se hace un choque térmico directo al hielo para que el ADN se una por complementariedad y se generen homodupletas que serán posteriormente analizadas. Se utilizaron 20µl de Hi-Di Formamida, 4 µl de ROX500 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y 1µl del producto de PCR a analizar. Estos productos fueron leídos en un capilar convencional, utilizando como polímero de migración POP - 6.

2.11 Interpretación de los resultados.

Los geles se examinaron independientemente por el biólogo molecular y el médico patólogo. En las electroforesis en gel de poliacrilamida, todas las muestras que evidenciaron una banda definida en el rango establecido para cada tubo fueron consideradas como clonales; las muestras que no mostraban producto específico y solo se veía un barrido de ADN se determinaron como policlonales. El análisis de los reordenamientos se realizó con el Programa GeneMapper®, se evaluaron los picos

obtenidos en el electroferograma para cada caso, contemplando los rangos esperados. En caso que las bandas o picos fueran inespecíficos o no concluyentes se repetía nuevamente la técnica bajo las mismas condiciones. Cada caso se interpretó con base en hallazgos clínicos y anatomo-patológicos y se reportó siguiendo las recomendaciones de Langerak, 2012 (20).

2.12 Plan de análisis estadístico

Los datos se registraron en una tabla en Excel 2010® y posteriormente fueron exportados al software de análisis estadístico IBM SPSS Statistics 22®. Para conocer la normalidad de las variables cuantitativas se utilizó el test de U. de Mann-Whitney. El análisis univariado de estas se realizó mediante el cálculo de medidas de tendencia central y de dispersión; para las variables cualitativas se determinaron las frecuencias absolutas y relativas.

Finalmente se realizó un análisis bivariado para explorar la asociación entre las características inmunológicas, clínicas y demográficas de los pacientes con inmunodeficiencias primarias y el patrón de reordenamiento de los genes receptores de antígeno de los linfocitos T y B, por medio del cálculo de riesgos relativos (RR) y se realizó una corrección en el momento que se generaron valores nulos en alguno de los cruces, adicionando una unidad a cada casilla. Para la prueba de hipótesis se consideró significativo que el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) o un valor de $p < 0,05$.

2.13 Consideraciones éticas

Se consideró el artículo 11 de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, “Investigación sin riesgo: estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se

consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta”. De acuerdo con este enunciado, se consideró la fase 2 como investigación sin riesgo.

Los pacientes con inmunodeficiencias primarias fueron recibidos en el grupo de Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia y allí participaron en otros proyectos de investigación con su respectivo consentimiento informado, donde se especificaba que el ADN obtenido sería almacenado indefinidamente para participar en estudios posteriores. De cada paciente se tiene la copia del consentimiento informado, en caso de ser menor de edad, estaba firmado el asentimiento además del consentimiento firmado por los padres.

3. Capítulo 3: Resultados

3.1 Fase 1

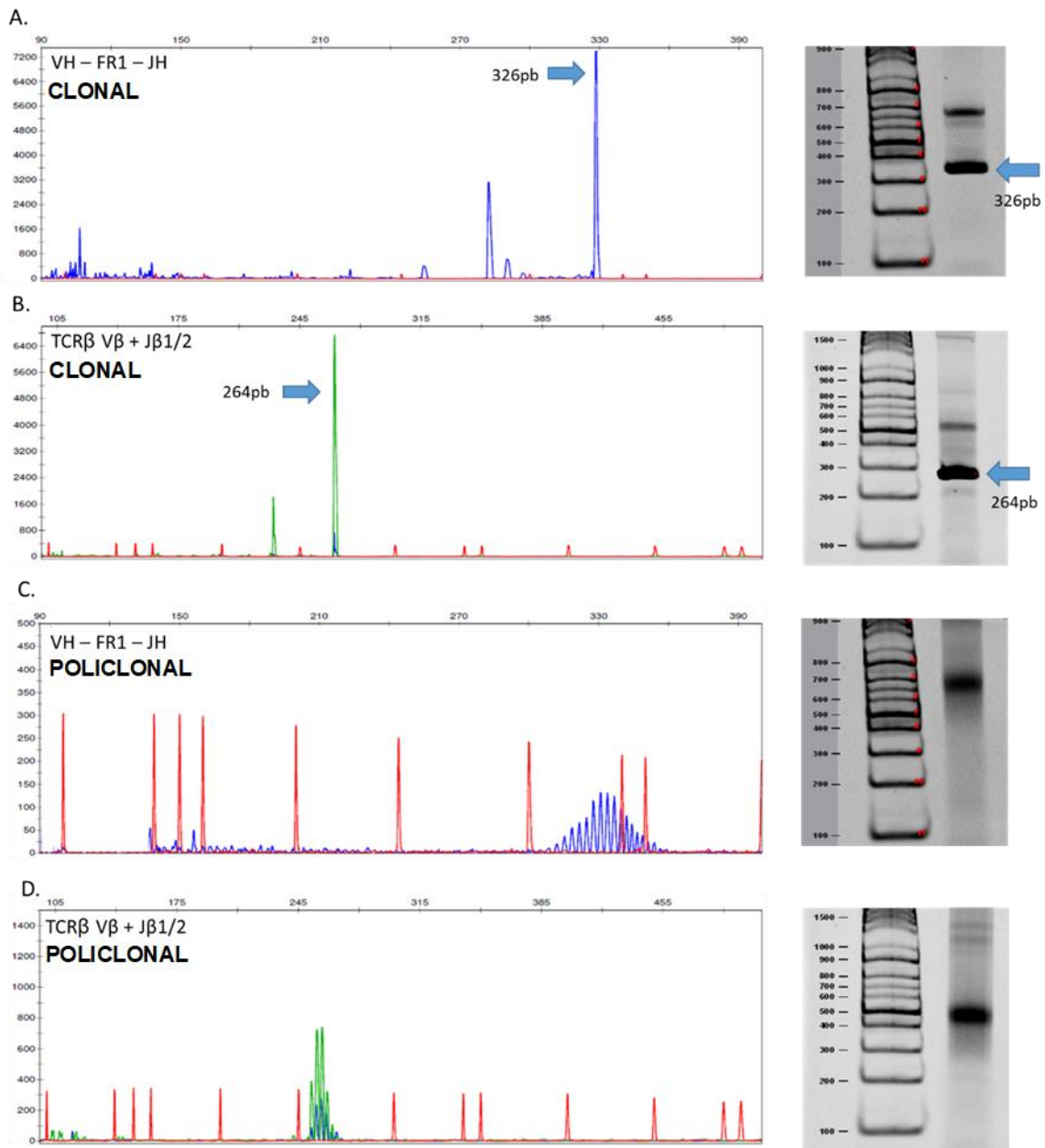
Los controles positivos (monoclonales) de cada PCR se usaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para los controles negativos (policlonales) se seleccionaron los siguientes tejidos:

- Ganglio y amígdala hiperplásica
- Biopsia de intestino sin neoplasia
- Pool de linfocitos de 6 personas adultas asintomáticas

Se definieron los mejores controles para cada PCR, y se decidió utilizar el ADN extraído de amígdalas hiperplásicas (Figura 6).|

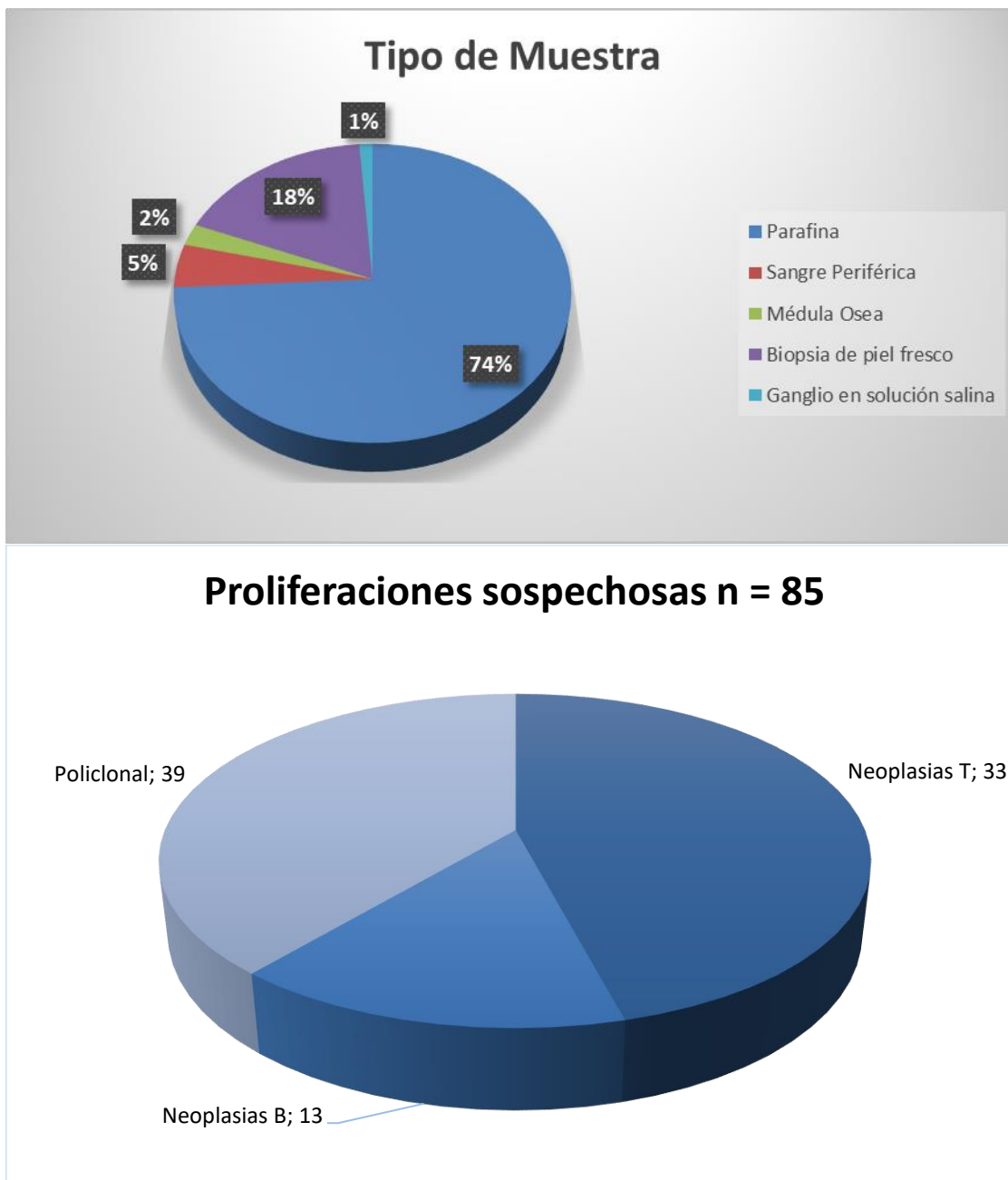
3.2 Fase 2

Se analizaron en total 86 casos pertenecientes a 49 hombres y 37 mujeres, con una edad promedio de 51.18 años (Rango: 9 – 92). Del total de los casos, en uno no se obtuvo el ADN suficiente para realizar la prueba y no fue posible obtener otra muestra para el procedimiento (1/86; 1,1%), teniendo una eficiencia de la prueba del 98.9%. De los 85 restantes se procesaron 63 tejidos FFEP (74.11%), 4 muestras de sangre periférica (4.70%), 2 aspirados de médula ósea (2.35%), 15 biopsias de piel en fresco (17.64%) y 1 ganglio en solución salina (1.17%) (Figura 7).

