




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Avaluació genètica amb eines de seqüenciació
massiva d'una cohort de pacients amb
immunodeficiència comuna variable (IDCV)**

Doctoranda:

Marina Garcia Prat

Directors:

Dr. Pere Soler Palacín

Dr. Roger Colobran Oriol

Tutor:

Dr. Pere Soler Palacín

Programa de doctorat de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina
Preventiva i Salut Pública.

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).



El **Dr. Pere Soler-Palacín**, cap de la Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i professor associat de la UAB i el **Dr. Roger Colobran Oriol**, cap del Grup d'Immunologia Translacional del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) i professor associat de la UAB.

CERTIFIQUEN: que el treball de tesi del programa de doctorat del Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva i Salut Pública, presentat per MARINA GARCIA PRAT amb el títol **“Avaluació genètica amb eines de seqüenciació massiva d'una cohort de pacients amb immunodeficiència comuna variable (IDCV)”**, s'ha realitzat sota la seva supervisió i reuneix les condicions necessàries per ser presentat com a tesi per a optar al grau de Doctor en Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva i Salut Pública.

Pere Soler Palacín
(director i tutor)

Roger Colobran Oriol
(director)

Marina Garcia Prat
(doctoranda)

Te la dedico a tu, iaia.

Allà on siguis, espero que n'estiguis orgullosa.

AGRAÏMENTS

Voldria mostrar el meu agraïment a tota aquella gent que m'ha donat suport en el dia a dia de la elaboració d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, al Dr. Pere Soler Palacín (cap de la Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències a Pediatria, UPIIP) i al Dr. Roger Colobran Oriol (cap del Grup de Recerca en Immunologia Translacional), ambdós del Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, per la direcció del treball, el constant suport i la guia durant la seva realització. La seva exigència i constant ambició en tot el que fan són la clau per aconseguir l'excel·lència en el camp de la recerca en les immunodeficiències primàries.

A la BCN PID Foundation per la inspiració i a la UPIIP per transmetre'm les ganes de superació constants. Gràcies en especial a l'Andrea, en Jacques i la Saida per fer les coses molt més fàcils.

Moltes gràcies al Servei d'Immunologia del Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, per haver-me acompanyat en els meus primers passos. Gràcies Mónica per aquella trucada del Desembre de 2014 que ho va canviar tot. Gràcies a la Lulú, la Sandra i la Sara (i totes les tècnics que han passat per immunologia cel·lular) per tot el que m'heu ensenyat, als residents per fer-ho tot més divertit, a la Romina per tota l'ajuda amb els pacients adults, i a l'Àlex pel suport amb l'estudi de les cadenes lleugeres lliures en sèrum. A la Clara i al Dani per donar-me sempre un cop de mà amb tot el que he necessitat. I com no, gràcies Ade i Aina per ser els meus pilars. Què hagués fet sense vosaltres?

Al Servei de Pneumologia del Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, en especial a la Dra. Eva Polverino, al Dr. Antoni Álvarez i al Jordi Rabadan per tota la paciència que han tingut amb mi, gestionant visites i passant-me informació dels pacients adults.

A la Unitat de Genètica, en especial a la Dra. Elena Garcia Arumí i a la Dra. Maria Antolín, els vull agrair la seva hospitalitat acollint-me els mesos en els que vaig estar aprenent a fer NGS. Gràcies Laura i Leti per la paciència!

El meu més sincer agraïment al Biobanc de l'hospital. És un luxe poder comptar amb el vostre servei, sempre d'una qualitat excel·lent. Mil gràcies Isabel i Sheyla!

Al Dr. Xavier Solanich de l'Hospital de Bellvitge per haver volgut incloure pacients a la cohort, i al Dr. Xavier de la Cruz, a la Dra. Natalia Padilla i a la Lorena per tota la feina feta amb el tema de les variants genètiques poligèniques.

A la Desi, l'Andrea, la Janire i l'Alba. Unes dones valentes, treballadores, intel·ligents i resilients. Gràcies per donar-me sempre aire fresc i ser sempre el mirall on vull veure'm reflectida. Sou inspiració. Laura, moltíssimes gràcies per la lectura i la revisió, has fet que la tesi llueixi encara més! Gràcies per la bona predisposició i la rapidesa.

Gràcies Àngel. Per la paciència, el suport i la estabilitat emocional que em manca a vegades. Amb tu al meu costat ha estat més fàcil. I a la meva tribu: gràcies papa, mama i Nat pels diumenges de ping-pong i per ser el meu oasi de calma enmig de la tempesta.

ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	10
I. RESUM I ABSTRACT.....	16
II. ÍNDEX DE TAULES	22
III. ÍNDEX DE FIGURES	25
IV. ABREVIATURES	29
33	
V. INTRODUCCIÓ.....	35
1. ERRORS CONGÈNITS DE LA IMMUNITAT	35
1.1. Manifestacions clíniques dels IEI	39
1.2. Aproximació diagnòstica dels IEI.....	41
1.3. Tractaments dels IEI	44
2. IMMUNODEFICIÈNCIA COMUNA VARIABLE (IDCV).....	47
2.1. Dades demogràfiques de la IDCV	47
2.2. Criteris diagnòstics de la IDCV	48
2.3. Manifestacions clíniques de la IDCV	51
2.4. La immunologia de la IDCV.....	54
2.5. Genètica de la IDCV	59
2.6. Epigenètica de la IDCV	62
2.7. Tractament de la IDCV	63
VI. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	69
1. HIPÒTESIS.....	69
2. OBJECTIUS.....	69
1.1. Objectius principals	69
1.2. Objectius secundaris	69
VII. PACIENTS I MÈTODES	73
1. POBLACIÓ A ESTUDI.....	73
2. TIPUS D'ESTUDI	73
3. SELECCIÓ DE PACIENTS	73
3.1. Criteris d'inclusió.....	74
3.2. Criteris d'exclusió.....	74
4. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES	74

5.	VARIABLES A ESTUDI	75
5.1.	Variables demogràfiques.....	75
5.2.	Manifestacions clíniques.....	75
5.3.	Paràmetres analítics	76
6.	SEQÜENCIACIÓ GENÈTICA MASSIVA (NGS)	79
6.1.	Protocol de NGS	79
6.2.	Anàlisi de resultats.....	83
6.3.	Altres aproximacions genètiques	84
7.	ESTUDIS MOLECULARS/FUNCTIONALS PER A LA CONFIRMACIÓ DE LA PATOGENICITAT DE LES VARIANTS GENÈTIQUES.....	86
7.1.	Aïllament de subpoblacions cel·lulars	86
7.2.	Extracció i quantificació d'ADN	86
7.3.	Extracció i purificació d'ARN	87
7.4.	Retrotranscripció i obtenció de l'ADNc	87
7.5.	PCR d'amplificació.....	88
7.6.	Comprovació d'amplificació i purificació	88
7.7.	PCR de seqüenciació directa (mètode Sanger)	89
7.8.	PCR quantitativa (qPCR): expressió gènica	90
7.9.	Tinció intracel·lular d'LRBA.....	91
7.10.	Estudi de la via NFκB mitjançant <i>western blot</i>	91
7.11.	Anàlisi de citocines en sobrenedant mitjançant immunoassaig microfluídic	93
7.12.	Estudis genètics familiars.....	93
8.	ANÀLISI ESTADÍSTICA	94
8.1.	Anàlisi bivariada	94
8.2.	Modelització	94
8.3.	Proporcions i intervals de confiança	95
8.4.	Mesures d'associació	95
8.5.	Software estadístic	95
9.	ASPECTES HUMANS. CONSENTIMENT INFORMAT.....	96
VIII.	RESULTATS.....	99
1.	COHORT	99
2.	VARIABLES DEMOGRÀFIQUES	100

3.	MANIFESTACIONS CLÍNiques	101
4.	PARÀMETRES ANALÍTICS	104
4.1.	Valors d'immunoglobulines	104
4.2.	Poblacions limfocitàries B	105
4.3.	Cadenes lleugeres lliures en sèrum	105
4.4.	Comparativa de biomarcadors pel diagnòstic d'IDCV	106
5.	RESULTATS GENÈTICS (SEQÜENCIACIÓ GÈNICA MASSIVA)	108
5.1.	Variants genètiques a <i>LRBA</i>	111
5.2.	Variants genètiques a <i>CTLA4</i>	115
5.3.	Variants genètiques a <i>NFKB1</i>	117
5.4.	Variants genètiques a <i>PIK3R1</i>	122
5.5.	Variants genètiques a <i>RNU4ATAC</i>	127
5.6.	Variants genètiques a <i>DKC1</i>	129
5.7.	Variants genètiques a <i>IKZF1</i>	130
5.8.	Variants genètiques a <i>IKBKG</i>	138
5.9.	Variants genètiques a <i>BTK</i>	141
5.10.	Variants genètiques a <i>TNFRSF13B</i> (TACI)	146
6.	MODIFICACIÓ DEL PLA TERAPÈUTIC A PARTIR DEL DIAGNÒSTIC GENÈTIC	160
7.	MODEL PREDICTOR DE FORMES MONOGÈNIQUES D'IDCV	161
7.1.	Edat (quantitativa)	162
7.2.	Edat (2 categories)	163
7.3.	Edat inici de símptomes (quantitativa)	164
7.4.	Edat inici de símptomes (2 categories)	165
7.5.	Infecció	166
7.6.	Limfòcits B de transició	167
7.7.	Model de regressió logística multivariant	168
IX.	DISCUSSIÓ	172
9.1.	Característiques de la cohort	173
9.2.	Eines pel diagnòstic d'IDCV	174
9.3.	Model predictiu per l'estudi genètic	177
9.4.	Aproximacions en el diagnòstic genètic	179
9.5.	Defectes monogènics identificats	181
9.6.	Variants genètiques no descrites avaluades funcionalment	184

9.7.	Altres beneficis dels estudis genètics	190
9.8.	Limitacions de l'estudi.....	191
9.9.	Futures línies de recerca.....	192
X.	CONCLUSIONS.....	196
XI.	FONTS DE FINANÇAMENT.....	197
XII.	BIBLIOGRAFIA	200
XIII.	ARTICLES PUBLICATS EN RELACIÓ AMB LA TESI DOCTORAL	214
	219	
XIV.	ANNEXOS	221

I. RESUM I ABSTRACT

RESUM

Introducció: com el seu nom indica, la immunodeficiència comuna variable (IDCV), l'error innat de la immunitat (IEI) simptomàtic més freqüent, mostra una gran variabilitat pel que fa a la seva presentació clínica, l'edat i la gravetat. Tot i que s'assumeix una base genètica complexa, poligènica i fins i tot epigenètica, s'han identificat causes monogèniques que fins ara expliquen el 15-30% dels casos, fet que fa recomanable definir en quins casos està més indicat un estudi genètic en la pràctica assistencial a un pacient amb IDCV, especialment en àmbits on sigui necessària aquesta prioritització.

Hipòtesis: (1) Una aproximació mitjançant seqüenciació genètica massiva permet identificar una subcohort de pacients amb un defecte monogènic i una potencial aplicació d'un tractament dirigit que millori el pronòstic del pacient respecte al tractament de suport habitual ofert a les formes poligèniques/no filiades d'IDCV, així com un assessorament genètic i preconcepcional a pacient i familiars. (2) L'avaluació dels paràmetres clínics i immunològics permet determinar en quin subgrup de pacients amb IDCV cal prioritzar la realització de l'estudi genètic a nivell assistencial en cas de no poder-se realitzar en la seva totalitat.

Objectius: els objectius principals del treball són (i) determinar el percentatge de formes monogèniques i els gens causals a la cohort de pacients amb diagnòstic d'IDCV i (ii) determinar el fenotip clínic i immunitari dels pacients amb més probabilitat de tenir un defecte monogènic que indiqui la necessitat de dur a terme un estudi genètic a nivell assistencial. Els objectius secundaris del treball son: (iii) validar la utilització de la determinació de les cadenes lleugeres lliures en sèrum com a potencial biomarcador pel diagnòstic d'IDCV, (iv) caracteritzar molecularment i funcional les noves variants genètiques identificades en l'estudi, (v) estudiar els casos familiars segons el patró d'herència per detectar casos secundaris i oferir consell genètic i (vi) identificar els pacients amb variants genètiques monogèniques susceptibles de rebre una teràpia dirigida que pugui millorar el seu pronòstic.

Pacients i mètodes: es tracta d'un estudi d'una cohort de pacients pediàtrics i adults, diagnosticats d'IDCV a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i a l'Hospital

Universitari de Bellvitge, Barcelona. Es revisen els criteris diagnòstics segons la classificació de l'ICON (The International Collaboration in Asthma, Allergy and Immunology) de 2015 i es recullen diferents paràmetres clínics i immunològics. S'ofereix als casos confirmats d'IDCV un diagnòstic genètic mitjançant NGS (Next-Generation Sequencing) utilitzant un panell de gens que inclou 323 gens prèviament definits com a causants d'IEI. Les variables amb major rellevància clínica i amb evidències estadístiques de trobar una variant genètica causal s'han incorporat en un model de regressió logística multivariant, realitzant dos estudis: un per a totes les variants genètiques trobades i un per a només les variants genètiques que considerem causals. Es realitzen models amb i sense interaccions. Es duen a terme totes les tècniques necessàries en cada cas per avaluar l'impacte de les noves variants genètiques identificades a nivell molecular i funcional i s'ofereix assessorament genètic i preconcepcional als pacients amb un resultat concloent i als seus familiars. Es realitza la quantificació de les cadenes lleugeres lliures en sèrum (sFLC) κ i λ mitjançant turbidimetria.

Resultats: s'obté una cohort de 148 pacients que compleixen criteris d'IDCV dels quals 136 s'estudien genèticament. S'identifiquen un total de 36 variants genètiques patogèniques (26,4%), essent 24 d'elles causals (17,6%) i 12 associades a IDCV (8,8%). S'han analitzat a nivell molecular i funcional un total d'11 pacients amb variants genètiques no descrites prèviament a la literatura confirmant 10 casos i descartant-ne un. Es realitza estudi genètic familiar en un total de 14 famílies (38,8%) amb mostra d'ADN disponible identificant 17 casos de portadors i 9 casos de malalts que no havien estat detectats prèviament. Set pacients de la cohort es consideren potencialment beneficiaris d'un tractament dirigit i específic amb fàrmacs immunomoduladors i 1 potencial beneficiari de trasplantament de precursors hematopoètics (TPH). Finalment, s'estableix un model predictor de formes monogèniques d'IDCV amb una sensibilitat de 0,8333, una especificitat de 0,8214 i una àrea sota la corba (AUC, de l'anglès *area under the curve*) de 0,8707 en els pacients que debuten a edats precoces. Aquests presenten un augment dels limfòcits B de transició i un fenotip clínic que s'associa a infeccions i altres manifestacions d'immunodesregulació. En la comparativa dels diferents biomarcadors d'IDCV es demostra que el més robust és la determinació de les sFLC i que la seva addició als

critèris establerts permet detectar casos d'IDCV que no s'haguessin catalogat d'IDCV degut a una resposta vacunal normal o no realitzada.

Conclusions: (i) s'ha detectat una causa monogènica causal en un 17,6% de casos en una cohort de pacients diagnosticats amb IDCV. (ii) Els criteris que han resultat ser rellevants per a l'estudi genètic són: l'edat d'inici de símptomes, la presència d'altres manifestacions clíniques a part d'infeccions i la presència de limfòcits B de transició elevats. (iii) Les cadenes lleugeres lliures en sèrum (κ i λ) són un bon biomarcador pel diagnòstic d'IDCV. (iv) Disposar de les eines necessàries per a l'anàlisi funcional de les variants genètiques no descrites o de significat incert ens ha permès confirmar les nostres troballes en un percentatge significatiu de pacients. (v) La nostra aproximació diagnòstica ha permès realitzar l'estudi genètic familiar i oferir consell genètic tant a pacients com a familiars. (vi) L'estudi genètic ens ha permès identificar pacients que es poden beneficiar potencialment de tractaments específics.

ABSTRACT

Introduction: as its name indicates, common variable immunodeficiency (CVID), the most common symptomatic inborn error of immunity (IEI), is highly variable in its clinical presentation, age and severity. Although a complex, polygenic and even epigenetic genetic basis is assumed, monogenic causes have been identified that so far explain 15-30% of cases, which makes it advisable to define in which cases a genetic study is most necessary in order to care for the patient.

Hypotheses: (1) An approach using massive genetic sequencing allows identifying a subcohort of patients with a monogenic defect and a potential application of a targeted treatment that improves the prognosis of the patient compared to the usual supportive treatment offered to polygenic forms not affiliated with CVID, as well as genetic and preconception counseling for patients and relatives. (2) The evaluation of clinical and immunological parameters allows to determine in which subgroup of CVID patients it is necessary to prioritize doing a genetic study at healthcare level if it cannot be carried out for everyone.

Objectives: the main objectives of this project are (i) to determine the percentage of monogenic forms and causative genes in the cohort of patients diagnosed with CVID and (ii) to determine the clinical and immune phenotype of patients most likely to have a defect monogenic that indicates the need to perform a genetic study at healthcare level. The secondary objectives are: (iii) to validate the use of the determination of free light chains in serum as a potential biomarker for the diagnosis of CVID, (iv) to characterize molecularly and functionally the new genetic variants identified in the study, (v) to study familial cases according to the pattern of inheritance to detect secondary cases and offer genetic counseling and (vi) to identify patients with a monogenic genetic variant likely to receive targeted therapy that may improve their prognosis.

Patients and methods: this is a study of a cohort of pediatric and adult patients, diagnosed with CVID at Vall d'Hebron University Hospital and Bellvitge University Hospital, Barcelona. The diagnostic criteria are reviewed according to the 2015 ICON (The International Collaboration in Asthma, Allergy and Immunology) classification and different clinical and immunological parameters are collected. Confirmed cases of CVID are offered a genetic diagnosis by NGS (Next-Generation Sequencing) using a

gene panel that includes 323 genes previously defined as causing IEI. The variables with greater clinical relevance and statistical evidence of finding a causal genetic variant have been incorporated into a multivariate logistic regression model, performing two studies: one for all the genetic variants found and one for only the genetic variants considered causal and models with and without interactions are performed. All the necessary techniques are carried out in each case to evaluate the impact of the new genetic variants identified at the molecular and functional level, and genetic and pre-conception counseling is offered to patients with conclusive result and their relatives. Serum-free light chains (sFLC) κ and λ are quantified by turbidimetry.

Results: a cohort of 148 patients meeting CVID criteria was obtained, of which 136 were studied genetically. A total of 36 (26.4%) pathogenic genetic variants were identified, 24 of them being causal (17.6%) and 12 associated with CVID (8.8%). A total of 11 patients with genetic variants not previously described in the literature were analyzed at the molecular and functional level, confirming 10 cases and ruling out one. A family genetic study was carried out in a total of 14 families (38.8%) with available DNA samples identifying 17 carriers and 9 patients who had not been previously detected. Seven patients in the cohort are considered potential beneficiaries of targeted and specific treatment with immunomodulatory drugs and one potential beneficiary of TPH. Finally, a predictive model of monogenic forms of CVID is established with a sensitivity of 0.8333, a specificity of 0.8214 and an AUC (area under the curve) of 0.8707 in patients whose onset was at a young age, have an increase in transitional B lymphocytes and a clinical phenotype that associates infections and other manifestations of immune dysregulation. In the comparison of the different biomarkers of CVID we demonstrate that the most robust is the determination of sFLCs and that their addition to the established criteria allows us to detect CVID cases that had not been catalogued as CVID due to normal or not assessed vaccine response.

Conclusions: (i) A monogenic cause has been detected in 17.6% of cases in a cohort of patients diagnosed with CVID. (ii) The criteria that have turned out to be relevant for the genetic study are the age of onset of the symptoms, the presence of other clinical manifestations apart from infections and the presence of elevated transitional B lymphocytes. (iii) Free light chains in serum (κ and λ) are a valuable biomarker for

the diagnosis of CVID. (iv) Having the necessary tools for the functional analysis of undescribed genetic variants or variants of uncertain significance has allowed us to confirm our findings in a significant percentage of patients. (v) Our diagnostic approach has made it possible to carry out the family genetic study and to offer genetic counseling to both patients and relatives. (vi) The genetic study has allowed us to identify patients who can potentially benefit from specific treatments.

II. ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Criteris diagnòstics de la immunodeficiència comuna variable proposats a la literatura.

Taula 2. Diferents classificacions de la immunodeficiència comuna variable proposades a la literatura.

Taula 3. Valors de referència de les cadenes lleugeres lliures en sèrum per a mostres de sèrum de subjectes adults (Binding Site).

Taula 4. Relació de nucleòtid i colorants fluorescents.

Taula 5. Nombre i percentatges de les edats dels pacients inclosos a la cohort.

Taula 6. Nombre i percentatges d'altres variables demogràfiques.

Taula 7. Percentatges de les diferents manifestacions clíniques.

Taula 8. Valors absoluts i percentatge de fenotip clínic "Infecció".

Taula 9. Valors d'immunoglobulines. Nadir d'IgG i valors d'IgA i d'IgM.

Taula 10. Valors de subclasses d'immunoglobulines.

Taula 11. Nombres absoluts i percentatge de les diferents subpoblacions de limfòcits B (classificació EUROclass).

Taula 12. Valors absoluts de cadenes lleugeres lliures en sèrum. Fenotip, relació κ/λ i suma $\kappa+\lambda$.

Taula 13. Comparativa entre els diferents biomarcadors d'IDCV.

Taula 14. Valors d'índex kappa.

Taula 15. Taula de contingència amb les variables "resposta vacunal" i "cadenes lleugeres" (fenotip i suma) enfrontades.

Taula 16. Informació detallada de les variants genètiques identificades.

Taula 17. Mitjanes aritmètiques i percentatge de l'expressió de LRBA mitjançant citometria de flux.

Taula 18. Percentatge (%) de les diferents poblacions limfocitàries avançades.

Taula 19. Expressió gènica d'*IKZF1*, *CD19* i *CD3E* de la família IDCV100 i altres individus sans.

Taula 20. Expressió relativa d'*IKZF1* en diferents subpoblacions cel·lulars de 3 controls sans.

Taula 21. Poblacions limfocitàries (percentatge i nombres absoluts) de la família IDCV100.

Taula 22. Resultats de l'estudi de la via de les lectines de la família IDCV100.

Taula 23. Resultats de la producció de citocines en sobrenedant del pacient IDCV017.

Taula 24. Poblacions limfocitàries de les pacients IDCV022 i IDCV038.

Taula 25. Variants mono- i bial·lèliques trobades al gen *TNFRSF13B* (TACI).

Taula 26. Resultats de la producció de citocines en sobrenedant del pacient IDCV147 en les condicions sense estimular (SE), estimulant (E) i índex (E/SE).

Taula 27. Resum dels pacients que s'han beneficiat d'un tractament dirigit.

Taula 28. Resum de l'anàlisi bivariada de l'estudi (amb totes les variants genètiques trobades i només les variants genètiques causals, respectivament).

Taula 29. Mitjanes +/- desviació estàndard per a la variable edat (quantitativa) enfrontada a la variable variant genètica.

Taula 30. Taula de contingència entre grup d'edat i variant genètica trobada.

Taula 31. Mitjanes +/- desviació estàndard per a la variable edat d'inici de símptomes (quantitativa) enfrontada a la variable variant genètica.

Taula 32. Taula de contingència entre grup d'edat d'inici de símptomes i variant genètica trobada.

Taula 33. Taula de contingència entre la variable "Infecció" i variant genètica trobada.

Taula 34. Taula de contingència entre la variable "limfòcits B de transició" i variant genètica trobada.

Taula 35. Model de regressió logística multivariants amb interaccions i incorporant la variable infecció.

Taula 36. Comparativa de gens causals d'IDCV descrits a la literatura.

III. ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Esquema de les diferències entre IDCG, IDC i IDCV.

Figura 2. Desenvolupament, activació i diferenciació dels limfòcits B.

Figura 3. Línia temporal de la descripció de diferents gens associats a la immunodeficiència comuna variable.

Figura 4. Panell de citometria per a la identificació de les subpoblacions de limfòcits B.

Figura 5. *Beads* utilitzades al protocol de NGS.

Figura 6. Protocol de seqüenciació genètica massiva.

Figura 7. Flux de treball en la seqüenciació gènica massiva.

Figura 8. Diagrama de flux proposat per a la realització de l'aproximació genètica.

Figura 9. Esquema del nombre de pacients inclosos a l'estudi.

Figura 10. Número de pacients distribuïts en funció de l'edat d'inici de símptomes.

Figura 11. Distribució dels pacients en funció del nombre de manifestacions clíniques acumulades.

Figura 12. Representació de les manifestacions clíniques de tots els pacients.

Figura 13. Gens amb variants rellevants identificades. Emmarcats dins de requadres aquells gens associats a potencials tractaments dirigits.

Figura 14. Tinció intracel·lular d'LRBA dels pacients IDCV077 i IDCV109.

Figura 15. Arbre genealògic de la pacient IDCV105.

Figura 16. Arbre genealògic de la pacient IDCV076.

Figura 17. Arbre genealògic del pacient IDCV101.

Figura 18. *Western Blot* del pacient IDCV125.

Figura 19. Arbre genealògic del pacient IDCV080.

Figura 20. Arbre genealògic del pacient IDCV106.

Figura 21. Arbre genealògic de la pacient IDCV116.

Figura 22. Arbre genealògic de la pacient IDCV001.

Figura 23. Arbre genealògic de la pacient IDCV100.

Figura 24. Electroferograma de la seqüenciació de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV100.

Figura 25. Expressió relativa d'*IKZF1*, *CD19* i *CD3E* en diferents controls interns.

Figura 26. Model d'un possible arbre evolutiu del gen *MBL2*.

Figura 27. Arbre genealògic del pacient IDCV144.

Figura 28. Identificació de la variant genètica a *IKZF1* (IKAROS) al pacient IDCV144 i al seu pare.

Figura 29. *Western Blot* del pacient IDCV017.

Figura 30. Electroferograma de la seqüenciació de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV022.

Figura 31. Electroferograma de la seqüenciació de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV038.

Figura 32. Arbre genealògic de la pacient IDCV053.

Figura 33. Arbre genealògic de la pacient IDCV095.

Figura 34. Arbre genealògic de la pacient IDCV145.

Figura 35. Arbre genealògic de la pacient IDCV147.

Figura 36. *Western Blot* del pacient IDCV147.

Figura 37. Estudis moleculars del gen *TNFRSF13B* a la pacient IDCV148.

Figura 38. Electroferograma de la seqüenciació de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV148.

Figura 39. Distribució dels pacients de la cohort subsidiaris a rebre tractament dirigit.

Figura 40. Implicació de l'edat en la probabilitat de trobar una variant genètica causal.

Figura 41. Implicació del grup d'edat en la probabilitat de trobar una variant genètica causal.

Figura 42. Implicació de l'edat d'inici de símptomes en la probabilitat de trobar una variant genètica causal.

Figura 43. Implicació del grup d'edat d'inici de símptomes en la probabilitat de trobar una variant genètica causal.

Figura 44. Implicació del fenotip clínic "Infecció" en la probabilitat de trobar una variant genètica causal.

Figura 45. Implicació dels valors de limfòcits B de transició en la probabilitat de trobar una variant genètica causal.

Figura 46. Corba ROC pel model amb interaccions amb el fenotip "Infecció".

IV. ABREVIATURES

A

AD	<i>Autosòmic dominant</i>
ADN	<i>Àcid desoxiribonucleic</i>
AR	<i>Autosòmic recessiu</i>
ALPS	<i>Autoimmune lymphoproliferative syndrome (síndrome limfoproliferativa autoimmune)</i>
APC	<i>Antigen presenting cell (cèl·lula presentadora d'antigen)</i>
APC	<i>Allophycocyanin (aloficocianina)</i>
APECED	<i>Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (síndrome poliendocrina tipus 1)</i>
ASLO	<i>AntiStreptolisina O</i>

B

BCR	<i>B cell receptor (receptor de cèl·lula B)</i>
------------	---

C

CD	<i>Cluster of differentiation (clúster de diferenciació)</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization (hibridació genòmica comparativa)</i>
CMC	<i>Candidiasi Mucocutània Crònica</i>
CMV	<i>Citomegalovirus</i>
Cy7	<i>Cyanine-7 (cianina-7)</i>

D

DE	<i>Desviació estàndard</i>
dNTPs	<i>Nucleòsid trifosfat</i>

E

EDTA	<i>Àcid etilendiamintetraacètic</i>
ESID	<i>European Society for Immunodeficiencies (societat europea d'immunodeficiències)</i>

F

FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate (isotiocianat de fluoresceïna)</i>
FHL	<i>Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (limfohistocitosi hemofagocítica familiar)</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization (hibridació fluorescent in situ)</i>

FMF

Febre Mediterrània Familiar

G

GEA	<i>Gastroenteritis aguda</i>
GOF	<i>Gain of function (guany de funció)</i>
GGEV	<i>Gammaglobulines endovenoses</i>
GGSC	<i>Gammaglobulines subcutànies</i>

H

HIES *Hyper IgE syndrome (síndrome d'Hiper IgE)*

HIPC *The Human Immunology Project Consortium (el Consorci del Projecte d'Immunologia Humana)*

HUVH *Hospital Universitari Vall d'Hebron*

I

ICON *International Consensus Document (document de consens internacional)*

IDC *Immunodeficiència combinada*

IDCG *Immunodeficiència combinada greu*

IDCV *Immunodeficiència comuna variable*

IEI *Inborn errors of immunity (error innat de la immunitat)*

Ig *Immunoglobulina, anticòs*

IPEX *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (desregulació immune, poliendocrinopatia, enteropatia, lligada al cromosoma X)*

IUIS *International Union of Immunological Societies (unió internacional de societats immunològiques)*