Figura 6. Ejemplos de resultados de clonalidad

Izquierda: Análisis de fragmentos visualizado por electroforesis capilar en un ABI Prism 310, utilizando como marcador de peso ROX500. Derecha: visualización por electroforesis en gel de poliacrilamida visualizado con bromuro de etidio. Junto a marcador de peso 100pb. A. patrón de reordenamiento clonal de A. VH - FR1 - JH y B. TCR β V β + J β 1/2 y el patrón policlonal de C. VH - FR1 - JH y D. TCR β V β + J β 1/2.

Figura 7. Distribución del tipo de tejido y el diagnóstico general de las proliferaciones estudiadas.



Aunque la prueba no está diseñada para determinar el linaje, en 2 pacientes (2.35%) esta fue la pregunta clínica con la que se recibió; en 3 pacientes (3.52%) se planteaba diferenciar un linfoma diagnosticado previamente con la lesión actual, en la cual se sospechaba era una neoplasia diferente. En los 80 pacientes restantes (94.11%), se buscaba establecer si era una condición reactiva o una neoplasia.

Los 85 casos analizados se agruparon de la siguiente manera de acuerdo con el diagnóstico final. En total se obtuvieron 39 (45.88%) proliferaciones reactivas; 33 (38.82) neoplasias de células T y 13 (15.29%) de neoplasias de células B (Figura 7).

De las 39 proliferaciones reactivas, 38 fueron hiperplasias linfoides reactivas (97.43%) y 1 prurigo (2.57%)

3.2.1 Proliferaciones de células T

De las 33 proliferaciones de células T, se diagnosticaron 4 Leucemias de linfocitos T grandes granulares (12.12%), 8 linfomas cutáneos de células T (24.24%), 1 Linfoma T anaplásico (3.03%), 1 Linfoma T doble positivo (3.03%), 2 linfomas T periféricos (6.06%), 15 micosis fungoides (45.45%), 1 papulosis linfomatoide (3.03%) y 1 síndrome de Sézary (3.03%). (Tabla 6)

3.2.2 Proliferaciones de células B

De las 13 proliferaciones de células B; 1 es un linfoma BALT (Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Linfoma asociado al bronquio) (7.69%), 2 linfomas MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Linfoma asociado a mucosa) (15.38%), 6 Linfoma B difuso de

célula grande (46.15%), 2 linfoma de la zona marginal (15.38%), 2 Sarcoma histiocítico derivado de linfoma (15.38%). (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de los diagnósticos finales de cada uno de los casos recibidos.

Diagnóstico Final	n	%
Proliferaciones T		
Leucemia de linfocitos T grandes granulares	4	4.71
Linfoma cutáneo de células T	8	9.41
Linfoma T anaplásico	1	1.18
Linfoma T doble positivo	1	1.18
Linfoma T periférico	2	2.35
Micosis Fungoide	15	17.65
Papulosis linfomatoide	1	1.18
Síndrome de Sézary	1	1.18
TOTAL	33	
Proliferaciones B		
Bronchus-Associated Lymphoid Tissue lymphoma	1	1.18
Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma	2	2.35
Linfoma B difuso de célula grande	6	7.06
Linfoma B de la zona marginal	2	2.35
Sarcoma histiocítico derivado de linfoma	2	2.35
TOTAL	13	
Proliferaciones Policlonales		
Hiperplasia linfoide reactiva	38	44.71
Prurigo	1	1.18
TOTAL	39	

Después de establecer los controles policlonales y monoclonales, además de definir los patrones de reordenamientos tanto de proliferaciones neoplásicas (T y B) y reactivas se procedió a analizar los pacientes con inmunodeficiencias primarias.

Dado que el análisis de fragmentos ofrece como resultado una curva normal en poblaciones policlonales y un solo pico en poblaciones clonales, se eligió esta técnica de visualización de los productos de PCR. El análisis de los productos por geles de acrilamida es excelente para detectar poblaciones predominantes o clonales pero no permite evaluar la distribución de las poblaciones no clonales.

3.3 Fase 3

Los pacientes con IDP que participaron en el estudio, tenían consentimiento informado que permitía el uso de su material genético almacenado para estudios posteriores. En total se recibieron 34 pacientes. Sin embargo, 3 de ellos no tenían los datos completos de la historia clínica o la clasificación inmunológica y fueron descartados del estudio. Los demás se utilizaron para los análisis posteriores. Los pacientes del estudio fueron agrupados de acuerdo con los criterios de la Sociedad Europea para las inmunodeficiencias (ESID). La edad de los pacientes fue agrupada en dos grupos. Hasta los 18 años y mayores de esta edad. (Tabla 7).

Tabla 7. Datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes.

Factor Asociado	n	%
Sexo		
Femenino	15	48.39
Masculino	16	51.61
Edad		

>18	16	51.61
<18	15	48.39
Inmunodeficiencia Primaria		
Inmunodeficiencia Común Variable	13	41.94
Agammaglobulinemia	2	6.45
Hipogammaglobulinemia	2	6.45
Deficiencia Selectiva de IgA	14	45.16
Características Clínicas		
Alergia	15	48.39
Enfermedades Gastro-intestinales	20	64.52
Tracto respiratorio	26	83.87
Piel / Mucosas	13	41.94
infecciones Tracto genito - urinario	3	9.68
Infecciones Profundas	4	12.90
Enfermedad Autoinmune	4	12.90
Complicaciones sistema endocrino	3	9.68
IDP asociada con síndromes	1	3.23
Cáncer	1	3.23

Los datos fueron tomados del registro de historias clínicas del grupo de inmunodeficiencias primarias de la UdeA.

Los pacientes presentaban en general numerosas manifestaciones clínicas. Las características clínicas más frecuentes fueron las infecciones del tracto respiratorio (83.87%) seguidas de las enfermedades gastro-intestinales (64.52%). Otras características frecuentes fueron Alergias (48.39%), y alteración en la piel o las mucosas (41.94%). Dada la heterogeneidad clínica de los pacientes, se agruparon los diagnósticos de acuerdo a cada una de las inmunodeficiencias y cada uno de los síntomas específicos para cada uno (Tabla 8).

El sexo de los pacientes no varía entre las diferentes inmunodeficiencias. Sin embargo, los grupos de edad sí tienen una marcada tendencia; en la IDCV predomina el grupo de mayores de 18 años (76.92%), mientras que en los pacientes con DslgA predominan los menores de 18 (71.43%). Todas las inmunodeficiencias presentaron al menos un tipo de alergia, siendo el Asma la más recurrente en todos pacientes (IDCV: 38.46%; ALX: 50%; HTI: 50%; DslgA: 35.71%).

Las infecciones del tracto respiratorio aparecen en todas las IDP, sin embargo, son más recurrentes en pacientes con IDCV (Neumonía: 69.23%, sinusitis: 38.46%, Otitis Media Aguda: 30.77%). Las infecciones de la piel y mucosas fueron recurrentes en pacientes con IDCV y en menor cantidad en pacientes con DslgA. Las infecciones del tracto genito-urinario, las infecciones profundas, enfermedades autoinmunes y complicaciones del sistema endocrino fueron exclusivas de los pacientes con IDCV. Uno de los pacientes con DslgA fue diagnosticado con Síndrome de Rowell; y uno con IDCV ya tenía un linfoma B difuso de célula grande en el momento del diagnóstico (Tabla 8).

Las poblaciones celulares fueron cuantificadas por citometría de flujo y clasificadas de acuerdo con su inmunofenotipo en cada uno de los grupos presentados en la figura 8; se organizaron y se evidenciaron aquellos que tenían alteración respecto a los valores esperados para el sexo y la edad (Figura 8). Aunque las IDP consideradas en este estudio se diagnostican y clasifican por los porcentajes de células B, se consideraron para este estudio también los linfocitos T. Los valores de cada paciente fueron comparados con los valores esperados en personas sanas de la misma edad y sexo.

Tabla 8. Síntomas de los pacientes agrupados por diagnóstico de cada inmunodeficiencia primaria.