L

LNH *Linfoma no Hodgkin*

LOF *Loss of function (pèrdua de funció)*

LT *Limfòcits T*

LB *Limfòcits B*

M

MAF *Minor allele frequency (freqüència de l'al·lel menys comú)*

MGC *Malaltia Granulomatosa Crònica*

N

NGS *Next Generation Sequencing (seqüenciació genètica massiva)*

O

OMA *Otitis mitjana aguda*

OMS *Organització Mundial de la Salut*

OR *Odds ratio (relació de probabilitats)*

P

PAGID *Pan-American Group for Immunodeficiency (grup panamericà per a les immunodeficiències)*

PBMCs *Peripheral blood mononuclear cells (cèl·lules mononuclears de sang perifèrica)*

PCR *Polymerase chain reaction (reacció en cadena de la polimerasa)*

PE *Phycoerythrin (ficoeritrina)*

PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein (peridinina-clorofil·la-proteïna)</i>	WGS	<i>Whole genome sequencing (seqüenciació completa del genoma)</i>
S			
sFLC	<i>Serum free light chains (cadena lleugeres lliures en sèrum)</i>	X	
		XL	<i>X-linked (lligat al cromosoma X)</i>
T			
TBNK	<i>Poblacions limfocitàries T, B, NK</i>		
TD	<i>T-dependent</i>		
TI	<i>T-independent</i>		
TCR	<i>T-cell receptor (receptor de cèl·lula T)</i>		
TPH	<i>Transplantament de progenitors hematopoètics</i>		
TRECS	<i>T-cell receptor excision circles (cercles d'excisió del receptor de cèl·lules T)</i>		
TLR	<i>Toll-like receptors (receptors de tipus toll)</i>		
V			
VEB	<i>Virus Epstein Barr</i>		
VUS	<i>Variant of uncertain significance (variant de significat incert)</i>		
VPH	<i>Virus del papil·loma humà</i>		
W			
WES	<i>Whole exome sequencing (seqüenciació completa de l'exoma)</i>		



INTRODUCCIÓ

V. INTRODUCCIÓ

1. ERRORS CONGÈNITS DE LA IMMUNITAT

Els errors congènits de la immunitat (IEI, de l'anglès *inborn errors of immunity*) són un grup heterogeni de més de 500 malalties congènites que causen alteració quantitativa i/o funcional dels diferents mecanismes implicats en la resposta immunitària. Les persones afectades d'un IEI presenten, de manera variable, una major susceptibilitat de patir infeccions, fenòmens autoimmunitaris i inflamatoris, neoplàsies i al·lèrgies. Tot i que el terme IDP (o PID de l'anglès *primary immunodeficiencies*) està molt estès, estudis recents han manifestat la necessitat de reanomenar-los errors innats de la immunitat (IEI) ja que aquest terme defineix millor i inclou els trastorns amb disfunció immunitària que presenten autoimmunitat, autoinflamació, al·lèrgia o predisposició a la malignitat. A més alguns d'ells estan causats per un guany de funció o un defecte en la regulació immune i no a causa d'un dèficit com a tal.[1]

Els IEI afecten al voltant d'1 de cada 2.000 nounats vius, tot i que són entitats infradiagnosticades. Més del 60% dels afectats es diagnostiquen en edat infantil i el 10% (les més greus) es poden diagnosticar al néixer mitjançant el cribratge neonatal per a la immunodeficiència combinada greu (IDCG). Estudis recents han demostrat que els IEI podrien ser més comuns del que s'havia estimat prèviament i que aproximadament un 1-2% de la població estaria afectada.[2]

La majoria dels IEI són malalties monogèniques (on un únic gen està alterat), i segueixen un patró d'herència mendelià. Aquests IEI són els que estan millor definits i a nivell genètic cal tenir en compte el patró d'herència (AD, AR o XL), el mecanisme d'acció: pèrdua de funció (LOF, de l'anglès *loss of function*) o guany de funció (GOF, de l'anglès *gain of function*), i si l'alteració genètica és germinal o somàtica. De fet, de forma estricta el concepte de variants genètiques somàtiques queden excloses del concepte innat (*inborn*, en anglès) tot i que es troben dins de la classificació de la IUIS.[3]

INTRODUCCIÓ

L'alta heterogeneïtat entre els diferents IEI fa necessària la classificació de les diferents entitats. És per això que la OMS va constituir un comitè a l'any 1970 amb la finalitat de catalogar els diferents IEI. Des de 2013, la “*International Union of Immunological Societies (IUIS)*” publica cada dos anys una actualització dels diferents IEI. La més actual en el moment de la redacció d'aquest treball és la del juny del 2022 en la qual afegeix 55 IEI nous als 442 prèviament descrits al treball del 2019.[3,4]

Així, els IEI es classifiquen en 10 grups en funció d'on es troba el seu defecte. Les característiques de cada grup s'exposen de forma breu a continuació i a la **Taula 1A (Annexos)**.

- (1) Immunodeficiències combinades, que afecten la immunitat cel·lular i humoral. Inclou la immunodeficiència combinada greu (IDCG), altres immunodeficiències combinades (IDC) amb defectes de la immunitat cel·lular (limfòcits T, LT) i de la immunitat humoral (limfòcits B, LB). Els pacients que pateixen un IEI d'aquest grup són susceptibles a patir infeccions greus per múltiples microorganismes i processos d'autoimmunitat en major o menor grau. Aquest subgrup té una freqüència de 10,3% sobre el total dels IEI segons les darreres dades de l'ESID Registry.
- (2) Altres immunodeficiències ben definides (immunodeficiències combinades sovint amb característiques sindròmiques associades). Aquest grup inclou IEI heterogenis entre ells amb defecte T i/o B i amb altres manifestacions sistèmiques extraimmunitàries, ocasionalment relacionades amb alteracions cromosòmiques associades a fenotips sindròmics. Aquest subgrup té una freqüència de 15,1% segons les dades de l'ESID Registry.
- (3) Defectes predominantment d'anticossos. En aquest grup trobem els IEI més comuns. Els IEI inclosos en aquest grup estan causats per defectes en el correcte desenvolupament i diferenciació dels limfòcits B provocant un defecte en la síntesi d'anticossos. Com a conseqüència, els pacients que pateixen defectes en anticossos tenen infeccions bacterianes recurrents i/o elevada susceptibilitat a fenòmens autoimmunitaris. En funció del subtipus d'Ig circulant disminuïda/absent i de les diferents subpoblacions de LB afectades, classifiquem

INTRODUCCIÓ

les diferents entitats d'aquest grup. És una categoria molt àmplia i diversa ja que hi podem trobar des de defectes greus d'agammaglobulinèmia amb absència de LB, reducció greus de les IgG i IgA sèriques amb IgM normal/elevada i nombre normal de cèl·lules B (hiper IgM), defectes d'isotips, de cadenes lleugeres o deficiències funcionals amb un nombre generalment normal de LB o reducció greu d'almenys 2 isotips d'Ig sèriques amb un nombre normal o baix de cèl·lules B (fenotip d'immunodeficiència comuna variable, IDCV), motiu de la present tesi doctoral. La IDCV és un calaix de sastre on s'engloben tots els IEI que compleixen una sèrie de criteris diagnòstics i que no tenen un defecte genètic conegut. En conjunt, aquest subgrup de defectes d'anticossos és el més freqüent i té una freqüència de 50,5% segons les dades de l'ESID Registry.

- (4) Malalties de desregulació immunitària. Aquesta és una gran i diversa categoria d'IEI causada per alteracions genètiques que afecten mecanismes que controlen el sistema immunitari. Alguns d'aquests IEI s'han afegit durant els darrers anys i es divideixen en sis categories: limfocitosis histiocítica familiar (FHL, de l'anglès *familial haemophagocytic lymphohistiocytosis*), defectes de limfòcits T reguladors, fenòmens autoimmunitaris amb o sense limfoproliferació, síndrome de limfoproliferació i autoimmunitat (ALPS, de l'anglès *autoimmune lymphoproliferative syndrome*), immunodesregulació amb colitis i interferonopaties. Aquest subgrup té una freqüència de 5,8% segons les dades de l'ESID Registry.
- (5) Defectes congènits de nombre i/o funció dels fagòcits. En aquesta categoria trobem els IEI causats per alteracions genètiques que afecten al correcte funcionament dels fagòcits, ja sigui de manera quantitativa (en nombre) o qualitativa (en funció). Pel que fa als defectes que afecten al nombre, hi trobem les neutropènies congènites com pot ser el cas de deficiència d'elastasa per variants genètiques al gen *ELANE*. Pel que fa als defectes funcionals, hi podem trobar defectes en la motilitat (per variants genètiques als gens *LAD1*, *LAD2*, *RAC2*, etc.) i defectes a l'esclat respiratori (causats per variants genètiques als gens que codifiquen per proteïnes que formen part del complex de la NADPH oxidasa; *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, etc.). Aquest subgrup té una freqüència de 8,2% segons les dades de l'ESID Registry.

- (6) Defectes en la immunitat innata i intrínseca. Aquesta categoria inclou diversos IEI causats per defectes genètics que posen els pacients en risc d'infeccions greus per part de determinats microorganismes, inclosos micobacteris, virus i fongs. Hi trobem la susceptibilitat mendeliana a la malaltia micobacteriana (MSMD) per defectes a la via de d'interferó gamma, l'epidermodisplàsia verruciforme (VPH), la predisposició a infeccions víriques greus, l'encefalitis per virus herpes simplex (HSE), la predisposició a malalties fúngiques invasores, la predisposició a candidiasi mucocutània i la deficiència de la via de senyalització TLR amb susceptibilitat bacteriana. També altres IEI relacionats amb teixits no hematopoètics i altres errors innats de la immunitat relacionats amb leucòcits. Aquest subgrup té una freqüència de 2,1% segons les dades de l'ESID Registry.
- (7) Trastorns autoinflamatoris. Els trastorns autoinflamatoris són malalties derivades d'una hiperinflamació causada principalment per l'estimulació anormal del sistema immunitari innat. Aquest grup es divideix en (i) interferonopaties de tipus 1 on la producció dels IFN de tipus I es veu alterada causant les manifestacions clíniques clàssiques de la Síndrome de Aicardi-Goutières (AGS), (ii) defectes que afecten l'inflamasoma provocant febres periòdiques, urticàries inflamació i (iii) afeccions no inflamàsòmiques causant artritis inflamatòria autoimmune i inflamació articular entre d'altres manifestacions autoinflamatòries. Aquest subgrup té una freqüència de 3% segons les dades de l'ESID Registry.
- (8) Deficiències del complement. Els defectes congènits en proteïnes del sistema de complement incrementen la susceptibilitat a patir infeccions i fenòmens autoimmunitaris. Aquest grup es divideix en dues subclasses: (i) deficiències en components de la cascada del complement i (ii) defectes en els factors reguladors del complement. Els defectes en els components de la cascada del complement augmenten la susceptibilitat a infeccions per microorganismes encapsulats (variants genètiques a *CIQA*, *CIQB*, *C2*, *C3*, *C4*, etc.) i per bacteris del gènere *Neisseria* spp. (variants genètiques a *C5-C9*, etc.). També augmenten el risc de patir trastorns autoimmunitaris (com el lupus), mentre que els defectes de les proteïnes reguladores del complement poden conduir a trastorns greus a causa de

la sobreactivació del sistema del complement. Aquest subgrup té una freqüència de 3,6% segons les dades de l'ESID Registry.

- (9) Insuficiència de medul·la òssia. Les síndromes d'insuficiència de medul·la òssia són un grup heterogeni de malalties hematològiques no malignes caracteritzades per citopènies d'un o diversos llinatges. Aquest grup inclou totes les variants genètiques causants d'anèmia de *Fanconi* o de discqueratosi congènita i s'han inclòs recentment en la classificació dels IEI de la IUIS.
- (10) Fenocòpies d'IEI. Aquesta és una categoria relativament nova d'IEI que es va afegir a la classificació de la IUIS a l'any 2014. Es caracteritza per presentar variants genètiques que no han estat heretades, sinó que s'adquireixen al llarg de la vida a causa de variants genètiques somàtiques o bé quan el defecte immunitari està causat per autoanticossos contra diverses citocines, com és el cas dels autoanticossos que neutralitzen els IFN de tipus I presents en ~ 20% de les morts per COVID-19.[5]

Els percentatges de freqüència relativa que es presenten en aquest apartat han estat obtinguts a partir del "ESID Registry Network Reporting Tool": <https://cci-reporting.uniklinik-freiburg.de/>

1.1. Manifestacions clíniques dels IEI

La manifestació clínica més àmpliament associada amb els IEI són les infeccions greus i/o recurrents. No obstant, cal tenir en compte altres manifestacions clíniques fruit de la desregulació immunitària així com manifestacions sindròmiques extraimunitàries en alguns casos. Segons el treball de Thalhammer *et al.* en el que analitzen dades de 16.486 pacients europeus registrats a l'ESID Registry, el 68% dels pacients presentaven inicialment només infeccions, el 9% només signes de desregulació immune (és a dir, manifestacions autoimmunes i autoinflamatòries) i un 9% una combinació d'ambdues. Les característiques sindròmiques van ser la característica de presentació en el 12% dels pacients, l'1,5% només es van diagnosticar per antecedents familiars i el 0,8% presentava malignitat. És a dir, uns

INTRODUCCIÓ

signes d'alerta centrats exclusivament en les infeccions haurien exclòs al voltant d'un 25% de pacients amb IEI que debuten amb altres manifestacions.[6]

Pel que fa a l'edat de presentació, els IEI es poden presentar a qualsevol edat, essent més freqüent en els infants menors d'un any (32,8%) i en els d'1 a 5 anys (30,4%). Més del 75% dels pacients tenen símptomes abans dels 16 anys, mentre que el 9% els presenten després dels 40 anys. Pel que fa al patró de manifestacions clíniques, les infeccions són les més freqüents al llarg de tots els rangs d'edat. No obstant, la desregulació immune pren força entre els 6 i 25 anys, amb predomini masculí fins als 10 anys, passant a predomini femení després dels 40 anys.[6]

La manifestació clínica més freqüent en els defectes predominants d'anticossos són les infeccions recurrents i/o greus (principalment del tracte respiratori i/o el tracte gastrointestinal). Els anticossos són crucials per a proporcionar una immunitat normal a l'hoste enfront als patògens; neutralitzen directament els patògens per prevenir infeccions i juguen un paper fonamental en la fagocitosi, la citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos i l'activació del complement. Afortunadament, en cas de deficiència aquestes infeccions es poden controlar -si més no, parcialment- mitjançant el tractament substitutiu amb gammaglobulines i amb profilaxi antimicrobiana. Malgrat això, altres manifestacions clíniques freqüents en aquest grup d'IEI com són la desregulació immune o els tumors malignes no compten amb mesures preventives eficaces més enllà d'un seguiment clínic estret i el seu tractament sovint no està estandarditzat.

Pel que fa al grup de deficiència predominant d'anticossos (grup 3 de la IUIS) que és en el que ens centrarem en el present treball, es caracteritza per tenir un 9% de pacients amb immunodesregulació amb infeccions i un 5% amb immunodesregulació sense infeccions. En el cas de la IDCV són d'un 11% i un 6%, respectivament, segons Thalhammer *et al.*[6]

1.2. Aproximació diagnòstica dels IEI

Davant de la sospita d'un IEI, s'han de realitzar una sèrie d'anàlisis hematològiques, bioquímiques i immunològiques per poder orientar el diagnòstic. De fet, la realització d'un hemograma i la determinació de les immunoglobulines sèriques és suficient per a poder orientar el diagnòstic d'IEI inicialment a la majoria dels casos.

Les proves de laboratori es poden classificar en 4 nivells; les proves de nivell bàsic i de primer nivell es realitzaran en centres d'atenció primària o hospitals que disposin de laboratoris amb els recursos necessaris. Les proves de segon i tercer nivell es realitzaran en centres de referència.[7]

Per a poder valorar els resultats de les proves de laboratori s'han establert valors de referència en pacients sans. S'ha de tenir en compte que els valors de referència varien amb l'edat i que, per tant, és molt important poder disposar d'uns valors de referència per a diferents grups d'edat de les diferents proves de laboratori. És per això que a l'any 2018, el nostre grup va publicar el treball “*Extended Immunophenotyping Reference Values in a Healthy Pediatric Population*” en el qual vàrem elaborar uns valors de referència propis de poblacions limfocitàries, subpoblacions limfocitàries avançades i TRECs, i el treball “*Age-specific pediatric reference ranges for immunoglobulins and complement proteins on the Optilite™ automated turbidimetric analyzer*”, en el que vàrem elaborar uns valors de referència propis d'immunoglobulines, subclasses i proteïnes del complement. [8,9] Ambdós treballs s'ha utilitzat per determinar els valors de normalitat en la present tesi doctoral.

En el cas dels IEI per dèficits d'anticossos, l'aproximació diagnòstica es basa en l'estudi de valors d'immunoglobulines, l'avaluació de la producció d'anticossos, les subpoblacions de limfòcits B que permetin orientar a un defecte genètic concret o l'estudi de les cadenes lleugeres lliures en sèrum. Aquest últim, ha estat recentment proposat per Scarpa *et al.* com un nou potencial biomarcador d'IDCV, sobretot destacant la seva utilitat per a diferenciar la IDCV d'altres causes d'hipogammaglobulinèmia. [10] A més, al 2018 Pecoraro *et al.* proposaven la globulina calculada (CG) (la diferència entre els valors sèrics de proteïna total i

INTRODUCCIÓ

d'albúmina, que reflecteix els valors sèrics d'immunoglobulina) com a prova de cribratge per a la deficiència d'anticossos, amb l'objectiu de reduir els retards de diagnòstic, millorar el pronòstic a llarg termini i reduir els costos sanitaris de la deficiència d'anticossos especialment en aquells àmbits assistencials on no es sol·liciten habitualment estudis immunitaris com pot ser a l'atenció primària.[11]

Les proves de laboratori inicials solen ser quantitatives, en les que es determina el nombre de cèl·lules o molècules totals (expressat en nombres absoluts "x 10⁹/L") o relatives (expressat en percentatges "%") per detectar si algun tipus cel·lular està alterat i orientar així el defecte immunològic. Si l'estudi quantitatiu és troba dins els valors de referència però es manté la sospita cal procedir a la realització de proves qualitatives, en les que s'estudiarà la funcionalitat d'aquestes cèl·lules. Per determinar-ho, és necessària la utilització d'una mostra de donant sa per confirmar que l'experiment ha funcionat correctament. En el cas de l'estudi funcional de les immunoglobulines mitjançant la resposta vacunal, s'estudia la resposta d'anticossos específica a les vacunes administrades comparant el resultat obtingut just abans de la vacunació amb el resultat obtingut 3-4 setmanes després de l'administració de la vacuna. És important incloure vacunes proteiques (tètanus i diftèria) així com de polisacàrids (*Streptococcus pneumoniae* o *Salmonella typhi* Vi) a l'hora de valorar la funcionalitat de la resposta immunitària.

Un punt clau en el diagnòstic dels IEI són els estudis genètics. La seqüenciació Sanger, la primera aproximació genètica pel diagnòstic d'IEI, va ser desenvolupada l'any 1977 i es va convertir en el mètode de seqüenciació més utilitzat durant aproximadament 40 anys. No obstant, és una tècnica costosa i lenta ja que s'ha d'estudiar cada gen de manera individual. Seguidament, i amb la irrupció de la seqüenciació genètica massiva (NGS de l'anglès *next generation sequencing*), es va implementar la utilització de panells personalitzats amb l'avantatge de l'enriquiment dels gens relacionats en una malaltia en concret però amb l'inconvenient que les zones no codificants no són seqüenciades (aquesta limitació també és compartida en la seqüenciació Sanger). Diversos enfocaments de NGS, que van des de la seqüenciació del genoma complet (WGS), la seqüenciació de l'exoma complet (WES) fins a la seqüenciació més restringida d'un panell personalitzat amb gens específics

INTRODUCCIÓ

s'han utilitzat amb èxit per al diagnòstic dels IEI.[12] Actualment, la manera d'enfocar els estudis genètics d'IEI als hospitals terciaris de Catalunya és la realització del panell específic d'IEI en primera instància dins de la pràctica assistencial. Si el panell surt negatiu i persisteix la sospita de malaltia de base genètica la recomanació és realitzar WES o, en alguns casos concrets, WGS.

Independentment dels factors genètics, el desenvolupament de les diferents cèl·lules immunitàries és un procés estretament regulat en el que participen molts factors diferents com són els factors epigenètics. Les modificacions epigenètiques s'estan convertint en objectius terapèutics clau en altres malalties on la seva contribució es coneix des de fa més temps, com el càncer. Recentment, s'ha proposat l'epigenètica com a "tercer eix" (juntament amb la genètica i els agents externs) a considerar en l'etiologia de les immunodeficiències, ja siguin primàries o secundàries. [13]

L'algorisme de treball tradicional fins els últims anys del nostre centre, ha estat la realització de proves immunitàries rutinàries, les posteriors proves funcionals en funció del tipus cel·lular o proteïna afectada, finalitzant amb la realització de l'estudi genètic orientat (és a dir, la seqüenciació Sanger). No obstant, amb al incorporació de l'NGS hi ha hagut un canvi de paradigma pel que fa a l'ordre de proves a seguir, essent el panell genètic la prova de referència i la realització de proves funcionals pertinents a *posteriori* per la confirmació de la patogenicitat de les variants d'interès identificades.

Trobar un defecte genètic potencialment causant de malaltia no sempre és sinònim de diagnosticar al pacient amb èxit. Quan les variants genètiques trobades no han estat prèviament descrites a la literatura, i especialment en els casos de variants genètiques que provoquen canvis d'aminoàcid, s'utilitzen predictors computacionals com són el *PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)* i el *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)*, entre molts d'altres, per estimar quin pot ser l'efecte de la variant genètica.[14,15] Són eines que prediuen el possible impacte d'una substitució d'un aminoàcid per un altre a la estructura i funció d'una proteïna humana considerant paràmetres físico-químics i evolutius.[16] No obstant, sempre cal dur a terme estudis immunològics i funcionals per confirmar la patogenicitat de les variants trobades i

determinar les anomalies funcionals relacionades amb la via de senyalització o cèl·lula en concret i relacionar-les amb la patologia present en el pacient.

1.3. Tractaments dels IEI

El tractament dels IEI ha d'englobar totes les potencials manifestacions de l'IEI que pateix un pacient en concret i ho ha de fer tant des de la vessant preventiva com terapèutica. Així, un dels pilars fonamentals pel tractament dels IEI és la protecció envers els diferents agents infecciosos. Aquesta protecció, és assolida mitjançant diferents aproximacions com poden ser una correcta higiene, el seguiment d'hàbits de vida saludables, la profilaxi farmacològica antiinfecciosa, l'administració de vacunes d'acord amb la patologia de base i/o el tractament substitutiu amb gammaglobulines (endovenoses o subcutànies). A més, caldrà valorar individualment la necessitat de l'administració de tractaments immunomoduladors i, en els casos que sigui possible i estigui indicat, l'opció d'un tractament curatiu com pot ser el transplantament de progenitors hematopoètics (TPH) o la teràpia gènica.

Les recomanacions de la profilaxi antiinfecciosa es basen habitualment en l'opinió d'experts i la base fisiopatològica de la malaltia ja que hi ha poc consens sobre l'ús generalitzat en IEI de la profilaxi primària. No obstant, hi ha certes entitats on la indicació d'aquesta profilaxi queda més clara com són els casos de la malaltia granulomatosa crònica (MGC), la IDCG o els dèficits de complement.[17–19] En el cas de la IDCV, s'ha demostrat que la profilaxi amb azitromicina a dosis baixes aconsegueix reduir els episodis d'exacerbació dels pacients adults amb deficiències d'anticossos, reduint conseqüentment la necessitat d'antibiòtics i el risc d'hospitalització. [20]

Respecte a l'administració de vacunes s'ha de conèixer quin és el mecanisme que es veu afectat en cada cas en particular d'IEI i conèixer si hi ha presència d'immunosupressió afegida. Cal tenir en compte, a més, les diferents indicacions i contraindicacions en els diferents tipus d'IEI així com la possibilitat de vacunar l'entorn en el cas que estigui contraindicada la vacunació en el pacient.[21,22]

INTRODUCCIÓ

El tractament substitutiu amb gammaglobulines és la base del tractament de molts IEI com és el cas de la IDCV. L'administració de gammaglobulines inespecífiques intravenoses (GGEV) ha estat la via d'administració d'elecció en els IEI durant més de 50 anys amb una utilització creixent de la via d'administració subcutània (GGSC) els darrers anys. Els casos d'IEI susceptibles a rebre gammaglobulines són els casos de dèficits d'anticossos (IDCV, agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X, síndrome d'hiper IgM autosòmica recessiva) i els casos de dèficits combinats de limfòcits T i B que cursen amb producció deficient d'anticossos o amb resposta insuficient a antígens específics (IDCG, síndrome Wiskott-Aldrich, atàxia-telangièctasi, síndrome d'hiper IgM lligat al cromosoma X, etc.).

Tot i que pugui semblar sorprenent, alguns IEI necessiten tractaments immunosupressors per tractar manifestacions autoimmunitàries o autoinflamatòries. La capacitat d'identificar amb precisió la base molecular dels trastorns immunitaris ha obert el camí per a l'aplicació de teràpies dirigides, com és el cas de l'administració de *sirolimus* (APDS)[23], *abatacept* (haploinsuficiència de CTLA4, deficiència de LRBA) [24], o *ruxolitinib* (STAT1-GOF, STAT3-GOF).[25]

El TPH té el potencial de proporcionar una cura definitiva per a molts tipus d'IEI, tot i que les decisions sobre la indicació, el temps i els riscos s'han de tractar de forma individual i no només en funció de l'IEI específic, sinó tenint en compte també les característiques úniques del pacient.[26] Els avenços recents pel que fa als agents condicionants amb toxicitat reduïda han millorat dràsticament el resultat del TPH en pacients amb IEI.[27] A més, cal tenir en compte que amb la recent incorporació del cribratge neonatal per la IDCG i la identificació d'aquests pacients abans de que hi pugui haver complicacions infeccioses, també millora el resultat del TPH en aquest subgrup de pacients.[28] Tant la selecció del donant, com l'acondicionament i la prevenció de complicacions han millorat el pronòstic dels pacients amb IEI sotmesos a TPH els darrers anys. En el cas de la IDCV, no queda clar el benefici real del TPH i actualment hi ha en marxa el projecte STEM-PAD coordinat per l'ESID amb l'objectiu d'avaluar el nombre, la indicació, la mortalitat, la morbiditat i la reconstitució immune després de TPH en pacients amb deficiència d'anticossos. Recentment, Froehlich *et al.* van publicar un cas de trasplantament autòleg de

INTRODUCCIÓ

cèl·lules mare en una pacient amb IDCV amb encefalitis autoimmune refractària amb èxit. [29] No obstant, hi ha pacients que aconsegueixen sortir del paraigües d'IDCV gràcies a l'estudi genètic i que en funció de la seva patologia es poden beneficiar d'un TPH com en el cas de l'APDS per variants genètiques a *PIK3R1* o *PIK3CD*.

El tractament curatiu estrella per a alguns tipus d'IEI dels últims anys és la teràpia gènica. Es basa en un trasplantament autòleg de cèl·lules mare hematopoètiques pròpies editades genèticament per corregir el gen defectuós. La teràpia gènica ha estat utilitzada amb èxit en diversos IEI, com ara la immunodeficiència combinada greu (IDCG) per dèficit d'adenosina desaminasa, la IDCG per deficiència en la cadena gamma del receptor de la IL-2 (lligada al cromosoma X), la síndrome de Wiskott-Aldrich (lligada al cromosoma X), la malaltia granulomatosa crònica lligada al cromosoma X o la deficiència d'adhesió de leucòcits tipus I (LAD-I).[30] No obstant, fins al moment no és un dels tractaments recomanats per a la IDCV.

2. IMMUNODEFICIÈNCIA COMUNA VARIABLE (IDCV)

2.1. Dades demogràfiques de la IDCV

La immunodeficiència comuna variable (IDCV) és l'IEI simptomàtic més comú ja que afecta entre 1/10.000 i 1/100.000 individus, sense diferències entre gèneres, [31] i es caracteritza per presentar un ventall de manifestacions clíniques molt variable. Com s'ha comentat, està inclosa dins el grup de defectes predominantment d'anticossos i es caracteritza per presentar hipogammaglobulinèmia, pobra resposta a vacunes, trastorns d'immunodesregulació i limfoproliferació i un major risc de malignitat.[4]

Aquesta entitat va ser descrita per primera vegada al 1971 per Fudenberg *et al.* en el “*Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee*” per separar les síndromes de deficiència d'anticossos menys ben definides d'altres amb una descripció clínica més coherent i herència mendeliana.[32]

La majoria de casos d'IDCV són esporàdics, encara que són freqüents les famílies amb diversos casos. De fet, es considera que aproximadament un 10-20% dels casos d'IDCV tenen algun familiar amb un defecte de producció d'anticossos, ja sigui una IDCV, un dèficit selectiu d'IgA o un dèficit de subclasses d'IgG amb elevada variabilitat geogràfica i major freqüència en àrees d'elevada consanguinitat.[33]

Atesa la variabilitat inherent al propi nom de la malaltia, hi ha hagut diversos intents per homogeneïtzar el diagnòstic d'aquesta entitat atès que en molts casos no es pot establir un diagnòstic definitiu. Així, al propi registre de la *European Society for Immunodeficiencies* (ESID, www.esid.org), una recent publicació del grup neozelandès d'Ameratunga i col·laboradors [34] i sobretot l'esforç de la *ICON* (*International Collaboration on Asthma, Allergy and Immunology*) liderada per Bonilla al 2015 [35] han pretès arribar a un diagnòstic el més acurat possible de la IDCV a partir de criteris clínics, valors d'immunoglobulines sèriques, història familiar i qualitat de la resposta a vacunes (veure **taula 1**). Tot i això, fins a dia d'avui encara no s'ha arribat a un consens per aquelles entitats en les que no disposem d'una confirmació genètica.