Características clínicas	Inmunodeficiencia común variable (n= 13)		Agammaglobulinemia (n= 2)		Hipogammaglobulinemia (n= 2)		Deficiencia Selectiva de IgA (n= 14)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Sexo								
Femenino	6	46.15			1	50	8	57.14
Masculino	7	53.85	2	100	1	50	6	42.86
Edad								
>18	10	76.92	2	100			4	28.57
<18	3	23.08			2	100	10	71.43
Alergia								
Rinitis	4	30.77			1	50	3	21.43
Asma	5	38.46	1	50	1	50	5	35.71
Enfermedades Gastro intestinales								
Enfermedad diarreica crónica	4	30.77	2	100			4	28.57
reflujo gastroesofágico	2	15.38			1	50		
desnutrición proteico-calórica	2	15.38						
Colitis ulcerativa	1	7.69						
gastroenteritis	1	7.69						
giardiasis	1	7.69						
enteropatías	1	7.69						
hipertrofia nodular	1	7.69						
Esplenomegalia	1	7.69						
alergias alimentarias							1	7.14

Tracto respiratorio									
Neumonía	9	69.23	2	100	1	50	2	14.29	
Sinusitis recurrente	5	38.46	1	50			4	28.57	
Otitis Media Agua (OMA)	4	30.77	2	100	2	100	5	35.71	
Faringo-amigdalitis	2	15.38			1	50	1	7.14	
rinitis	2	15.38					2	14.29	
bronquiolitis					1	50	3	21.43	
faringitis					1	50	1	7.14	
aftas orales							1	7.14	
Piel / Mucosas									
Erisipela	2	15.38							
Forunculosis	1	7.69					2	14.29	
Candidiasis	2	15.38							
Varicela con uveítis	3	23.08							
Conjuntivitis	4	30.77							
Verrugas	2	15.38					1	7.14	
Herpes zoster	1	7.69							
Abscesos	2	15.38							
Celulitis	1	7.69							
dermatitis atópica							2	14.29	
Quistes de Bartolino							1	7.14	
Tracto genito - urinario									
infecciones	3	23.08							
Infecciones Profundas									
Sacroileítis	1	7.69							
artritis	2	15.38							
miocarditis	1	7.69							
Meningitis	1	7.69							

Enfermedad Autoinmune			
Anemia	3	23.08	
Lupus discoide	1	7.69	
Hepatitis autoinmune	1	7.69	
trombocitopenia idiopática	1	7.69	
Complicaciones sistema endocrino			
Hipotiroidismo	2	15.38	
Hiperparatiroidismo	1	7.69	
Hipocalcemia	1	7.69	
Panhipopituitarismo	1	7.69	
Hipogonadismo	1	7.69	
Alteración electrolítica crónica	1	7.69	
Acidosis tubular renal	1	7.69	
nefrocalcinosis	1	7.69	
Síndromes			
Síndrome de Rowell			1 7.14
Cáncer			
Linfoma B difuso de célula Grande	1	7.69	

El porcentaje fue calculado de acuerdo al valor de n de cada inmunodeficiencia primaria.

Las cuatro IDP analizadas en este estudio se caracterizan por una alteración en la producción y maduración de linfocitos B en diferentes puntos del desarrollo. Sin embargo, al observar los niveles de algunos subgrupos de linfocitos T, se pueden observar que también se encuentran alterados (Figura 8). El porcentaje de plasmocitos se encontró disminuido en los pacientes con IDCV (8/13 61.5%), así como los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (10/13 76.9%), y sin cambio de isotipo (7/13 53.8%). Además, se encontraron aumentados los niveles de linfocitos B vírgenes (7/13 53.8%) y transicionales (5/13 38.5%). En los pacientes con DsIgA se evidenciaron aumentos en los linfocitos B vírgenes (4/14 28.6%) y en los linfocitos B sin cambio de isotipo (4/14 28.6%). Sin embargo, los linfocitos B con cambio de isotipo presentaron en algunos pacientes una disminución (4/14 28.6%) (Figura 8).

Los linfocitos T (específicamente los CD4+), mostraron alteración en una mayor cantidad de pacientes. Los linfocitos CD4+ efectores terminalmente diferenciados (9/13 69.2%), los de memoria efectora (12/13 92.3%) se encontraron aumentados, y los linfocitos T CD4+ de memoria central (8/13 61.5%) se encontraron disminuidos en los pacientes con IDCV. Por su parte los pacientes con DsIgA tenían aumentada la población de los linfocitos T CD4+ efectores terminalmente diferenciados (7/14 50%) (Figura 8).

Figura 8. Análisis de las subpoblaciones de linfocitos.

	% de linfocitos B totales	% de linfocitos B maduros CD21+ a partir de linfocitos B	% de linfocitos B maduros CD21+ a partir de linfocitos B	% de linfocitos B vírgenes	% de linfocitos B transicionales	% de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo	% de linfocitos B de memoria SIN cambio de isotipo	% de linfocitos T totales	% de linfocitos T CD4+	% de linfocitos T CD4+ vírgenes	% de linfocitos T CD4+ de memoria central	% de linfocitos T CD4+ efectores terminalmente	% de linfocitos T CD4+ de memoria efectora	% de linfocitos T CD8+ vírgenes	% de linfocitos T CD8+ de memoria central	% de linfocitos T CD8+ efectores terminalmente	% de linfocitos T CD8+ de memoria efectora	% de linfocitos T CD8+	% de linfocitos NK	% de monocitos	% de plasmablastos	
Inmunodeficiencia común variable	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Agammaglobulinemia	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
Hipogammaglobulinemia	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
Deficiencia Selectiva de IgA	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	

Los números de cada una de las poblaciones celulares fueron calculados de acuerdo a los valores esperados para personas en condiciones normales del mismo sexo y edad.

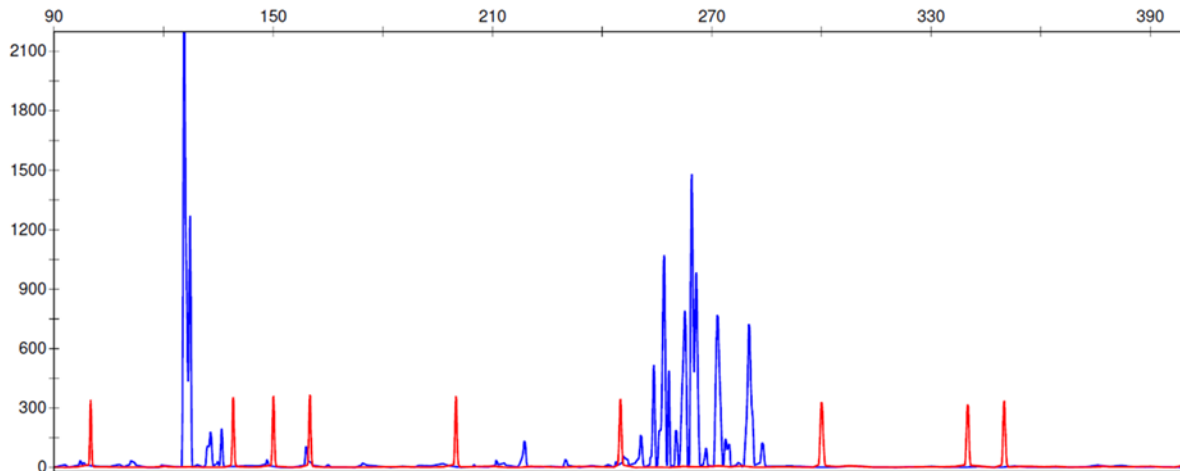
Blanco: Pacientes con niveles normales.

Rojo: Pacientes con niveles aumentados respecto a los valores de referencia.

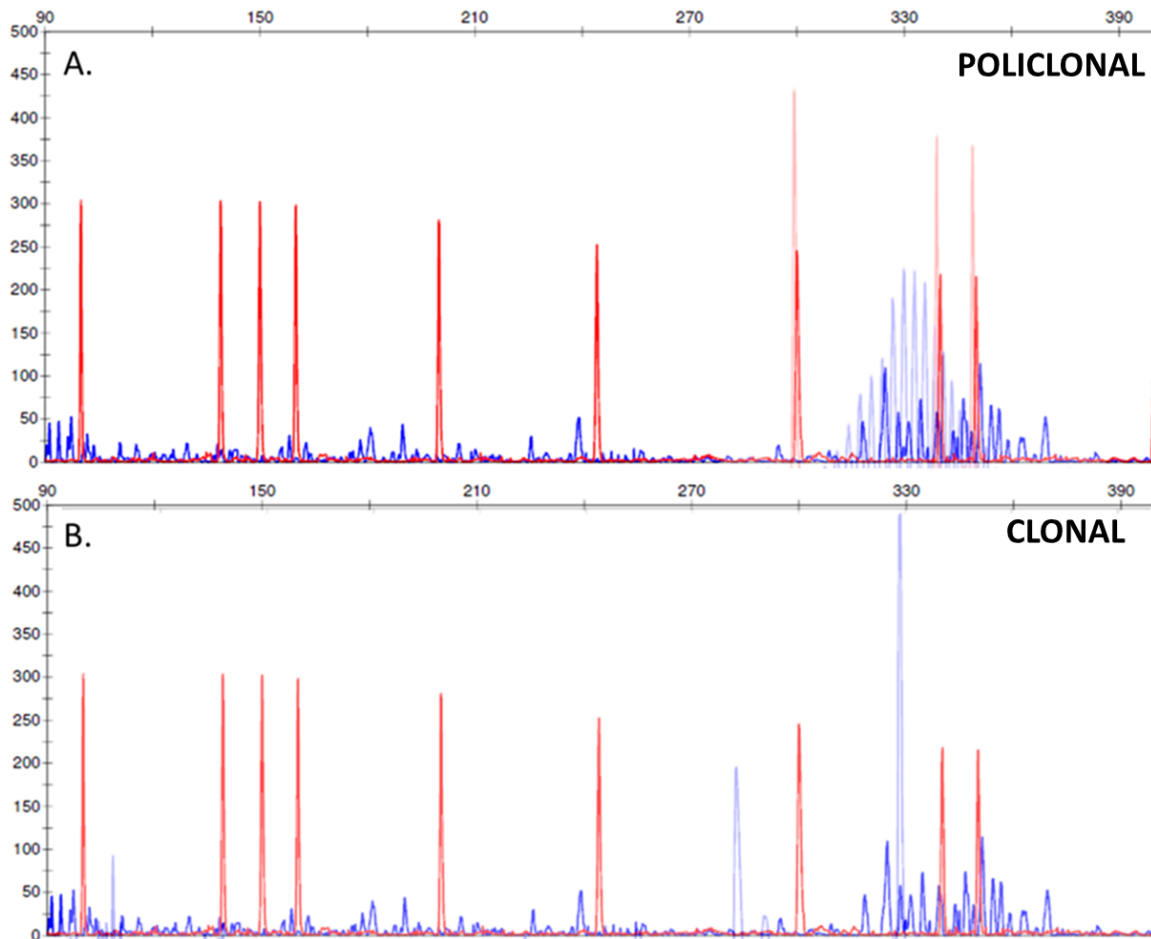
Azul: Pacientes con niveles disminuidos respecto a los valores de referencia.