2.2. Criteris diagnòstics de la IDCV

Els criteris diagnòstics de la ICON-2015, que són els que s'utilitzaran en aquest treball, són els següents:

- (1) La majoria de pacients han de tenir al menys una de les manifestacions clíniques característiques (infecció, autoimmunitat limfoproliferació). No obstant, es pot establir diagnòstic d'IDCV en individus asimptomàtics que compleixin de 2 a 5 criteris diagnòstics, especialment en casos familiars.
- (2) La hipogammaglobulinèmia s'ha de definir en funció de l'edat del pacient, ajustada al rang de referència per al laboratori on es realitza la mesura. Els valors d'IgG han de ser repetidament baixos en almenys 2 determinacions amb més de 3 setmanes de diferència. Es pot ometre la mesura repetida si el valor és molt baix (<100–300 mg/dL segons l'edat), si hi ha altres trets característics o si es considera iniciar la teràpia amb IgG tan ràpidament com sigui possible atesa la gravetat del quadre clínic.
- (3) Els valors d'IgA o IgM també han d'estar disminuïts.
- (4) Es recomana estudiar en tots els pacients amb uns valors sèrics d'IgG superiors a 100 mg/dL la resposta T-dependent (TD) i T-independent (TI) als antígens, sempre que sigui possible. En tots els pacients sotmesos a aquestes proves, s'ha de demostrar una alteració de la resposta vacunal a almenys un tipus d'antigen (TD o TI). Segons el criteri del professional sanitari, es pot prescindir de la mesura específica d'anticossos si es compleixen tots els altres criteris i si es creu que el retard que suposa la determinació d'anticossos post-vacunació (normalment 4 setmanes) pot posar en risc la salut del pacient.
- (5) Cal excloure altres causes d'hipogammaglobulinèmia.
- (6) Els estudis genètics per investigar formes monogèniques d'IDCV o per polimorfismes que modifiquen la malaltia no són generalment necessaris pel diagnòstic i el tractament en la majoria dels pacients, especialment aquells que presenten només infeccions sense desregulació immune, autoimmunitat, malignitat o altres complicacions. No obstant això, en aquests darrers grups de pacients, els defectes d'un sol gen poden ser susceptibles a teràpies específiques i, si és possible, s'ha de tenir en compte el diagnòstic genètic molecular.

Taula 1. Criteris diagnòstics de la IDCV proposats a la literatura.

	European Society for Immunodeficiencies (ESID) (https://esid.org) / Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID) 1999 [36]	Ameratunga 2013 [37]	ICON 2015 [35]	Criteris ESID revisats al 2019 [38]
Edat de presentació pel diagnòstic	Aparició de la immunodeficiència a una edat major de 2 anys.	> 4 anys.	ND	Diagnòstic després del 4rt any de vida (tot i que els símptomes hagin aparegut abans).
Manifestacions clíniques	ND	Un o més criteris: Infeccions recurrents, greus o inusuals; mala resposta als antibiòtics; infeccions bacterianes recurrents malgrat els antibiòtics profilàctics; infeccions malgrat la immunització amb la vacuna adequada, p.e. malaltia del VPH; bronquièctasis i/o sinupatia crònica; trastorns inflamatoris o autoimmunitat.	Almenys una de les següents manifestacions clíniques: infeccions, autoimmunitat, limfoproliferació. No obstant, el diagnòstic d'IDCV es pot fer en individus asimptomàtics que compleixin 2 de 5 criteris, especialment en casos familiars.	Al menys un dels següents: alta susceptibilitat a infeccions; manifestacions autoimmunes; malaltia granulomatosa; limfoproliferació policlonal inexplicable; membre familiar afectat d'una deficiència d'anticossos.
IgG	PROBABLE: disminució important d'IgG (almenys 2 DE per sota de la corresponent a l'edat del pacient) POSSIBLE: disminució marcada (almenys 2 DE per sota de la corresponent a l'edat del pacient) en almenys un dels isotips principals (IgM, IgG i/o IgA).	Hipogammaglobulinèmia: IgG per sota de 5 g/L per adults.	Descens d'IgG repetidament en dues ocasions (més de 3 setmanes de diferència entre determinacions), segons els valors de referència del centre on se segueix el pacient.	Disminució marcada d'IgG (mesurats dues vegades; <2 DE dels valors de referència per a la seva edat).
IgM/IgA	PROBABLE: disminució important d'IgA (almenys 2 DE per sota de la corresponent a l'edat del pacient) POSSIBLE: disminució marcada (almenys 2 DE per sota de la corresponent a l'edat del pacient) en almenys un dels isotips principals (IgM, IgG i/o IgA).	Deficiència o reducció concomitant d'IgA (<0,8 g/L) i/o IgM (<0,4 g/L).	Descens d'IgA i/o IgM per sota de 2 DE segons els valors de normalitat del centre on se segueix el pacient.	Disminució marcada de la IgA amb o sense disminució dels valors d'IgM (mesurats dues vegades; <2 DE dels valors de normalitat per a la seva edat).
Isohemaglutinines	Absents.	Absents (si no és el grup sanguini AB).	Absents.	Absents.
Resposta a vacunes	Resposta pobre.	Respostes disminuïdes a la vacunació en comparació amb els controls adaptats a l'edat i/o respostes transitòries a les vacunes en comparació amb els controls adaptats a l'edat.	Pobra resposta.	Pobra resposta.
Criteris d'exclusió	Descartades altres causes d'hipogammaglobulinèmia.*	Altra causa de defecte immunitari identificada.	Descartades altres causes d'hipogammaglobulinèmia.*	Descartades altres causes d'hipogammaglobulinèmia.*
Limfòcits B de	ND	Presència de cèl·lules B però subtípus	ND	Limfòcits B de canvi de classe

memòria		de cèl·lules B de memòria reduïts i/o subpoblació de CD21 ^{low} augmentada per citometria de flux.		disminuïts (<70% dels valors de referència per a la seva edat).
Altres proves de laboratori	ND	Deficiència d'IgG3 (<0,2 g/L) Demostració serològica d'autoimmunitat, p.e.: Test de Coombs positiu. Confirmació molecular d'un defecte compatible amb IDCV, per exemple; <i>TACI</i> , <i>BAFFR</i> , <i>MSH5</i> , etc.	El diagnòstic no està influït per criteris de laboratori addicionals.	Absència d'una deficiència de limfòcits T profunda, descrita com a: CD4 nombres/ μ L; 2-6 anys <300, 6-12 anys <250, >12 anys <200, % de limfòcits CD4+ naïve: 2-6 anys <25%, 6-16 anys <20%, >16 anys <10%. Proliferació de limfòcits T absent.
Histologia	ND	Presència de qualsevol dels marcadors histològics relativament específics d'IDCV (no és necessari per al diagnòstic, però la presència augmenta la certesa diagnòstica): pneumonitis intersticial limfoide, trastorn granulomatós, hiperplàsia regenerativa nodular del fetge, hiperplàsia limfoide nodular de l'intestí, absència de cèl·lules plasmàtiques en biòpsia intestinal.	El diagnòstic no depèn de criteris histològics.	ND

*Diagnòstic diferencial d'hipogammaglobulinèmia: induïda per fàrmacs, trastorns genètics, malalties infeccioses, malignitat, trastorns sistèmics. ND: No disponible.

2.3. Manifestacions clíniques de la IDCV

La IDCV es caracteritza per presentar una extensa varietat de complicacions infeccioses i no infeccioses molt heterogènies en els diferents pacients que la pateixen. [39,40]

La manifestació clínica més comuna en la IDCV són les infeccions, principalment respiratòries i/o gastrointestinals causades tant per bacteris com per virus.

2.3.1. Infeccions respiratòries

Segons l'estudi de Gathmann *et al.* en el que estudien el quadre clínic de 2.212 pacients amb IDCV, la pneumònia és la manifestació clínica més comuna afectant a un 32% de pacients de la cohort. [41] Altres manifestacions clíniques recurrents poden ser les sinusitis, bronquitis i otitis mitja sovint degudes a *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. Altres infeccions com les causades per *Rhinovirus* *Mycoplasma pneumoniae* són més prevalents i persistents en els pacients amb IDCV. Les bronquièctasis i la malaltia pulmonar intersticial són complicacions pulmonars importants que sovint es manifesten després d'infeccions pulmonars recurrents i greus.

2.3.2. Infeccions gastrointestinals

Les infeccions del tracte gastrointestinal són menys freqüents i es manifesten en forma de diarrea crònica o aguda causada per diferents organismes infecciosos com *Giardia lamblia* o *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Campylobacter* spp. amb presència d'hiperplàsia limfoide fol·licular profunda en els estudis histològics. Aquestes infeccions són característiques de pacients amb valors sèrics d'IgA indetectables.

2.3.3. Autoimmunitat

Els fenòmens autoimmunitaris en els pacients amb IDCV tenen lloc quan l'autotolerància es veu afectada, i els pacients produeixen autoanticossos dirigits contra antígens propis. És la segona manifestació clínica més freqüent en l'estudi de Gathmann *et al.* amb un 29% d'afectació a la seva cohort d'estudi. A més, el seu estudi suggereix associacions positives entre les manifestacions clíniques d'autoimmunitat, enteropatia, granulomes i esplenomegàlia. Les citopènies autoimmunes són la forma més freqüent en forma de púrpura trombocitopènica idiopàtica, anèmia hemolítica autoimmune i/o neutropènia autoimmune. També es descriuen quadres d'autoimmunitat òrgan-específica i s'ha associat la IDCV a artritis reumatoide, lupus eritematós sistèmic i vasculitis.

2.3.4. Limfoproliferació i càncer

Els pacients amb IDCV tenen un major risc de càncer. El treball de Gathmann *et al.* troba un 5% de casos amb tumors sòlids i un 3% de limfomes. [41] La majoria de limfomes són del tipus de limfoma no Hodgkin de cèl·lules B i els càncers més freqüents són el gàstric, colorectal i de mama. No obstant, en pacients amb IDCV, els trastorns limfoproliferatius benignes són més freqüents que els limfomes; així, el 30% dels pacients presenten esplenomegàlia i limfadenopaties i hiperplàsia limfoide.

El major risc de càncer dels pacients amb IDCV pot ser degut a una immunitat alterada davant patògens potencialment carcinògens (*Helicobacter pylori*, virus d'Epstein Barr (VEB),...) o a una vigilància de les cèl·lules tumorals alterada. A més, cal destacar que els pacients d'un subgrup de la IDCV presenten una radiosensibilitat més elevada, un factor de risc associada a una major incidència de tumors.

2.3.5. *Altres manifestacions clíniques*

El ventall de manifestacions clíniques que poden patir els pacients amb IDCV és molt ampli, incloent infiltració granulomatosa, altres, tumors sòlids, meningitis/encefalitis, malaltia inflamatòria intestinal i síndromes malabsortives entre d'altres.

Aquesta alta heterogeneïtat fa que sovint sigui difícil la realització d'estudis comparatius entre cohorts i la realització d'assajos clínics, fet que fa necessària una agrupació dins de la pròpia IDCV de les manifestacions clíniques. És per això que diferents autors de la literatura proposen classificacions basant-se en la presència o no d'infeccions i altres manifestacions no infeccions agrupades en tres fenotips clínics: “només infeccions”, “infeccions+” i “sense infeccions”. [42–45]

2.4. La immunologia de la IDCV

Els limfòcits B han estat sempre el focus principal de la base immunològica de la IDCV, motiu pel que s'ha inclòs aquesta entitat en el grup dels defectes de producció d'anticossos. No obstant, també es poden observar anomalies menys greus als limfòcits T: reducció del nombre de cèl·lules T CD4⁺ totals, naïve i de memòria, disminució del nombre de cèl·lules T CD8⁺ naïve i efectores, reducció de recents emigrants tímics, augment de cèl·lules T CD4⁺ activades, disminució de la freqüència de les cèl·lules Th17 circulants, cèl·lules T reguladores poc efectives [39], defectes en la producció de citocines, reducció de la producció tímica i esgotament de cèl·lules T. [46] Per tant, la línia que separa la IDCV d'altres immunodeficiències combinades no és clara. De fet, tenir un defecte greu de limfòcits T ja és un criteri d'exclusió de la IDCV segons els nous criteris diagnòstics de l'ESID (CD4 nombres/ μ L; 2-6 anys <300, 6-12 anys <250, >12 anys <200, % de limfòcits CD4⁺ naïve: 2-6 anys <25%, 6-16 anys <20%, >16 anys <10% i una proliferació de limfòcits T absent). (Figura 1).

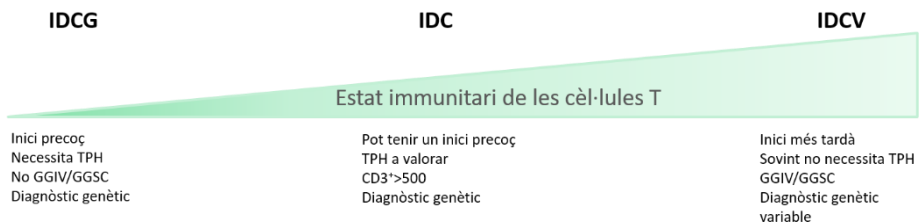


Figura 1. Esquema de les diferències entre IDCG, IDC i IDCV.

Respecte a l'afectació dels limfòcits B, cal conèixer els diferents passos de maduració fisiològica d'aquests tipus de limfòcits. Els limfòcits B es desenvolupen a la medul·la òssia (maduració central) a partir de cèl·lules mare pluripotents, en absència d'antigens, reaccionant a senyals de les cèl·lules estromals com, per exemple, citocines solubles o contactes cèl·lula - cèl·lula. La cèl·lula progenitora B "pro-B cell" és la primera etapa del desenvolupament de les cèl·lules B on s'inicia el reordenament del receptor de limfòcits B o BCR (de l'anglès, *B cell receptor*).

INTRODUCCIÓ

Aquestes, expressen antígens associats a cèl·lules mare com CD34 i CD117, i antígens específics de línia cel·lular B com són CD19 i CD22.

El següent estadi és la cèl·lula “pre-B”, la qual ja presenta un pre-BCR. Aquestes no presenten receptor antigènic complet a la superfície i poden ser autoreactives. La següent etapa de diferenciació és la anomenada “cèl·lula B immadura”. L'expressió del BCR complet en superfície facilita la selecció negativa antígen-específica per eliminar l'autoreactivitat: seran eliminades mitjançant apoptosi si el seu BCR s'uneix a autoantígens presentats per les cèl·lules estromals a la medul·la òssia (procés conegut com a *deleció clonal* o *anergia clonal*). En aquest punt finalitza el desenvolupament central.

Els limfòcits B que han sobreviscut a la selecció negativa abandonen la medul·la òssia i passen a la circulació per completar la seva maduració perifèrica als òrgans limfàtics secundaris (teixit limfoide associat a mucoses, ganglis limfàtics i melsa). Són els anomenats limfòcits B de transició ($CD24^{high}CD38^{high}$) que, posteriorment, es desenvolupen a cèl·lules B naïve, les quals expressen IgM i IgD a la seva membrana. Aquestes cèl·lules encara no s'han trobat amb el seu antígen específic. Les cèl·lules B naïve poden ser activades per la via T-dependent o per la via T-independent. En la via T-dependent, les cèl·lules T $CD4^{+}$ activen els limfòcits B específics d'antigen a través del CD40 lligand (CD40L). Totes les cèl·lules que no han rebut el senyal de supervivència de les cèl·lules T moren per apoptosi.

Els limfòcits B esdevindran productors d'IgM de baixa afinitat per l'antigen. Per poder produir anticossos amb una afinitat pels antígens més elevada, les cèl·lules B passen per un procés de desenvolupament en els fol·licles limfàtics, on rebran senyals de maduració i supervivència i es diferenciaren en cèl·lules B fol·liculars o cèl·lules B de la zona marginal. Quan la cèl·lula B naïve es troba amb l'antigen que coincideix amb el seu anticòs, la unió de l'antigen a l'anticòs fa que la cèl·lula es divideixi ràpidament; formant el centre germinal. La reacció de centre germinal permet que les cèl·lules B desenvolupin la seva habilitat de producció d'anticossos d'altres classes (*canvi d'isotip*) i d'una afinitat més alta mitjançant el fenomen d'*hipermutació somàtica*, gràcies al gen *AID*.

INTRODUCCIÓ

Els limfòcits B (LB) abandonen els centres germinals com a cèl·lules B de memòria re-circulants (tenen una vida útil més llarga que les cèl·lules naïve i expressen el mateix anticòs de membrana que les seves cèl·lules progenitores) i com a cèl·lules B efectores anomenades cèl·lules plasmàtiques que secreten anticossos i ja no presenten BCR a la membrana. A diferència de les cèl·lules plasmàtiques de la medul·la òssia, les quals poden sobreviure anys, les cèl·lules plasmàtiques de vida curta viuen només uns dies i poden segregar enormes quantitats d'anticossos durant aquest temps.[47] (Figura 2)

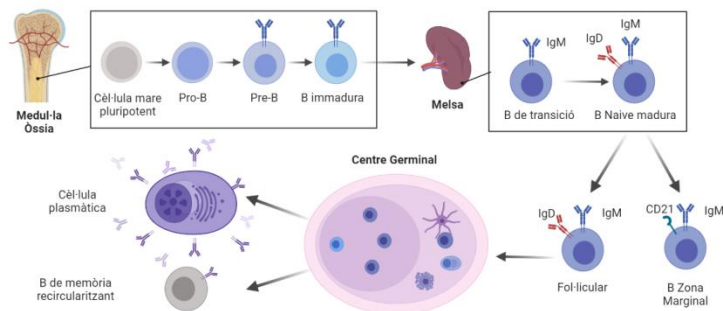


Figura 2. Desenvolupament, activació i diferenciació dels limfòcits B.
Imatge creada amb BioRender (<https://app.biorender.com/>)

En funció de les proporcions de les diferents subpoblacions de LB en un pacient concret, diversos autors han proposat 3 classificacions diferents per mirar de trobar una correlació de rellevància amb la clínica (Taula 2):

- La classificació de Freiburg (2002) [48] s'obté a partir d'un estudi realitzat amb 38 pacients amb diagnòstic d'IDCV, els quals van ser classificats en base a estudis de citometria de flux de les subpoblacions de limfòcits B de canvi de classe (class switched) i $CD21^{low}$, generant 3 grups diferents; Ia, Ib i II. Es van correlacionar els percentatges de les diferents subpoblacions amb diferents manifestacions clíniques.
- La classificació de París (2003) [49] neix d'un estudi realitzat amb 57 pacients diagnosticats d'IDCV, els quals es classifiquen en base a la citometria de les subpoblacions de limfòcits B de memòria i de canvi de

classe, generant 3 grups diferents; MB0, MB1 i MB2. Igual que amb la classificació anterior, els autors correlacionen diferents manifestacions clíniques amb cada subgrup.

- La classificació EUROclass (2008) [50] és un estudi realitzat amb 303 pacients amb diagnòstic d'IDCV de 8 centres europeus, els quals són classificats en 7 grups diferents depenent de les subpoblacions de limfòcits B. En aquest estudi es tenen en compte els valors de limfòcits B totals, de canvi de classe, CD21^{low} i de transició. De nou, els autors correlacionen els diferents fenotips immunològics amb diferents manifestacions clíniques i aquesta és la classificació que es tindrà en compte per la realització del present treball.

Les immunoglobulines estan formades per dues cadenes pesades i dues cadenes lleugeres idèntiques (kappa (κ) o lambda (λ)). Les cadenes lleugeres lliures solen ser detectables al sèrum a causa d'un excés de producció en comparació amb les cadenes pesades. Les cadenes lleugeres (cadenes L, de *light* en anglès) de les immunoglobulines que han quedat lliures al torrent sanguini són les anomenades cadenes lleugeres lliures en sèrum (sFLC de l'anglès *serum free light chain*). Les sFLC són produïdes en excés al llarg del desenvolupament de les cèl·lules B fins que aquestes assoleixen la fase de cèl·lules plasmàtiques, on les sFLC s'uneixen a les cadenes pesades (cadenes H, de *heavy* en anglès). Les cadenes lleugeres sobrants, entren a la circulació sanguínia, i es pot correlacionar la seva secreció amb el grau d'activació dels limfòcits B. Així, les sFLC són un biomarcador recentment proposat pel diagnòstic de la IDCV.[10]

La majoria dels pacients amb IDCV presenten sFLC indetectables o amb valors fins a 10 vegades inferiors en comparació amb altres deficiències d'anticossos primàries. Tenint en compte que les cadenes lleugeres κ i λ solen ser secretades en excés respecte a les immunoglobulines, aquesta troballa suggereix un defecte intrínsec de la diferenciació de les cèl·lules B en els pacients amb IDCV. [10,51]

Taula 2. Diferents classificacions de la IDCV proposades a la literatura.

Classificació de Freiburg [48]	Classificació de Paris [49]	Classificació EUROclass [50]
<p>Grup I: <0,4% de cèl·lules B de memòria de canvi de classe (CD27⁺IgM⁺IgD⁻).</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Ia: més d'un 20% de cèl·lules B CD21^{low} immadures. ○ Ib: menys d'un 20% de cèl·lules B CD21^{low} immadures. <p>Grup II: >0,4% de cèl·lules B de memòria de canvi de classe (CD27⁺IgM⁺IgD⁻)</p>	<p>MB0: gairebé sense cèl·lules de memòria B i CD27⁺ <11%.</p> <p>MB1: amb defectes en el canvi de classe (IgD⁺CD27⁺) però limfòcits NON-SWITCHED normals (IgD⁺CD27⁺) i CD27⁺ >11%, CD27⁺IgM⁺IgD⁻ <8%.</p> <p>MB2: limfòcits B de memòria normals i tots aquells que no encaixin ni a MB0 ni a MB1.</p>	<p>Grup B+: >1% limfòcits B</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ smB+:>2% de limfòcits B de canvi d'isotip <ul style="list-style-type: none"> ▪ smB+21^{low}: ≥10% limfòcits B CD21^{low} ▪ smB+21^{normal}: <10% de limfòcits B CD21^{low} ○ smB-:≤2% de limfòcits B de canvi d'isotip <ul style="list-style-type: none"> ▪ smB-Tr^{high}: ≥9% de limfòcits B de transició ▪ smB-Tr^{norm}: <9% de limfòcits B de transició ▪ smB-21^{low}: ≥10% limfòcits B CD21^{low} ▪ smB-21^{normal}: <10% de limfòcits B CD21^{low} <p>Grup B-: ≤1% limfòcits B</p>

2.5. Genètica de la IDCV

La variabilitat de la presentació clínica en edat i gravetat sempre ha fet sospitar que es tracta d'una entitat heterogènia des d'un punt de vista genètic, plantejant un origen poligènic i un important paper de factors epigenètics i ambientals com a potencials causes de la malaltia [52,53]. La identificació de defectes monogènics causants de la malaltia és complicada atesa la gran heterogeneïtat de la IDCV. A més, també ho complica el fet que la mateixa entitat clínica pot ser causada per variants genètiques en diferents gens, de la mateixa manera que variants genètiques en un mateix gen poden causar manifestacions clíniques diferents.

En els últims anys i gràcies sobretot a l'aplicació de tècniques d'NGS, s'ha confirmat el paper de variants genètiques prèviament descrites i al mateix temps s'han descrit noves entitats com a causants d'IDCV [54,55]. De fet, segons la IUIS, quan es troba un defecte genètic relacionat amb la diferenciació/supervivència dels limfòcits B, el pacient queda exclòs del paraigües IDCV que només engloba entitats sense diagnòstic genètic i el pacient és re-diagnosticat segons el defecte en concret. Entre els gens causants d'IDCV trobem defectes en gens implicats en la diferenciació dels limfòcits B i T com *CD19*, *CD20*, *ICOS*, *TNFRSF13C* (BAFFR), *LRBA* o *CTLA4*, entre d'altres, així com variants genètiques de susceptibilitat a IDCV en gens com *TNFRSF13B* (TACI) o en el locus *HLA*. Es creu que fins a un 15-30% del total dels casos serien de causa monogènica, però només s'han estudiat mitjançant NGS tres cohorts àmplies a nivell internacional i els abordatges són variables i potencialment optimitzables.[54–56]

La identificació dels nombrosos defectes monogènics relacionats amb la IDCV ha augmentat contínuament amb el temps, sobretot en els últims 10 anys, a causa de l'ús cada vegada més estès de la tecnologia de NGS (**Figura 3**).

El coneixement del gen causant en els casos d'IDCV monogènica no només permet l'oferiment d'una teràpia dirigida en els casos en els que sigui possible, si no que també permet la instauració d'un assessorament genètic i pre-concepcional a pacients i familiars. Hi ha causes genètiques relacionades amb la IDCV que es poden traçar a través de la història familiar tot i que s'ha vist que en alguns casos les variants

genètiques en pacients amb IDCV tenen una penetrància incompleta i es poden presentar com a fenotips diferents dins de les mateixes famílies.[57] L'estudi genètic dels familiars és de gran rellevància tenint en compte que els familiars de pacients amb IDCV poden presentar defectes humerals (IDCV, dèficit selectiu d'IgA, deficiència de subclasses d'IgG, o altres tipus d'hipogammaglobulinèmia).

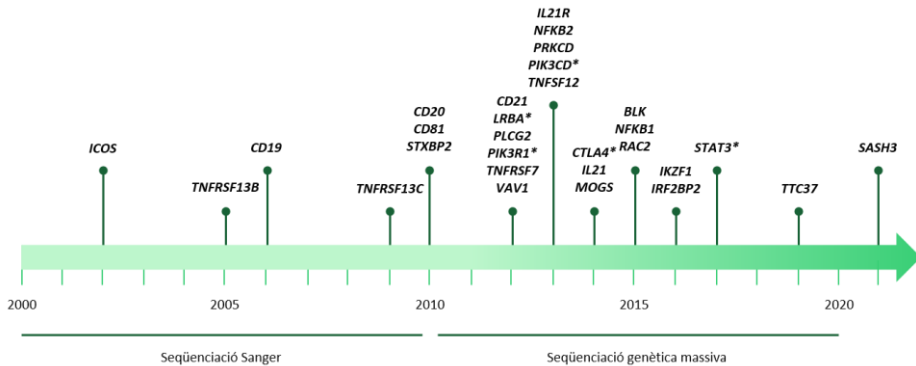


Figura 3. Línia temporal de la descripció de diferents gens associats a la IDCV.

* Gens associats a tractaments específics.

Entre un 8% i un 10% de pacients amb IDCV presenten variants genètiques que alteren la funció del gen que codifica per l'activador transmembrana i l'interactor CAML (TACI), codificat pel gen *TNFRSF13B* (membre 13B de la superfamília del receptor del factor de necrosi tumoral).[58] La unió de TACI amb els seus lligands APRIL (*TNFSF13*) i BAFF (*TNFSF13B*) és important pel procés de canvi de classe de les immunoglobulines.[35] No obstant, les variants trobades a *TACI* s'han d'interpretar amb cautela i es postula que variants patogèniques bial·lèliques (homozigotes o heterozigotes compostes) causen IDCV amb penetrància alta mentre que variants patogèniques monoal·lèliques (heterozigotes) només s'associen a una susceptibilitat augmentada de patir IDCV (ja que aquestes variants es troben també en població general, tot i que menys freqüentment).[59]

Segons el treball de Tuijnburg *et al.* amb 390 pacients amb IDCV estudiats, el gen més freqüentment causant d'IDCV és *NFKB1*. [60] Els gens *NFKB1* i *NFKB2* codifiquen per la proteïnes p105 i per la proteïna p100 respectivament. Aquestes, mitjançant un processament post-traduccional produeixen unes proteïnes més petites

INTRODUCCIÓ

(p50 i p52) que entraran al nucli i activaran la transcripció de certs gens.[61] Variants genètiques als gens *NFKB1* i *NFKB2* han estat associades a infeccions sinopulmonars recurrents, malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), proliferació de VEB, citopènies autoimmunes, alopecia i tiroïditis autoimmune (*NFKB1*) i a infeccions sinopulmonars recurrents, alopecies i endocrinopaties (*NFKB2*).[62] No obstant, cal tenir en compte que segons la cohort estudiada (ètnia població d'origen, edat) els gens més freqüentment causants d'IDCV poden variar.

Variants als gens *LRBA* i *CTLA4* són de les més descrites com a causals d'IDCV amb un 26,74% i un 6,42% de freqüència respectivament segons el treball de Bogaert *et al.*[54] La proteïna LRBA (de l'anglès *LPS responsive beige-like anchor protein*) és una proteïna que participa en el trànsit vesicular i al reciclatge dels endosomes. El CTLA4 (de l'anglès *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) és un inhibidor de limfòcits T que regula negativament les respostes immunitàries. S'ha demostrat que la proteïna LRBA participa en el procés que condueix a l'expressió superficial de CTLA4.[24] Per tant, la deficiència d'ambdues proteïnes acaba desencadenant una absència de la molècula inhibidora CTLA4. La clínica és molt similar entre les dues entitats amb citopènies autoimmunes, enteropatia, malaltia pulmonar intersticial, infiltració limfocítica extra-limfoide i infeccions recurrents. En el cas del gen *CTLA4* s'han descrit casos de variants patogèniques en individus asimptomàtics (penetrància incompleta).