Los reordenamientos de las inmunoglobulinas y del receptor de células T fueron evaluados por análisis de fragmentos. Los resultados esperados eran similares a la Fase 1 del estudio. Sin embargo, en los pacientes con IDP se evidenció un patrón de reordenamiento al cual denominamos “perfil irregular” (Figura 9) por no cumplir las características de ningún otro patrón (monoclonal/policlonal). El perfil irregular se caracteriza por no tener un patrón definido, varía entre reordenamientos y en cada uno de los pacientes. Se caracteriza por tener varios picos predominantes en un fondo policlonal pero sin la distribución típica tipo campana de gauss de las muestras de personas sanas (Figura 9).

Figura 9. Perfil Irregular.



La distribución particular en los pacientes con IDP se evidencia con una distribución aleatoria de picos en el electroferograma que no evidencia una distribución típica (policlonal o clonal), evidenciando alteraciones en las poblaciones linfoides.

Figura 10. Distribución del perfil irregular de un paciente con IDCV

superpuesto con el perfil policlonal (A) y clonal (B), tal como se observa en un analizador de fragmentos. En rojo: Marcador de peso ROX 500. Azul oscuro: Perfil irregular.

El perfil irregular apareció en al menos una de las familias de reordenamientos de cada una de las IDP del estudio (Figura 10). En pacientes con IDCV, los reordenamientos de IgH muestran el perfil irregular en más del 50% de los casos (FR1: 76.92%, FR2: 61.54%, FR3: 53.85%), IgK aparece irregular en menor medida (Vk: 15.38%, Vk-Kde: 69.23%). Dos de los pacientes mostraron un perfil monoclonal, el cual como se dijo anteriormente, estaba asociado con la restricción completa del repertorio y a su vez con un mayor riesgo de desarrollar neoplasias

(Figura 10); el único paciente con IDCV que fue diagnosticado con Linfoma B difuso de célula grande tenía reordenamientos en las dos familias de Igk. En el momento de analizar los reordenamientos del receptor de células T, el patrón irregular apareció en al menos el 45% de los casos en todas las familias (Figura 10), el perfil clonal se evidenció únicamente en los reordenamientos de la cadena gamma TCR γ , lo que podría sugerir una alteración también de los linfocitos T en estos pacientes.

Ninguno de los pacientes con Agammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia y deficiencia selectiva de IgA presentaron reordenamientos clonales en Ig. Sin embargo, en algunos de ellos si se evidenció el mismo perfil irregular de los pacientes con IDCV, aunque en los pacientes con DslgA un menor porcentaje (FR1: 7:14%, FR2: 21.43%, FR3 21.43%, V κ : 7.14%, V κ -Kde: 35.71%). Dada las características biológicas y clínicas de la DslgA, no se esperaba que evidenciara alteraciones en los patrones de reordenamientos del TCR, sin embargo, estas alteraciones se vieron en algunos de los pacientes lo que podría sugerir que los reordenamientos de este también están implicados en el desarrollo de la enfermedad.

Figura 11. Reordenamientos de los pacientes con IDP estudiadas.

	V _H - FR1 - J _H	V _H - FR2 - J _H	V _H - FR3 - J _H	V _k - J _k	V _k /INTR - Kde	V _β - J _{β1/2}	V _β - J _{β2}	D _β - J _β	V _{γ1-8, 10} - J _γ	V _{γ9, 11} - J _γ
Inmunodeficiencia común variable	Verde	Verde	Morado	Rojo	Verde	Verde	Verde	Morado	Verde	Verde
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde
	Verde	Verde	Morado	Azul	Azul	Verde	Verde	Morado	Azul	Verde
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde
	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde
	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Azul	Azul	Verde
	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde
	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde
	Verde	Azul	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Azul	Verde
Agammaglobulinemia	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
Hipogammaglobulinemia	Azul	Verde	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
Deficiencia Selectiva de IgA	Azul	Verde	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Verde	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Verde	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul
	Azul	Azul	Azul	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde	Azul

Distribución de los patrones de reordenamiento de cada uno de los genes analizados, en cada uno de los pacientes. Azul: Policlonal. Rojo: Monoclonal. Morado: No reordenó. Verde: Irregular.

Finalmente, se realizó una correlación de Fisher comparando las poblaciones celulares que se encontraban alteradas en mayor frecuencia con el perfil irregular evidenciado en cada uno de los genes evaluados. Se consideró estadísticamente significativo todo valor de $p < 0.05$. Se calculó el riesgo relativo (RR) para cada una de las combinaciones y los resultados significativos obtenidos fueron los siguientes:

Los casos de IDCV con alteración en el número de linfocitos B con cambio de isotipo (CD19+, CD27+, IgM+, IgD-) mostraron menor posibilidad de presentar alteración de reordenamientos del gen Igk Vk - Jk (RR: 0,13 p:0,0221). Entre tanto, en pacientes con DsIgA y alteración numérica de los linfocitos B con cambio de isotipo mostraban tendencia a presentar reordenamientos alterados de TCR β V β + J β 2 (RR: 6,2 p: 0,0317) (Tabla 9).

Los linfocitos T CD4+ vírgenes (CD4+, CD3hi, TCR α/β hi) de los pacientes con IDCV mostraron un mayor riesgo a presentar en perfil irregular en TCR γ V γ 9, V γ 11+ J γ (RR: 4,5 p: 0,0175) y en los linfocitos T CD4+ de memoria efectora (CD4+, CD3, TCR α/β hi, CXCDR3+, CD62L-, CCR7-) un factor protector tanto en reordenamientos de gen IgH VH – FR1 – JH en pacientes con DsIgA (RR: 0,4 p: 0,0441) como en pacientes con IDCV de Igk Vk - Jk (RR: 0,2 p:0,0423) (Tabla 9).

Tabla 9. Correlación de Fisher

	VH - FR1 - JH				VH - FR2 - JH				VH - FR3 - JH				Vk - Jk				Vk - Kde + intron Kde			
	Irr	No irr	RR (IC95%)	p	Irr	No irr	RR (IC95%)	p	Irr	No irr	RR (IC95%)	p	Irr	No irr	RR (IC95%)	p	Irr	No irr	RR (IC95%)	p
Linfocitos B vírgenes																				
IDCV	6	3	0,8 (0,4 - 1,0)*	0.3946	5	4	0,7 (0,3 - 1,7)	0.4895	5	4	1,1 (0,3 - 3,4)	0.6573	1	8	0,4 (0,03 - 5,5)	0.5218	8	1	3,5 (0,6 - 19,7)	0.0517
DslgA	1	6	2,0 (0,2 - 18,3)*	0.5	1	6	1,0 (0,07 - 13,0)	0.7692	2	5	2,0 (0,2 - 17,3)	0.5	0	7	0,5 (0,05 - 4,5)*	0.5271	3	4	1,5 (0,3 - 6,3)	0.5
Linfocitos B transicionales																				
IDCV	4	2	0,8 (0,4 - 1,5)	0.4371	3	3	0,7 (0,3 - 1,8)	0.4126	3	3	0,7 (0,2 - 1,7)	0.4126	0	6	0,5 (0,05 - 4,5)*	0.5271	4	2	0,9 (0,4 - 1,9)	0.6573
DslgA	1	3	4,0 (0,4 - 35,8)*	0.2451	1	3	1,3 (0,2 - 10,2)	0.6703	1	3	1,2 (0,1 - 10,2)	0.6703	0	4	1,0 (0,1 - 8,9)*	1	1	3	0,6 (0,09 - 4,01)	0.5455
Linfocitos B con cambio de isotipo																				
IDCV	8	2	1,2 (0,5 - 2,8)	0.5804	7	3	2,1 (0,4 - 11,0)	0.3147	6	4	1,8 (0,3 - 9,6)	0.4371	0	10	0,13 (0,01 - 1,03)*	0.0221	7	3	1,05 (0,4 - 2,5)	0.7063
DslgA	1	5	2,5 (0,3 - 2,9)*	0.4118	2	4	2,7 (0,3 - 23,0)	0.3846	2	4	2,6 (0,3 - 22,9)	0.3846	0	6	0,6 (0,06 - 5,7)*	0.6714	3	3	2 (0,4 - 8,4)	0.342
Linfocitos B sin cambio de isotipo																				
IDCV	6	1	1,3 (0,7 - 2,4)	0.4371	6	1	2,6 (0,8 - 8,3)	0.0862	4	3	1,1 (0,4 - 3,1)	0.6166	0	7	0,2 (0,03 - 2,3)*	0.2004	5	2	1,07 (0,5 - 2,2)	0.6573
DslgA	0	9	0,3 (0,03 - 2,9)*	0.326	2	7	1,1 (0,1 - 9,4)	0.7253	2	7	1,1 (0,1 - 9,4)	0.7253	1	8	1,2 (0,1 - 11,5)*	0.8288	4	5	2,2 (0,3 - 14,8)	0.3776
Plasmocitos																				
IDCV	6	2	0,9 (0,5 - 1,7)	0.6853	4	4	0,6 (0,3 - 1,4)	0.3155	5	3	1,5 (0,4 - 5,1)	0.4126	1	7	1,2 (0,1 - 11,5)	0.8288	7	1	2,1 (0,7 - 6,6)	0.1189
DslgA	1	3	4,0 (0,5 - 5,8)*	0.2451	0	4	0,5 (0,07 - 3,5)*	0.4391	2	2	5,0 (0,6 - 40,9)	0.1758	0	4	0,6 (0,04 - 7,8)*	0.7154	1	3	0,6 (0,09 - 4,01)	0.5455
Linfocitos T CD4+ vírgenes																				
IDCV	3	1	0,9 (0,5 - 1,9)	0.7063	2	2	0,8 (0,3 - 2,2)	0.5105	2	2	0,9 (0,2 - 2,8)	0.6573	0	4	1 (0,1 - 8,9)*	1.000	2	2	0,6 (0,2 - 1,8)	0.3538
DslgA	0	0	4,0 (0,6 - 26,7)*	0.3137	0	0	2,0 (0,4 - 10,2)*	0.4902	0	0	2,0 (0,3 - 10,1)*	0.4902	0	0	0,6 (0,08 - 4,6)*	0.6223	0	0	1,3 (0,2 - 6,1)*	0.6405
Linfocitos T CD4+ de memoria central																				
IDCV	6	2	0,9 (0,5 - 1,7)	0.6853	6	2	1,9 (0,6 - 5,9)	0.2494	4	4	0,8 (0,3 - 2,2)	0.5874	1	7	0,6 (0,04 - 7,8)*	0.7154	6	2	1,2 (0,5 - 2,8)	0.5105
DslgA	0	1	2,7 (0,3 - 21,0)*	0.4221	1	0	2,7 (0,8 - 8,6)*	0.2219	0	1	1,3 (0,2 - 8,1)*	0.6244	0	1	2,6 (0,3 - 20,9)*	0.3638	1	0	1,7 (0,6 - 4,9)*	0.3756
Linfocitos T CD4+ terminalmente diferenciados																				
IDCV	6	3	0,8 (0,4 - 1,4)*	0.3946	6	3	1,3 (0,5 - 3,9)	0.5105	3	6	0,4 (0,1 - 1,0)*	0.0882	1	8	0,4 (0,03 - 5,4)	0.5218	7	2	1,5 (0,5 - 4,4)	0.3538
DslgA	1	6	2,0 (0,2 - 18,3)*	0.5	1	6	0,5 (0,06 - 4,3)	0.5	2	5	2,0 (0,2 - 17,3)	0.5	0	7	0,5 (0,05 - 4,5)*	0.5271	2	5	0,6 (0,1 - 2,8)	0.5
Linfocitos T CD4+ de memoria efectora																				
IDCV	9	3	1,1 (0,5 - 2,5)*	0.6765	8	4	1,9 (0,4 - 10,0)*	0.3603	6	6	0,7 (0,2 - 1,9)*	0.5471	1	11	0,2 (0,04 - 0,9)*	0.0423	8	4	0,9 (0,3 - 2,3)*	0.7279
DslgA	1	2	0,4 (0,1 - 1,3)*	0.0441	0	3	0,7 (0,09 - 4,5)*	0.5675	0	3	0,6 (0,09 - 4,4)*	0.5675	0	3	1,3 (0,1 - 11,3)*	0.8139	1	2	0,9 (0,1 - 5,4)	0.7253
Linfocitos T CD8+ de memoria central																				
IDCV	4	2	0,8 (0,4 - 1,5)	0.4371	4	2	1,2 (0,5 - 2,7)	0.5874	2	4	0,4 (0,1 - 1,5)	0.2086	0	6	0,3 (0,04 - 2,9)*	0.3121	5	1	1,4 (0,6 - 3,04)	0.342
DslgA	0	2	1,8 (0,2 - 14,7)*	0.5539	1	1	3,0 (0,5 - 19,6)	0.3956	1	1	6,0 (0,5 - 61,8)	0.2747	0	2	1,7 (0,2 - 14,6)*	0.6121	1	1	1,3 (0,2 - 6,7)	0.641

	Vβ + Jβ 1/2					Vβ + Jβ 2					Dβ + Jβ 1/2					Vy 1 - 8, Vy10 + Jy					Vy 9, Vy11+ Jy				
	Irr	No irr	RR	(IC95%)	p	Irr	No irr	RR	(IC95%)	p	Irr	No irr	RR	(IC95%)	p	Irr	No irr	RR	(IC95%)	p	Irr	No irr	RR	(IC95%)	p
Linfocitos B vírgenes																									
IDCV	6	3	0,7 (0,4 - 1,3)*	0,3946		6	3	0,7 (0,4 - 1,3)*	0,3946		4	5	0,8 (0,2 - 3,01)	0,6573		1	8	1,09 (0,1 - 9,6)*	0,7574		8	1	0,9 (0,6 - 1,5)*	0,7279	
DslgA	0	7	0,5 (0,05 - 4,5)*	0,5		3	4	3,0 (0,4 - 22,3)	0,2797		1	6	1,0 (0,07 - 13,01)	0,7692		1	6	1,0 (0,07 - 13,01)	0,7692		0	6	1,1 (0,08 - 15,1)*	0,7353	
Linfocitos B transicionales																									
IDCV	4	2	0,7 (0,4 - 1,4)	0,4371		4	2	0,7 (0,4 - 1,4)	0,4371		3	3	1,1 (0,3 - 3,7)	0,6166		1	5	2,2 (0,2 - 20,3)*	0,4529		5	1	0,8 (0,5 - 1,3)*	0,4529	
DslgA	0	4	1,0 (0,1 - 8,9)*	0,7304		2	2	2,5 (0,5 - 12,1)	0,3107		0	4	0,6 (0,08 - 5,1)*	0,5931		1	3	2,5 (0,2 - 30,9)	0,5055		0	4	2,0 (0,1 - 26,7)*	0,5686	
Linfocitos B con cambio de isotipo																									
IDCV	8	2	1,2 (0,5 - 2,8)	0,5804		8	2	1,2 (0,5 - 2,8)	0,5804		5	5	1,5 (0,2 - 8,3)	0,5629		1	9	0,8 (0,09 - 7,2)*	0,6765		9	1	1,04 (0,6 - 1,7)*	0,6765	
DslgA	0	6	0,6 (0,06 - 5,7)*	0,5882		4	2	6,2 (0,9 - 43,2)*	0,0317		0	6	0,4 (0,05 - 3,2)*	0,3824		1	5	1,3 (0,1 - 17,2)	0,6923		0	6	1,2 (0,09 - 17,01)*	0,7059	
Linfocitos B sin cambio de isotipo																									
IDCV	6	1	1,2 (0,6 - 2,4)	0,4371		6	1	1,2 (0,6 - 2,4)	0,4371		3	4	0,8 (0,2 - 2,7)	0,6166		1	6	1,7 (0,1 - 16,09)*	0,5471		6	1	0,8 (0,5 - 1,3)*	0,5471	
DslgA	0	9	0,3 (0,03 - 2,8)*	0,326		2	7	0,5 (0,1 - 2,8)	0,4545		1	8	0,5 (0,04 - 7,09)	0,6044		1	8	0,5 (0,04 - 7,09)	0,6044		0	9	0,6 (0,04 - 8,6)*	0,6405	
Plasmocitos																									
IDCV	6	2	0,9 (0,5 - 1,6)	0,6853		6	2	0,9 (0,5 - 1,6)	0,6853		5	3	3,1 (0,4 - 19,5)	0,1795		1	7	1,4 (0,1 - 12,6)*	0,6397		8	0	1,05 (0,7 - 1,5)*	0,6691	
DslgA	1	3	2,5 (0,2 - 30,9)	0,5055		1	3	0,8 (0,1 - 5,8)	0,6893		1	3	2,5 (0,2 - 30,9)	0,5055		1	3	2,5 (0,2 - 30,9)	0,5055		0	4	2,0 (0,1 - 26,7)*	0,5686	
Linfocitos T CD4+ vírgenes																									
IDCV	3	1	0,9 (0,4 - 1,8)	0,7063		3	1	0,9 (0,4 - 1,8)	0,7063		1	3	0,4 (0,07 - 2,7)	0,3427		0	4	0,9 (0,1 - 8,1)*	0,7279		4	0	4,5 (1,2 - 16,8)*	0,0175	
DslgA	0	0	4,0 (0,5 - 26,6)*	0,3137		0	0	1,6 (0,3 - 7,6)*	0,5686		0	0	2,6 (0,4 - 14,9)	0,4052		0	0	4,0 (0,5 - 26,6)*	0,3137		0	0	8,0 (0,7 - 83,8)*	0,2157	
Linfocitos T CD4+ de memoria central																									
IDCV	6	2	0,9 (0,5 - 1,6)	0,6853		6	2	0,9 (0,5 - 1,6)	0,6853		3	5	0,6 (0,1 - 1,9)	0,4126		1	7	1,4 (0,1 - 12,6)*	0,6397		7	1	0,9 (0,6 - 1,4)*	0,6397	
DslgA	1	0	5,3 (1,1 - 24,4)*	0,097		0	1	1,06 (0,1 - 6,1)*	0,7049		0	1	1,7 (0,2 - 11,8)*	0,5304		0	1	2,6 (0,3 - 20,9)*	0,4221		0	1	5,3 (0,4 - 63,8)*	0,2982	
Linfocitos T CD4+ terminalmente diferenciados																									
IDCV	6	3	0,7 (0,4 - 1,3)*	0,3946		6	3	0,7 (0,4 - 1,3)*	0,394		3	6	0,4 (0,1 - 1,3)	0,2168		1	8	1,09 (0,1 - 9,6)*	0,7574		9	0	1,3 (0,7 - 2,4)*	0,2721	
DslgA	1	6	2,0 (0,2 - 18,3)*	0,5		1	6	0,3 (0,04 - 2,4)	0,2797		2	5	3,0 (0,3 - 23,6)*	0,2882		0	7	0,3 (0,04 - 2,6)*	0,2882		0	7	1,0 (0,07 - 13,6)*	0,7647	
Linfocitos T CD4+ de memoria efectora																									
IDCV	9	3	1,07 (0,4 - 2,5)*	0,6765		9	3	1,07 (0,4 - 2,5)*	0,6765		5	7	0,6 (0,2 - 1,7)*	0,4529		1	11	0,4 (0,05 - 3,3)*	0,4647		10	1	1,2 (0,5 - 2,9)*	0,4893	
DslgA	0	3	1,3 (0,1 - 11,3)*	0,6495		1	2	1,2 (0,1 - 7,9)	0,6703		0	3	0,8 (0,1 - 6,4)*	0,701		0	3	0,8 (0,1 - 6,4)*	0,701		0	3	2,6 (0,1 - 34,06)*	0,4902	
Linfocitos T CD8+ de memoria central																									
IDCV	4	2	0,7 (0,4 - 1,4)	0,6495		4	2	0,7 (0,4 - 1,4)	0,4371		2	4	0,5 (0,1 - 2,1)	0,3834		1	5	2,2 (0,2 - 20,3)*	0,4529		6	0	1,1 (0,7 - 1,7)*	0,5471	
DslgA	0	2	1,7 (0,2 - 14,6)*	0,5539		0	2	0,6 (0,1 - 4,05)*	0,5546		0	2	1,1 (0,1 - 8,3)*	0,6729		0	2	1,16 (0,1 - 8,3)*	0,6729		0	2	3,5 (0,2 - 44,3)*	0,4052	

Entre las poblaciones celulares en inmunodeficiencia común variable IDCV y en deficiencia selectiva de IgA y el patrón irregular en el análisis de reordenamientos de los genes del receptor de antígeno. Se tomaron como estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$. (*) Se añadió una unidad a cada análisis. Irr: Perfil Irregular. No: Perfil no irregular (policlonal o clonal). RR: Riesgo Relativo. IC95%: Intervalo de confianza. IDCV: Inmunodeficiencia común variable. DslgA: Deficiencia Selectiva de IgA.