Altres gens on es troben variants causants d'IDCV amb una alta freqüència són els gens *PIK3CD* (26,74% de freqüència) i *PIK3R1* (4,81% de freqüència), els quals codifiquen per les dues subunitats de la proteïna PI3K (p110 δ i p85 α respectivament). La proteïna PI3K forma part de la via de senyalització PI3K/AKT/mTOR i controla molts aspectes importants del cicle cel·lular com el desenvolupament, diferenciació i funció de les cèl·lules immunitàries.[63] Variants genètiques GOF a *PIK3CD* i LOF a *PIK3R1* (amb herència AD) causen la síndrome p110 δ activat (APDS) de tipus 1 (APDS1) i APDS2 respectivament amb manifestacions clíniques com infeccions bacterianes greus, virèmia EBV \pm CMV, limfadenopatia/esplenomegàlia, autoimmunitat, limfoproliferació i limfoma.[64]

La resta de gens descrits com a causes de formes monogèniques d'IDCV menys freqüents poden veure's a la **Figura 3**.

En els casos amb resultats genètics no concloents però amb clínica compatible amb IDCV cal pensar en altres models genètics com la possible aparició de variants somàtiques, la inactivació esbiaixada del cromosoma X en el cas de les dones i la possible acumulació de variants patogèniques (en aquest cas assumint models del tipus digènic, oligogènic o poligènic). [65]

2.6. Epigenètica de la IDCV

L'epigenètica és l'estudi dels mecanismes que regulen l'expressió dels gens sense una modificació a la seqüència de l'ADN i estableix la relació entre les influències genètiques i ambientals que determinen un fenotip. La penetrància incompleta i l'ampli ventall de fenotips de la IDCV suggereixen la participació de mecanismes patogènics addicionals com l'epigenètica.

Les alteracions epigenètiques s'han relacionat amb la IDCV, com és el cas del treball de Rodríguez-Cortez *et al.* (any 2015) on comparen la metilació de l'ADN d'un parell de bessons monozigòtics discordants per a la IDCV i demostren un guany de metilació de l'ADN a les cèl·lules B del germà amb IDCV respecte de les del germà sa, en gens crítics de cèl·lules B com *PIK3CD*, *BCL2L1*, *RPS6KB2*, *TCF3* i *KCNN4*. L'estudi en una cohort de pacients amb IDCV mostra una capacitat disminuïda per desmetilar i regular els gens necessaris per a la transició de cèl·lules B naïve a cèl·lules B de memòria. [66]

Uns anys després, al 2019, investigadors del mateix grup van estudiar el metiloma de l'ADN complet en diferents etapes de la diferenciació de les cèl·lules B de pacients amb IDCV i de donants sans on van poder demostrar que (i) els gens clau de les cèl·lules B mostren una desmetilació defectuosa en llocs CpG seleccionats en la transició de cèl·lules B naïve a cèl·lules B de memòria a la IDCV, cosa que podria contribuir als defectes de les cèl·lules B madures i que (ii) el deteriorament de la desmetilació s'associa amb la reducció de les cèl·lules B de memòria als pacients amb

IDCV. Aquests resultats reforcen la hipòtesi d'una desmetilació alterada durant la diferenciació de les cèl·lules B com a mecanisme patogènic que contribueix al deteriorament de la funció i maduració de les cèl·lules B a la IDCV. [67]

Recentment, Rodríguez-Ubreva *et al.* han publicat l'“Atlas unicel·lular d'IDCV”, un treball on generen un cens epigenòmic i transcryptòmic unicel·lular de la diferenciació de cèl·lules B naïve a cèl·lules de memòria en una parella de bessons monozigòtics discordants per IDCV. L'anàlisi identifica defectes en la metilació de l'ADN, en l'accessibilitat de la cromatina i defectes transcripcionals a les cèl·lules B de memòria que reflecteixen la comunicació defectuosa cèl·lula-cèl·lula després de l'activació en pacients amb IDCV. Aquestes troballes proporcionen un mapa multiòmic complet d'alteracions en la maduració de les cèl·lules B en IDCV. L'atles, disponible públicament, ofereix informació sobre el diagnòstic i els tractaments futurs dels pacients amb IDCV. [68]

2.7. Tractament de la IDCV

Cal tenir sempre en ment les mesures preventives pels pacients amb IDCV i insistir en l'ús d'unes bones mesures higièniques com són una correcta higiene oral i dental i de rentat de mans per poder prevenir infeccions. Des d'un punt de vista clínic, també és necessari el monitoratge del creixement i l'estat nutricional del pacient, ja que pot comprometre l'estat immunitari.

2.7.1. Profilaxi antiinfecciosa

En general es creu que l'ús d'antibiòtics profilàctics només és necessari en el cas de pacients que, tot i el tractament mensual o setmanal amb immunoglobulines inespecífiques, no aconsegueixen controlar les seves infeccions. En aquest cas, s'haurà d'administrar la pauta de tractament establerta pel centre de salut on és seguit. No obstant, un treball recent de Milito *et al.* demostra que l'administració de dosis baixes d'azitromicina com a profilaxi en pacients adults amb deficiències primàries

d'anticossos aconseguix reduir els episodis d'exacerbació per pacient/any, amb la consegüent reducció de cursos addicionals d'antibiòtics així com també el risc d'hospitalització especialment en pacients amb important afectació pulmonar prèvia. [20]

2.7.2. Tractament substitutiu amb gammaglobulines

L'objectiu de l'administració periòdica de gammaglobulines és disminuir la incidència d'infeccions respiratòries i de vies altes i baixes com l'otitis, la sinusitis o la pneumònia, de sèpsia i meningitis i d'altres infeccions bacterianes invasives així com minimitzar l'ús d'antibiòtics i les visites a l'hospital.

Hi ha dues vies d'administració de les gammaglobulines; la via endovenosa (GGEV) requereix que el pacient es desplaci a l'hospital cada 3-4 setmanes –excepte en països amb un sistema d'administració endovenosa domiciliària-, mentre que la subcutània (GGSC) permet el tractament des de casa setmanalment o cada 3-4 setmanes si s'associa l'administració de hialuronidasa.

La dosi d'IgG requerida per a cada pacient cal que sigui individualitzada tot i que la majoria de les directrius nacionals i internacionals suggereixen una dosi inicial de 0,4 a 0,6 g/kg/mes amb l'objectiu d'assolir uns valors vall d'IgG superiors a 800 mg/dL. Si hi ha bronquièctasis existents, hi ha evidències que recomanen utilitzar 0,6 g/kg/mes ja que l'objectiu d'IgG pot ser superior i arribar als 1000 mg/dL. Alguns professionals també recomanen dosis més altes (0,6-0,8 g/kg/mes) per a pacients amb enteropatia o esplenomegàlia.[35] Al final, la dosi ideal és la que manté al pacient lliure d'infeccions. És imprescindible avaluar els valors d'IgG cada 6-12 mesos per si és necessari ajustar la dosi en funció del pes del pacient, la presència d'infeccions o d'altres processos inflamatoris.

2.7.3. Tractaments immunomoduladors

La identificació dels gens causants de la IDCV no només té interès acadèmic, sinó que té una creixent transcendència clínica ja que pot permetre un tractament específic i individualitzat que millori el pronòstic del malalt. La irrupció de noves molècules específiques o la recuperació d'altres molècules emprades en el camp de l'oncologia o la reumatologia han demostrat excel·lents resultats clínics no assolibles pels tractaments de suport habitualment emprats a la IDCV.

El coneixement de la base genètica i la fisiopatologia molecular permeten una teràpia dirigida mitjançant l'ús de moduladors immunològics i biològics de molècules petites. Per tant, conèixer el defecte molecular permetrà dur a terme l'ofertament de tractaments efectius ja sigui mitjançant nous medicaments o mitjançant reposicionament de fàrmacs coneguts.[69] Cal recordar que en el camp de les malalties immunomediades hi ha una gran quantitat de fàrmacs que inclouen molècules d'origen biològic (anticossos monoclonals, citocines, molècules quimèriques), inhibidors de quinases i lligands de TLRs. Atès el caràcter de "malalties orfes" de la majoria dels IEI, aquests tractaments poden arribar al pacient (i al mercat) ràpidament. Exemples concrets serien l'aplicació de *sirolimus* o *seletalisib* en els defectes de *PIK3CD* o *PIK3R1* o d'*abatacept* en els defectes de *LRBA* o *CTLA4*. [24,70]

L'*abatacept* va ser aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) per primera vegada l'any 2005 i és un fàrmac biològic que inicialment va ser dissenyat pel tractament de l'artritis reumatoide. És una proteïna composta per un domini extracel·lular de CTLA4 i la fracció Fc d'IgG1 humana. El domini extracel·lular de CTLA4 s'uneix amb el CD80/CD86 de la cèl·lula presentadora d'antigen inhibint, així, la coestimulació de les cèl·lules T. [71]

El *sirolimus* és una lactona extreta de la bactèria *Streptomyces hygroscopicus* amb propietats antifúngiques, la qual va ser aprovada per la FDA per primera vegada l'any 1999 com a profilaxi del rebuig d'òrgans en pacients que rebien trasplantament renal, gràcies a les seves potents propietats immunosupressores. El seu paper inhibidor de la

quinasa mTOR (una quinasa crítica per a la progressió del cicle cel·lular) l'ha fet un candidat perfecte per ser utilitzat pel tractament de malignitats. [72,73]

2.7.4. Tractament curatiu

Hi ha certes formes clíniques d'IDCV (les més greus) que es poden beneficiar d'un trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (TPH) pel qual és desitjable tenir un diagnòstic genètic abans del procediment. En un estudi multicèntric publicat al 2015 [74], es va demostrar que el TPH en pacients amb IDCV era beneficiós en la majoria de pacients supervivents. No obstant, hi va haver una elevada mortalitat, demostrant que aquest enfocament terapèutic només s'ha de considerar en pacients acuradament seleccionats en els quals hi hagi hagut una àmplia caracterització del defecte immunològic i/o genètic subjacent al diagnòstic d'IDCV.

Actualment no hi ha dades en humans en relació a la teràpia gènica en les diferents entitats monogèniques causants d'IDCV.



HIPÒTESIS I
OBJECTIUS

VI. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

1. HIPÒTESIS

1. L'ús de la seqüenciació genètica massiva permet identificar una subcohort de pacients amb un defecte monogènic que ofereix la possibilitat d'aplicar un tractament específic que millori el pronòstic del pacient així com un assessorament genètic i pre-concepcional a pacient i familiars respecte al tractament de suport habitual ofert a les formes poligèniques/no filiaades d'IDCV.

2. L'avaluació dels paràmetres demogràfics, clínics i immunològics permet definir un subgrup de pacients amb IDCV en els que prioritzar la realització de l'estudi genètic.

2. OBJECTIUS

1.1. Objectius principals

- Determinar el percentatge de formes monogèniques i els gens causals a la nostra cohort de pacients amb diagnòstic d'IDCV.
- Determinar el fenotip clínic i immunitari dels pacients amb més probabilitat de tenir un defecte monogènic que indiqui la necessitat de dur a terme un estudi genètic a nivell assistencial.

1.2. Objectius secundaris

- Validar la utilització de la determinació de les cadenes lleugeres lliures en sèrum com a potencial biomarcador pel diagnòstic d'IDCV.
- Caracteritzar molecularment i funcional les noves variants genètiques identificades en l'estudi.
- Estudiar els casos familiars segons el patró d'herència per detectar casos secundaris i oferir consell genètic.
- Identificar els pacients amb variants genètiques monogèniques susceptibles de rebre una teràpia dirigida que pugui millorar el seu pronòstic.



**PACIENTS I
MÈTODES**

VII. PACIENTS I MÈTODES

1. POBLACIÓ A ESTUDI

Tots els pacients pediàtrics i adults que compleixen criteris diagnòstics d'IDCV (criteris d'ICON 2015 [35]) amb tractament substitutiu amb gammaglobulina inespecífica a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (n=148) i 10 pacients de la cohort d'IDCV de l'Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona, Catalunya) amb manifestacions autoimmunitaries/inflamatòries o joves en edat reproductiva.

2. TIPUS D'ESTUDI

Estudi transversal, bicèntric (Hospital Universitari Vall d'Hebron i Hospital Universitari de Bellvitge), intervencionista.

3. SELECCIÓ DE PACIENTS

S'identifiquen els pacients amb diagnòstic d'IDCV segons el facultatiu responsable a partir de la cohort de pacients en tractament substitutiu amb gammaglobulina inespecífica.

La doctoranda verifica el diagnòstic d'IDCV amb la revisió dels facultatius responsables segons els criteris diagnòstics de l'ICON de 2015 de cara a realitzar l'estudi genètic mitjançant tècniques de seqüenciació massiva i l'estudi de marcadors immunològics que permetin definir un perfil clínic i genètic concret per poder fer una correlació posterior amb les troballes genètiques.

S'apliquen els valors de referència propis del grup publicats prèviament per valorar els valors d'immunoglobulines dels pacients inclosos a la cohort d'estudi. El treball, va ser realitzat mitjançant una cohort de 160 subjectes sans de 0 a 18 anys. [11]

3.1. Criteris d'inclusió

Els criteris d'inclusió que s'han tingut en compte en aquest treball han estat els següents:

- Pacients amb diagnòstic d'IDCV confirmada, seguint els criteris d'ICON 2015.[35]
- Mostra d'ADN disponible per l'estudi genètic.
- Consentiment informat signat pel pacient o els/les responsables legals per a la realització de l'estudi genètic.

3.2. Criteris d'exclusió

Els pacients que han estat exclosos de l'estudi han estat tots aquells que no han complert els criteris d'inclusió i aquells que presenten una deficiència de limfòcits T greu, descrita com a: $CD4^+/\mu L$; 2-6 anys <300 , 6-12 anys <250 , >12 anys <200 , % de limfòcits $CD4^+$ naïve: 2-6 anys $<25\%$, 6-16 anys $<20\%$, >16 anys $<10\%$ i proliferació de limfòcits T absent (criteris de l'ESID Registry que són utilitzats regularment).

4. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Mitjançant una única extracció de sang del pacient, s'obté:

- 1 tub amb 4 mL de sang amb EDTA per a la obtenció d'ADN.
- 1 tub SST (de l'anglès *Serum-separating tubes*) amb 4 mL de sang per a l'obtenció del sèrum.
- 1 tub amb 8 mL de sang amb heparina sòdica per a la obtenció de PBMC per gradient de densitat i posterior criopreservació.

Aquestes mostres biològiques han estat emmagatzemades i gestionades pel Biobanc de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (PT17/0015/0047), integrat a la Xarxa Nacional de Biobancs Espanyola, i es van processar seguint els procediments operatius normalitzats amb l'aprovació adequada de la normativa Ètica i Comitès Científics.

El Biobanc HUVH va ser autoritzat amb data 2 d'abril de 2013 per la Direcció General de Planificació i Recerca en Salut del Departament de Sanitat de la Generalitat de Catalunya d'acord amb el Reial Decret 1716/2011, de 18 de novembre, per el qual s'estableixen els requisits bàsics d'autorització i funcionament dels biobancs amb finalitats de recerca biomèdica i del tractament de les mostres biològiques d'origen humà, i es regula el seu funcionament i organització del Registre Nacional de Biobancs per a la recerca biomèdica (nº registre B.0000618).