4. Discusión

En este estudio se utilizaron los protocolos BIOMED 2 de PCR Multiplex para evaluar los reordenamientos que ocurren en las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y en las cadenas beta y gamma del Receptor de células T en poblaciones de linfocitos de pacientes sanos, en pacientes con una linfoproliferación ya determinada y en pacientes con un grupo de inmunodeficiencias primarias caracterizadas por fallas cuantitativas en las poblaciones de linfocitos, tales como IDCV, DsIgA, Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia y Agammaglobulinemia ligada al X.

Los protocolos BIOMED – 2 utilizados en el estudio son considerados actualmente es la norma de oro para definir si una proliferación es clonal o no superando la citometría de flujo (80–83). Aunque es posible realizar este análisis por secuenciación de nueva generación, el protocolo de mayor utilización en el mundo es el de PCR múltiple.

Hemos encontrado los siguientes resultados de interés:

En el análisis de reordenamientos de Ig y TCR en pacientes con proliferaciones linfoides sospechosas de malignidad (FASE 2)

Las proliferaciones linfoides de diagnóstico más difícil son los linfomas cutáneos y los linfomas asociados con el tejido linfoide presente en mucosas. Los reordenamientos obtenidos para cada lesión son los esperados en la literatura. Hay reordenamientos simultáneos de TCR e Ig en ciertos linfomas, tales como el linfoma B difuso de célula grande, el linfoma de la zona marginal y el sarcoma histiocítico derivado de linfoma.

La eficiencia obtenida de la prueba en la Fase 2 del estudio (98.9%) muestra la importancia y utilidad que tiene la prueba en el diagnóstico patológico de rutina. Nuestros resultados muestran que las proliferaciones linfoides de diagnóstico más difícil son los linfomas cutáneos y los linfomas B difuso de célula grande. Los reordenamientos obtenidos para cada lesión son los esperados en la literatura.

Un hallazgo interesante fue la presencia de reordenamientos del TCR en linfomas B difuso de célula grande, linfomas de la zona marginal y sarcoma histiocítico derivado de linfoma. Esto podría explicarse por dos razones principales. Los linfocitos acompañantes del microambiente tumoral son clonales y comparten los mismos reordenamientos del TCR o las características aberrantes de las células tumorales permiten que reordene los genes del TCR sin necesidad de expresarlos (84).

En el estudio de inmunodeficiencias los principales hallazgos fueron.

- **Hay alteraciones de los patrones de reordenamientos tanto del TCR como de IG en las cuatro inmunodeficiencias estudiadas**
- **La inmunodeficiencia común variable es la más severa desde el punto de vista clínico, mayores alteraciones del repertorio y más alteraciones numéricas de las poblaciones de linfocitos**
- **Hay asociación entre perfil irregular de los reordenamientos y alteraciones gastrointestinales**

Numerosos pacientes de la serie de inmunodeficiencias estudiada presentaron alteraciones de los patrones de reordenamientos de TCR e Inmunoglobulinas, lo cual podría tener relación con las fallas en la función de las poblaciones linfocitarias.

Las enfermedades elegidas en este proyecto comparten alteraciones en el desarrollo de los linfocitos B; sin embargo, encontramos que la deficiencia selectiva de IgA, la hipogammaglobulinemia y la agammaglobulinemia presentan muchas menos alteraciones cuantitativas de las poblaciones de linfocitos y muchas menos alteraciones de los patrones de reordenamientos.

Los perfiles irregulares obtenidos en el estudio de los reordenamientos podrían deberse a una disminución del repertorio y a una falla en la producción de linfocitos (Figura 11). Es posible que haya una marcada disminución tanto en las cantidades celulares como en la diversidad y especificidad de las mismas, lo que se podría relacionar con la pobre respuesta inmune, la autoinmunidad y la heterogeneidad clínica. Según algunos autores, estas situaciones de reducción del repertorio son factores de riesgo para el desarrollo de leucemias y linfomas, ya que hay una alteración en la homeostasis del sistema. Al parecer, la diversidad clonal es necesaria para suprimir poblaciones emergentes (85–87). En nuestro estudio hay una marcada alteración de los patrones de reordenamiento en el grupo de pacientes con IDCV, lo cual concuerda con el hecho de que el riesgo de desarrollar linfomas en estos pacientes es de 12 a 18 veces más elevado que el de la población general (88) y más alto que el de las otras 3 inmunodeficiencias primarias estudiadas (89).

En cuanto a las características clínicas, las inmunodeficiencias estudiadas son un grupo de enfermedades heterogéneas. Tal como evidenciamos en este estudio, los síntomas de los pacientes son variados, y pueden presentar más de uno. Sin embargo, hay algunos más recurrentes como las alergias o infecciones respiratorias (90–92). Otros síntomas como alteraciones del sistema endocrino no tienen una asociación directa con la enfermedad pero pueden ser producto de complicaciones secundarias.

La gravedad y distribución de los síntomas varía con el tipo de inmunodeficiencia; así, la inmunodeficiencia común variable presenta manifestaciones clínicas mucho más graves que las restantes enfermedades analizadas; en particular, llama la atención la frecuencia de enfermedades gastrointestinales. Se sabe que en IDCV pueden presentarse lesiones inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal, similares a enfermedad celíaca y enfermedad inflamatoria intestinal, las cuales, además de revestir gravedad clínica aumentan el riesgo de desarrollar linfomas (93).

La cuantificación celular por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos en pacientes con IDP es considerada la herramienta diagnóstica de esta enfermedad (correlacionada con la clínica) sin embargo, no en todos los pacientes estas alteraciones son tan evidentes pues presentan niveles normales.

Aunque algunas poblaciones de linfocitos no mostraron alteraciones significantes, otras sí, como los linfocitos B de memoria (con y sin cambio de isotipo) en pacientes con IDCV se encontraron disminuidas en más del 50% de los pacientes. La disminución de este subgrupo de linfocitos se ha asociado en estudios anteriores con un aumento en el riesgo de autoinmunidad, enfermedades granulomatosas y otras complicaciones frecuentes de la IDCV (94,95). Sin embargo, el aumento de las poblaciones de linfocitos T CD4+ no ha sido asociado aún a algún síntoma clínico por lo que sugerimos que puede estar relacionado por las infecciones en piel y las mucosas dado el nicho de acción de estas células.

La patogénesis actual de las IDP del estudio enfatiza en los defectos de la activación y maduración de linfocitos B periféricos. Un estudio describió patrones de subpoblaciones de linfocitos B determinados por citometría de flujo y cuantificando los círculos de escisión de la recombinación de la cadena Kappa (KREC), para evaluar los clones de células B durante el desarrollo y posibles defectos del desarrollo tardío de estos (96,97). Los hallazgos encontrados en este estudio evidencian que no solo la cadena kappa evidencia alteraciones del desarrollo, sino que el repertorio de la cadena pesada está implicada en las alteraciones de las inmunodeficiencias, además de mostrar daños de los reordenamientos V(D)J. Además se evidencian alteraciones de los genes de las cadenas Beta y Gamma del TCR lo que también podría explicar las fallas en la diferenciación y presentación de antígeno de estos pacientes.

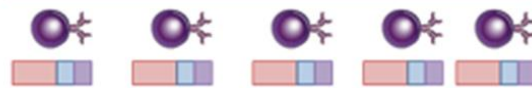
Clasificaciones actuales de las IDP, en específico de la IDCV, tienen en cuenta las poblaciones de linfocitos B y T pues ya se demostró su participación en el desarrollo de la enfermedad (98), en este estudio se está evidenciando además como la maduración de los linfocitos T en la periferia también se está viendo afectado lo que sugiere que hay un defecto en la selección y proliferación de linfocitos de manera general en los pacientes.

El único paciente con IDCV que desarrolló linfoma B difuso de célula grande, ejemplifica el elevado riesgo de estos pacientes a desarrollar cáncer. En este paciente 4 de los 10 reordenamientos fueron monoclonales (típico de una neoplasia linfoide) y los demás fueron perfiles irregulares lo que sustenta la idea de que puede haber una relación directa entre el perfil irregular y su evolución a clonal (neoplasia).

Figura 11. Posibles condiciones de reordenamientos en la maduración normal de los linfocitos y posible manera de cómo se forman los perfiles irregulares.



Diferentes poblaciones celulares
con diferentes reordenamientos.
EN CONDICIONES NORMALES
PERFIL: POLICLONAL.



Diferentes poblaciones celulares
con los mismos reordenamientos.
EN CONDICIONES ANORMALES,
Favorece desarrollo de neoplasias
linfoides
PERFIL: MONOCLONAL.



Irregularidades en la distribución de
reordenamientos
EN CONDICIONES ANORMALES
PERFIL: IRREGULAR.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- La heterogeneidad de síntomas de los pacientes con inmunodeficiencias primarias no permite una clasificación clínica precisa; sin embargo, existe una relación directa entre la cantidad de síntomas y la gravedad de la enfermedad.
- La inmunodeficiencia común variable es la que mayor evidencia de síntomas clínicos y alteraciones celulares presenta, que se asocia con la presencia de un perfil irregular de los reordenamientos tanto de las células B como de las células T.
- Los reordenamientos del receptor de antígeno evidenciaron la alteración de la clonalidad de estos lo que estaría representando una alteración inmunológica funcional, y cuantitativa de los linfocitos circulantes en los pacientes con IDP.
- El perfil irregular evidencia una alteración biológica en los linfocitos de los pacientes con IDP por lo que representaría un predictor del desenlace de la enfermedad.

5.2 Recomendaciones

Este estudio es limitado por el escaso número de pacientes y porque es descriptivo. No obstante, podría ser el punto de partida para nuevos proyectos más ambiciosos. Sería interesante realizar el análisis en una muestra prospectiva de pacientes, en la cual se pudieran separar las poblaciones linfocitarias de diversos tejidos con el fin de analizar el proceso de reordenamiento en cada una de ellas, idealmente con secuenciación, que permita individualizar los reordenamientos; la separación en tejidos vivos podría permitir el análisis funcional de cada subpoblación y su correlación con el proceso de reordenamientos.

Bibliografía

1. Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman SP. Cellular and Molecular Immunology, 8e. 8th ed. 2014. 544 p.
2. Levesque MC, St Clair EW. B cell-directed therapies for autoimmune disease and correlates of disease response and relapse. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2018 Aug 5];121(1):13-21; quiz 22-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206502>
3. Hogquist KA, Xing Y, Hsu F-C, Shapiro VS. T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *J Immunol* [Internet]. 2015 Aug 15 [cited 2018 Aug 5];195(4):1351–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26254267>
4. Szczepański T, van der Velden VHJ, van Dongen JJM. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2018 Aug 5];44(7):775–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16776621>
5. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2018 Aug 22];162(2):271–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854328>
6. Stanfield RL, Wilson IA. Antibody Structure. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 Apr 18 [cited 2018 Aug 6];2(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26105818>
7. Villamizar-Rivera N, Olaya N. Determinación de la clonalidad en tejidos humanos. *IATREIA* [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 5];2828(33):269–82. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v28n3/v28n3a05.pdf>
8. Girschick HJ, Grammer AC, Nanki T, Vazquez E, Lipsky PE. Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with

- systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2002 May [cited 2018 Apr 5];46(5):1255–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115231>
9. Dave BJ, Nelson M, Sanger WG. Lymphoma Cytogenetics. *Clin Lab Med* [Internet]. 2011 Dec [cited 2018 Aug 10];31(4):725–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118746>
 10. Eunice López-Rocha, Karen Rodríguez-Mireles, Nora Hilda Segura-Méndez MAY-N. Prevalencia de cáncer en pacientes adultos con inmunodeficiencia común variable. *Rev Alerg México* [Internet]. 2014 Mar 15 [cited 2018 Apr 5];62(1):22–7. Available from: <http://www.revistaalergia.mx/ojs/index.php/ram/article/view/56/103>
 11. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* [Internet]. 2012 Jan 19 [cited 2018 Aug 6];481(7381):306–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10762>
 12. García-Castillo H, Barros-Núñez P. Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombination in hematological malignancies: monitoring minimal residual disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* [Internet]. 2009 Jun [cited 2018 May 20];9(2):124–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519371>
 13. Ribera J, Zamora L, Juncà J, Rodríguez I, Marcé S, Cabezón M, et al. Usefulness of IGH/TCR PCR studies in lymphoproliferative disorders with inconclusive clonality by flow cytometry. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2014 Jan [cited 2018 May 20];86(1):25–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943305>
 14. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia* [Internet]. 2010 Mar 24 [cited 2018 Aug 7];24(3):521–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/leu2009268>
 15. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Mar 8];26(9):1986–2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948490>

16. Moreau EJ, Langerak AW, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, Zhan M, Zhou Q, et al. Easy detection of all T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* [Internet]. 1999 Oct [cited 2018 Aug 7];13(10):1620–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516765>
17. Tümkaya T, Comans-Bitter WM, Verhoeven MA, van Dongen JJ. Southern blot detection of immunoglobulin lambda light chain gene rearrangements for clonality studies. *Leukemia* [Internet]. 1995 Dec [cited 2018 Aug 7];9(12):2127–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609728>
18. Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Laginestra MA, Sapienza MR, Fuligni F, et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol* [Internet]. 2014 Apr 7 [cited 2018 Apr 5];5(2):35–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24688753>
19. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* [Internet]. 2003 Dec 12 [cited 2018 Apr 5];17(12):2257–317. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14671650>
20. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 May 31];26(10):2159–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918122>
21. Groenen PJTA, Langerak AW, van Dongen JJM, van Krieken JHJM. Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop* [Internet]. 2008 Sep 22 [cited 2017 Nov 21];1(2):97–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669208>
22. Wada T, Toma T, Okamoto H, Kasahara Y, Koizumi S, Agematsu K, et al. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined

- immunodeficiency. *Blood* [Internet]. 2005 Sep 15 [cited 2018 Nov 28];106(6):2099–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845893>
23. Yu X, Almeida JR, Darko S, van der Burg M, DeRavin SS, Malech H, et al. Human syndromes of immunodeficiency and dysregulation are characterized by distinct defects in T-cell receptor repertoire development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Aug 7];133(4):1109–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406074>
 24. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2018 Aug 7];125(2 Suppl 2):S182-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042228>
 25. Kumar A, Teuber SS, Gershwin ME. Current Perspectives on Primary Immunodeficiency Diseases. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2006 [cited 2018 Apr 5];13(2–4):223–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17162365>
 26. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2018 Aug 7];120(4):776–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952897>
 27. Al-Herz W, Aldhekri H, Barbouche M-R, Rezaei N. Consanguinity and Primary Immunodeficiencies. *Hum Hered* [Internet]. 2014 [cited 2018 Aug 7];77(1–4):138–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25060276>
 28. Joshi AY, Iyer VN, Hagan JB, St Sauver JL, Boyce TG. Incidence and temporal trends of primary immunodeficiency: a population-based cohort study. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2009 [cited 2018 Apr 5];84(1):16–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121249>
 29. Montoya CJ, Henao J, Salgado H, Olivares MM, López JA, Rugeles C, et al. Diagnóstico fenotípico de las inmunodeficiencias primarias en Antioquia, Colombia, 1994-2002. *Biomédica* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2018 Aug 7];22(4):510. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1177>

30. Vásquez E, Villada F, Orrego JC, Franco JL. Espectro de las inmunodeficiencias primarias en Colombia: reporte del Centro Nacional de Referencia Jeffrey Modell para diagnóstico e investigación en inmunodeficiencias primarias (CJM-UDEA) [Internet]. Vol. 26, Iatreia. Universidad de Antioquia; 2006 [cited 2018 Aug 7]. 43 p. Available from: <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/15760>
31. Perez E, Bonilla FA, Orange JS, Ballou M. Specific Antibody Deficiency: Controversies in Diagnosis and Management. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 7];8:586. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28588580>
32. Boyle JM, Buckley RH. Population Prevalence of Diagnosed Primary Immunodeficiency Diseases in the United States. *J Clin Immunol* [Internet]. 2007 Aug 23 [cited 2018 May 12];27(5):497–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577648>
33. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies. *Clin Immunol* [Internet]. 1999 Dec [cited 2018 Aug 8];93(3):190–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600329>
34. Volk T, Pannicke U, Reisli I, Bulashevskaya A, Ritter J, Björkman A, et al. *DCLRE1C* (ARTEMIS) mutations causing phenotypes ranging from atypical severe combined immunodeficiency to mere antibody deficiency. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2015 Dec 20 [cited 2018 Apr 6];24(25):7361–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476407>
35. Huang J, Guo X, Fan N, Song J, Zhao B, Ouyang Z, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2016 Mar 7];193(3):1496–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973446>
36. Siegers GM, Swamy M, Fernández-Malavé E, Minguet S, Rathmann S, Guardo AC, et al. Different composition of the human and the mouse $\gamma\delta$ T cell receptor explains different phenotypes of CD3 γ and CD3 δ immunodeficiencies. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Oct 29 [cited 2018 Apr 7];204(11):2537–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923503>

37. Bradford KL, Moretti FA, Carbonaro-Sarracino DA, Gaspar HB, Kohn DB. Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID): Molecular Pathogenesis and Clinical Manifestations. *J Clin Immunol* [Internet]. 2017 Oct 25 [cited 2018 Apr 7];37(7):626–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28842866>
38. Liao C-Y, Yu H-W, Cheng C-N, Chen J-S, Lin C-W, Chen P-C, et al. A novel pathogenic mutation on Interleukin-7 receptor leading to severe combined immunodeficiency identified with newborn screening and whole exome sequencing. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2018 Mar 2 [cited 2018 Apr 7]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29551298>
39. Xu S, Li Q, Wu J, Chen G, Zhu B, Gu W. Identification of *IL2RG* and *CYBB* mutations in two Chinese primary immunodeficiency patients by whole-exome sequencing. *Immunol Invest* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2018 Apr 7];1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29388853>
40. Stepensky P, Keller B, Shamriz O, NaserEddin A, Rumman N, Weintraub M, et al. Deep intronic mis-splicing mutation in *JAK3* gene underlies T–B+NK–severe combined immunodeficiency phenotype. *Clin Immunol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Apr 7];163:91–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26769277>
41. Roberts JL, Buckley RH, Luo B, Pei J, Lapidus A, Peri S, et al. CD45-deficient severe combined immunodeficiency caused by uniparental disomy. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Jun 26 [cited 2018 Apr 7];109(26):10456–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689986>
42. Conteduca G, Indiveri F, Filaci G, Negrini S. Beyond APECED: An update on the role of the autoimmune regulator gene (*AIRE*) in physiology and disease. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2018 Apr [cited 2018 Apr 7];17(4):325–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427825>
43. Sanford E, Watkins K, Nahas S, Gottschalk M, Coufal N, Farnaes L, et al. Rapid whole genome sequencing identifies a novel *AIRE* variant associated with Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. *Mol Case Stud* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2018 Apr 7];mcs.a002485. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29437776>
44. Hanalioglu D, Ayvaz DC, Ozgur TT, van der Burg M, Sanal O, Tezcan I. A novel mutation in *TAP1* gene leading to MHC class I deficiency: Report of

- two cases and review of the literature. *Clin Immunol* [Internet]. 2017 May [cited 2018 Apr 7];178:74–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28161407>
45. de la Calle-Martin O, Hernandez M, Ordi J, Casamitjana N, Arostegui JI, Caragol I, et al. Familial CD8 deficiency due to a mutation in the CD8 α gene. *J Clin Invest* [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2018 Apr 7];108(1):117–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435463>
 46. Hauck F, Randriamampita C, Martin E, Gerart S, Lambert N, Lim A, et al. Primary T-cell immunodeficiency with immunodysregulation caused by autosomal recessive LCK deficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 Apr 7];130(5):1144–1152.e11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985903>
 47. Liu Q, Wang Y-P, Liu Q, Zhao Q, Chen X-M, Xue X-H, et al. Novel compound heterozygous mutations in ZAP70 in a Chinese patient with leaky severe combined immunodeficiency disorder. *Immunogenetics* [Internet]. 2017 Apr 26 [cited 2018 Apr 7];69(4):199–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28124082>
 48. Aluri J, Gupta M, Dalvi A, Mhatre S, Kulkarni M, Hule G, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Findings in Five Patients with Major Histocompatibility Complex Class II Deficiency from India. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Feb 16 [cited 2018 Apr 7];9:188. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29527204>
 49. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* [Internet]. 2006 May 11 [cited 2018 Apr 7];441(7090):179–85. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04702>
 50. Ferrari S, Lougaris V, Caraffi S, Zuntini R, Yang J, Soresina A, et al. Mutations of the Ig β gene cause agammaglobulinemia in man. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Sep 3 [cited 2018 Apr 7];204(9):2047–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709424>
 51. Carrillo-Tapia E, García-García E, Herrera-González NE, Yamazaki-Nakashimada MA, Staines-Boone AT, Segura-Mendez NH, et al. Delayed diagnosis in X-linked agammaglobulinemia and its relationship to the

- occurrence of mutations in BTK non-kinase domains. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2018 Apr 7];14(1):83–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29202590>
52. Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nat Genet* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2018 Apr 7];27(3):277–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11242109>
53. Al-Saud BK, Al-Sum Z, Alassiri H, Al-Ghonaïum A, Al-Muhsen S, Al-Dhekri H, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Characterization of Hyper-IgM Syndrome Due to CD40 Deficiency in Eleven Patients. *J Clin Immunol* [Internet]. 2013 Nov 12 [cited 2018 Apr 7];33(8):1325–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122029>
54. Kim HY, Um TM, Park HJ. A Novel Mutation in CD40LG Gene Causing X-Linked Hyper IgM Syndrome. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2018 Apr 7]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29243022>
55. Picchianti Diamanti A, Rosado MM, Scarsella M, Ceccarelli S, Laganà B, D'Amelio R, et al. Increased serum IgM, immunodeficiency, and autoimmunity: A clinical series. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet]. 2015 Dec 2 [cited 2018 Apr 7];28(4):547–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526204>
56. Yong PFK, Salzer U, Grimbacher B. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev* [Internet]. 2009 May [cited 2018 Apr 7];229(1):101–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426217>
57. Barbosa RR, Silva SL, Silva SP, Melo AC, Pereira-Santos MC, Barata JT, et al. Reduced BAFF-R and Increased TACI Expression in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol* [Internet]. 2014 Jul 9 [cited 2018 Apr 7];34(5):573–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24809296>
58. Ramírez-Vargas N, Arablin-Oropeza SE, Mojica-Martínez D, Yamazaki-Nakashimada MA, de la Luz García-Cruz M, Terán-Juárez LM, et al. Clinical and immunological features of common variable immunodeficiency in Mexican patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2014 May [cited

- 2018 Apr 7];42(3):235–40. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578780>
59. 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* [Internet]. 2012 Aug [cited 2018 Apr 7];73(8):836–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627058>
60. Smith CE, Berglöf A. X-Linked Agammaglobulinemia [Internet]. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2018 Aug 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301626>
61. Taneja A, Chhabra A. Bruton Agammaglobulinemia [Internet]. *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2018 [cited 2018 May 12]. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846295>
62. Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev* [Internet]. 2005 Feb [cited 2018 Aug 8];203(1):216–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661032>
63. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2018 Apr 5];111(1):77–85. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898316>
64. López-Rocha E, Rodríguez-Mireles K, Segura-Méndez NH, Yamazaki-Nakashimada MA. [Malignancies in adult patients with common variable immunodeficiency]. *Rev Alerg Mex* [Internet]. [cited 2018 Aug 9];62(1):22–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25758110>
65. Rodríguez-Negrete EV, Mayoral-Zavala A, Rodríguez-Mireles KA, Díaz de León-Salazar OE, Hernández-Mondragón O, Gómez-Jiménez LM, et al. [Prevalence of gastrointestinal disorders in adults with common variable immunodeficiency at Specialty Hospital Dr. Bernardo Sepulveda]. *Rev Alerg Mex* [Internet]. [cited 2018 Apr 5];62(1):1–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25758107>
66. 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* [Internet]. 2009 Jan 6 [cited 2018 May 13];29(1):130–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-008-9229-9>
67. Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol* [Internet]. 2017 Jan [cited 2018 May 12];85(1):3–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27763681>
68. García-Muñoz R. Aspectos inmunológicos relacionados con la generación de linfomas y autoinmunidad. *Inmunología* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2018 Apr 5];29(1):34–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213962610700093>
69. Jonkman-Berk BM, van den Berg JM, ten Berge IJM, Bredius RGM, Driessen GJ, Dalm VASH, et al. Primary immunodeficiencies in the Netherlands: National patient data demonstrate the increased risk of malignancy. *Clin Immunol* [Internet]. 2015 Feb [cited 2018 Apr 5];156(2):154–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25451158>
70. Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G, Mavrou A. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res* [Internet]. [cited 2018 Apr 5];28(2B):1263–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18505064>
71. Gangemi S, Allegra A, Musolino C. Lymphoproliferative disease and cancer among patients with common variable immunodeficiency. *Leuk Res* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Apr 5];39(4):389–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25711943>
72. Aghamohammadi A, Parvaneh N, Tirgari F, Mahjoob F, Movahedi M, Gharagozlou M, et al. Lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in common variable immunodeficiency. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2006 Jan [cited 2018 Apr 5];47(2):343–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321869>
73. Filipovich AH, Mathur A, Kamat D, Shapiro RS. Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer Res* [Internet]. 1992 Oct 1 [cited

- 2018 Apr 5];52(19 Suppl):5465s–5467s. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327508>
74. Mellemkjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2002 Dec [cited 2018 Apr 5];130(3):495–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452841>
75. Desar IME, Keuter M, Raemaekers JMM, Jansen JBMJ, van Krieken JHJ, van der Meer JWM. Extranodal marginal zone (MALT) lymphoma in common variable immunodeficiency. *Neth J Med* [Internet]. 2006 May [cited 2018 May 13];64(5):136–40. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702611>
76. Leone P, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. Common Variable Immunodeficiency and Gastric Malignancies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2018 May 13];19(2):451. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29393912>
77. Viallard J-F, Ruiz C, Guillet M, Pellegrin J-L, Moreau J-F. Perturbations of the CD8+ T-cell repertoire in CVID patients with complications. *Results Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2018 Apr 5];3:122–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600567>
78. IMMIG - Clinical: Immunoglobulins (IgG, IgA, and IgM), Serum [Internet]. [cited 2018 Aug 22]. Available from:
<https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/8156>.
79. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* [Internet]. 2003 Dec [cited 2016 Mar 7];17(12):2257–317. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14671650>
80. Abbas F, Yazbek SN, Shammaa D, Hoteit R, Fermanian P, Mahfouz R. Invivoscribe BIOMED-2 Primer Mixes in B-Cell Immunoglobulin Gene

- Rearrangement Studies: Experience of a Molecular Diagnostics Laboratory in a Major Tertiary Care Center. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 May 28];18(12):787–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25299065>
81. Matsuda K, Nakazawa Y, Yanagisawa R, Honda T, Ishii E, Koike K. Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011 Aug 17 [cited 2018 May 28];412(17–18):1554–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570959>
 82. Kuo S-Y, Liu H, Liao Y-L, Chang S-T, Hsieh Y-C, Bando BAN, et al. A parallel comparison of T-cell clonality assessment between an in-house PCR assay and the BIOMED-2 assay leading to an efficient and cost-effective strategy. *J Clin Pathol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2018 May 28];64(6):536–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490377>
 83. Tapia G, Sanz C, Mate JL, Muñoz-Mármol AM, Ariza A. Improved clonality detection in Hodgkin lymphoma using the BIOMED-2-based heavy and kappa chain assay: a paraffin-embedded tissue study. *Histopathology* [Internet]. 2012 Apr [cited 2018 May 28];60(5):768–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22296097>
 84. Faurobert E, Bouin A-P, Albiges-Rizo C. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Sep 28];27(1):64–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415136>
 85. Diebner HH, Kirberg J, Roeder I. An evolutionary stability perspective on oncogenesis control in mature T-cell populations. *J Theor Biol* [Internet]. 2016 Jan 21 [cited 2018 Sep 30];389:88–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549469>
 86. Gerdes S, Newrzela S, Glauche I, von Laer D, Hansmann M-L, Roeder I. Mathematical Modeling of Oncogenesis Control in Mature T-Cell Populations. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2018 Sep 30];4:380. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24409176>
 87. Newrzela S, Al-Ghaili N, Heinrich T, Petkova M, Hartmann S, Rengstl B, et

- al. T-cell receptor diversity prevents T-cell lymphoma development. *Leukemia* [Internet]. 2012 Dec 30 [cited 2018 Sep 30];26(12):2499–507. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22643706>
88. 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* [Internet]. 2007 May 17 [cited 2018 Sep 28];27(3):308–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510807>
89. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A, et al. Cancers Related to Immunodeficiencies: Update and Perspectives. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2018 Sep 28];7:365. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703456>
90. Ochs HD, Hagin D. Primary immunodeficiency disorders: general classification, new molecular insights, and practical approach to diagnosis and treatment. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 May 28];112(6):489–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860921>
91. Montanaro A. Primary Immunodeficiency Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2015 Nov [cited 2018 May 28];35(4):ix–x. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26454319>
92. Seidel MG. Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment. *Blood* [Internet]. 2014 Oct 9 [cited 2018 May 28];124(15):2337–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25163701>
93. Uzzan M, Ko HM, Mehandru S, Cunningham-Rundles C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). *Curr Gastroenterol Rep* [Internet]. 2016 Apr 7 [cited 2018 Sep 28];18(4):17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951230>
94. aan de Kerk DJ, Jansen MH, Jolles S, Warnatz K, Seneviratne SL, ten Berge IJM, et al. Phenotypic and Functional Comparison of Class Switch Recombination Deficiencies with a Subgroup of Common Variable Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* [Internet]. 2016 Oct 2 [cited 2018 May

- 28];36(7):656–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27484504>
95. Salek Farrokhi A, Aghamohammadi A, Pourhamdi S, Mohammadinejad P, Abolhassani H, Moazzeni SM. Evaluation of class switch recombination in B lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol Methods* [Internet]. 2013 Aug 30 [cited 2018 May 28];394(1–2):94–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23714403>
96. Lee W-I, Huang J-L, Lin S-J, Yeh K-W, Chen L-C, Ou L-S, et al. Applying T-cell receptor excision circles and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles to patients with primary immunodeficiency diseases. *Ann Med* [Internet]. 2014 Nov 11 [cited 2018 May 28];46(7):555–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109505>
97. Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med* [Internet]. 2013 May 9 [cited 2018 May 28];11(1):119. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23656963>
98. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2018 May 28];35(8):696–726. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482257>