En alguns casos, s'ha requerit d'una extracció posterior per a la realització de les proves funcionals i/o moleculars de confirmació de patogenicitat de les variants genètiques identificades.


5. VARIABLES A ESTUDI

5.1. Variables demogràfiques

Es recullen les variables demogràfiques d'edat, gènere, ètnia, consanguinitat i antecedents familiars d'IEI al quadern electrònic de treball.

5.2. Manifestacions clíniques

Les següents manifestacions clíniques han estat recollides al quadern electrònic de treball a partir de la història clínica del pacient registrada al programa informàtic



PACIENTS I MÈTODES

SAP© (NetWeaver 7.0 SPS37, Califòrnia, EUA): edat de debut de símptomes d'IEI, infeccions bacterianes recurrents de l'aparell respiratori, limfoproliferació (esplenomegàlia, limfadenopaties), autoimmunitat (fenòmens clínics autoimmunitaris, citopènies autoimmunitàries), afectació pulmonar (bronquièctasis, afectació respiratòria funcional), afectació gastrointestinal (infeccions bacterianes i parasitàries del tracte gastrointestinal, malaltia gastrointestinal), neoplàsies (limfoma, altres càncers). A més, les manifestacions clíniques han estat reclassificades en tres subgrups dins de la categoria "Infecció" en: sense infeccions (0), només infeccions (1) i infeccions amb altres manifestacions clíniques (2).

5.3. Paràmetres analítics

A part dels paràmetres analítics recollits com a necessaris per a la confirmació diagnòstica segons ICON-2015 [35], s'han recollit les poblacions limfocitàries TBNK rutinàries, les poblacions limfocitàries avançades i els valors de cadenes lleugeres lliures en sèrum. A més, s'han exclòs les altres possibles causes d'hipogammaglobulinèmia en cada pacient amb el protocol propi del centre.

5.3.1. Poblacions limfocitàries

A partir de sang total amb EDTA dels pacients de la cohort, s'estudien les poblacions limfocitàries de manera rutinària on es recullen valors de CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD56⁺CD16⁺ (percentatge i valors absoluts) mitjançant el citometre de flux Navios EX (Beckman Coulter, Califòrnia, EUA).

L'estudi de marcadors immunològics orientats a la definició d'un perfil immunològic concret s'ha dut a terme al Servei d'Immunologia de l'HUVH. A partir de sang total procedent de tub d'EDTA es tenyeixen 50 µL de sang amb els anticossos monoclonals CD19-PerCP-Cy5.5 i CD27-PE-Cy7 (Tonbo Biosciences, San Diego, EUA), CD21-Pacific Blue (Immunostep, Salamanca, Espanya), IgM-APC-Cy7

PACIENTS I MÈTODES

(BioLegend, SanDiego, EUA), IgD-FITC, CD24-PE i CD38-APC (Becton Dickinson, New Jersey, EUA), per identificar les diferents subpoblacions de limfòcits B.

Pel que fa a la estratègia de selecció de poblacions (*gating*), ens basem en el treball de Maecker *et al.* [75] per tal de determinar el percentatge limfòcits B immadurs ($CD19^+IgD^+CD27^-$), de transició ($CD19^+IgD^+CD27^-CD38^{high}CD24^{high}$), de canvi d'isotip ($CD19^+IgD^-CD27^+$), plasmablasts ($CD19^+IgD^-CD27^+CD38^+CD24^+$) i $CD21^{low}$ ($CD19^+CD27^+CD21^{low}$) en sang perifèrica tal i com mostra la **Figura 4**.

En el cas on els valors de limfòcits B obtinguts a partir de les poblacions limfocitàries TBNK de rutina han estat baixos (de 0,01 a 0,05 x 10E⁹/L) es procedeix a fer la tinció a partir de PBMCs aïllades mitjançant gradient de densitat.

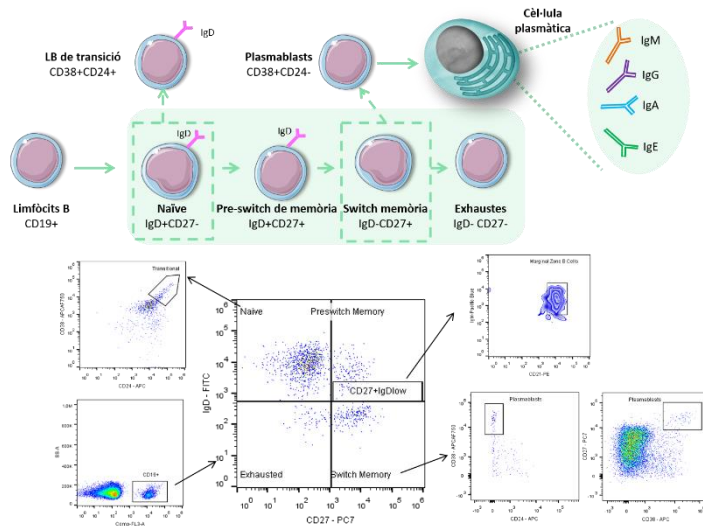


Figura 4. Panell de citometria per a la identificació de les subpoblacions de limfòcits B. Imatge creada amb BioRender (<https://app.biorender.com/>)

Un cop obtinguts els resultats procedents de la citometria de flux, els pacients s'han classificat segons la classificació "EUROclass", proposada per Wehr *et al.* [50] en funció dels valors de; limfòcits B ($\leq 1\%$ B- / $> 1\%$ B+), cèl·lules $CD19^+$ canvi d'isotip ($>2\%$ smB+/ $\leq 2\%$ smB-), cèl·lules $CD19^+$ de transició ($<9\%$ Tr^{norm}/ $\geq 9\%$ Tr^{hi}) i les cèl·lules $CD19^+ CD21^{low}$ ($\geq 10\%$ 21^{lo}/ $< 10\%$ 21^{norm}).

5.3.2. Cadenes lleugeres lliures en sèrum

A partir de sèrum dels pacients de la cohort emmagatzemats a -80°C al Biobanc de l'HUVH es realitza la quantificació de les cadenes lleugeres lliures en sèrum (sFLC) κ i λ utilitzant el kit “*Freelite MxTM Lambda Free Kit*” seguint les instruccions del fabricant mitjançant el turbidímetre *Optilite* de Binding Site (Birmingham, Regne Unit). S'utilitzen els valors de referència proporcionats per la casa comercial (**Taula 3**).

Taula 3. Valors de referència de les cadenes lleugeres lliures en sèrum per a mostres de sèrum de subjectes adults (Binding Site).

	Mediana (mg/L)	Mitjana (mg/L)	Rang Percentil 95 (mg/L)
Free Kappa	8,36	7,30	3,30-19,40
Free Lambda	13,43	12,40	5,71-26,30
	Mediana	Mitjana	Rang total
Kappa/Lambda Ratio	0,63	0,60	0,26-1,65

5.3.3. Valors de referència propis

Per tal d'obtenir una correcta i estricta interpretació dels resultats de poblacions limfocitàries (TBNK i ampliades), valors d'immunoglobulines i subclasses d'IgG, des del propi grup de recerca hem elaborat uns valors de referència interns. Ho hem fet mitjançant donants sans, de procedència variada representativa de l'àrea de Vall d'Hebron, i utilitzant les mateixes tècniques, reactius i aparells que seran utilitzats amb els pacients posteriorment.

Aquests treballs han estat publicats durant el període de realització d'aquesta tesi doctoral: “*Age-specific pediatric reference ranges for immunoglobulins and complement proteins on the OptiliteTM automated turbidimetric analyzer.*” a la revista *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [9] i “*Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population.*” a la revista *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. [8]

6. SEQÜENCIACIÓ GENÈTICA MASSIVA (NGS)

Als pacients que compleixen els criteris diagnòstics d'IDCV se'ls realitza l'estudi genètic per seqüenciació massiva utilitzant un panell que inclou 323 gens causants d'IEI (**Taula A2**), entre els quals s'hi troben tots els gens descrits com a causants d'hipogammagobulinèmia i també altres gens implicats en el control de la maduració del limfòcit B, la col·laboració T-B al centre germinal i el manteniment de limfòcits de memòria i cèl·lules plasmàtiques.

El disseny del panell té en compte la màxima cobertura dels gens a seqüenciar i la detecció de zones no cobertes per si posteriorment s'han de completar alguns exons. Per a la realització de la llibreria d'ADN s'utilitza un mètode d'enriquiment per captura utilitzant sondes. La reacció de seqüenciació es realitza en un seqüenciador MiSeq (Illumina Inc., Califòrnia, EUA).

6.1. Protocol de NGS

6.1.1. Característiques de les perles (beads) utilitzades en el protocol d'NGS

Purificació de l'ADN amplificat: AMPure XP Reagent

Les *beads* de poliestirè-magnetita (AMPure) estan recobertes d'una capa de grups carboxil carregats negativament. La columna vertebral de l'ADN està altament carregada de grups fosfats que el fan polar, cosa que li permet dissoldre's fàcilment en aigua (la qual també és polar). Quan s'afegeix polietilè glicol (PEG) a una solució d'ADN en estat de saturació, l'ADN forma grans cues (*coils*) aleatòries. Si s'afegeix aquesta molècula hidrofílica amb la concentració adequada de sal (Na^+), això fa que l'ADN s'acumuli i es precipiti per falta de solvatació. Els ions Na^+ protegeixen els grups fosfats negatius fent que l'ADN s'uneixi a qualsevol cosa que es trobi a prop (incloses les *beads* carboxilades). (**Figura 5.1**)

Un cop l'ADN s'ha unit a les *beads*, posem l'imant per tenir el nostre ADN atrapat mentre fem rentats. Un cop es vol eluir l'ADN i tornar a posar-lo en solució, s'afegeix

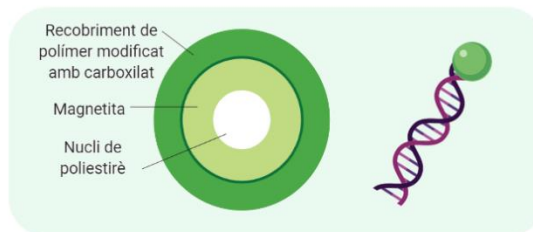
una solució aquosa (Tris o aigua) hidratant completament l'ADN i traslladant-lo d'un estat agregat a un estat soluble. Ara, les càrregues negatives de les *beads* carboxíliques repel·leixen l'ADN, permetent obtenir-lo al sobrenedant.

Aquest és un mètode comú en la preparació de llibreries de NGS. Sovint s'utilitza per substituir els passos de gels d'electroforesi a la preparació de la llibreria.

Recuperació de l'ADN capturat: *beads de captura*

L'ADN obtingut en el pas previ, s'hibrida amb grups de sondes d'oligonucleòtids biotinitilades específics per a les regions d'interès. Les sondes hibridades es capturen i es purifiquen mitjançant *beads* magnètiques d'estreptavidina. Les regions d'ADN capturades són posteriorment amplificades i seqüenciades. D'aquesta manera, obtenim biblioteques molt enriquides per a les regions d'interès. (Figura 5.2)

1. AMPure XP *Beads*



2. *Beads de captura*

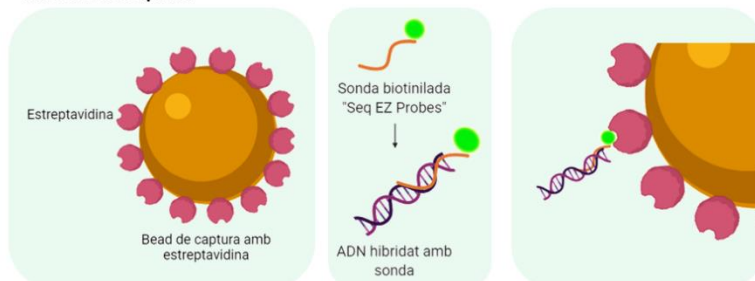


Figura 5. *Beads* utilitzades al protocol d'NGS. 1. AMPure *Beads*. 2. *Beads de captura*.

6.1.2. Preparació de la llibreria amb fragmentació enzimàtica

- Fragmentació enzimàtica amb KAPA Frag Enzyme i KAPA Frag Buffer (10X).
- Reparació dels extrems amb enzims “KAPA End Repair & A-Tailing Enzyme Mix” i “KAPA End Repair & A-Tailing Buffer”.
- Unió dels índexs (un de diferent per a cada mostra; SeqCap Library Adapter) amb KAPA DNA Ligase i KAPA Ligation Buffer.
- Doble selecció de mida: es seleccionen les bandes d’interès mitjançant la unió de *beads* magnètiques: en el primer pas, s’incuba l’ADN amb 35 µL de *beads*. A les *beads* s’hi unirà l’ADN de fragments llargs, els quals no són del nostre interès, ja que seran els que ha realitzat la fragmentació enzimàtica incorrectament. El sobrenedant contindrà els fragments desitjats. Aïllem aquest sobrenedant, i l’incubem amb *beads* una altra vegada (però a una altra ratio, amb 10 µL de *beads*). Les mides de fragments més petits no desitjats no s’uneixen a les *beads*. Finalment, l’ADN que tindrem unit a les *beads* serà aquell ADN que tingui la mida desitjada. En aquest punt procedirem a realitzar la PCR d’amplificació. (**Figura 6**)

6.1.3. Amplificació de la llibreria amb les mostres utilitzant Ligation-mediated PCR pre-captura

- Realització d’una PCR per amplificar la llibreria amb KAPA HiFi HotStart Ready Mix i Library Amplification Primer Mix.
- Es purifica la llibreria mitjançant la unió a *beads* magnètiques.
- Comprovació de la qualitat de les llibreries amplificades amb Qubit BR (concentració d’ADN) i QIAxcel (mida dels fragments d’ADN). (**Figura 6**)

6.1.4. Hibridació de la mostra

- *Pooling* de les mostres, on s'uneixen totes les mostres en un mateix tub.
- Hibridació dels oligonucleòtids amb COT Human DNA i HyperCap Universal Blocking Oligos.
- Mix d'hibridació: Hybridization Buffer i hybridization Component A.
- S'hibrida l'ADN amb les sondes biotinitades (**Figura 6**).

6.1.5. Recuperació de l'ADN capturat

- Es procedeix a rentar l'ADN amb diferents buffers de rentat.
- Preparació de les *beads* per a la recuperació (capture beads).
- Rentat de l'ADN i recuperació (**Figura 6**).

6.1.6. Amplificació de l'ADN capturat

- PCR post-captura amb KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) i Post-PCR Oligos.
- Purificació de la llibreria mitjançant rentats amb les *beads* magnètiques.
- Comprovació de la qualitat de la llibreria final amb el Qubit BR (concentració d'ADN) i el QIAxcel (mida dels fragments d'ADN) (**Figura 6**).

6.1.7. Seqüenciació amb l'aparell MiSeq d'Illumina

- Comprovació de la concentració de la mostra amb el Qubit HS.
- Desnaturalització amb HT1 Hybridation Buffer (Illumina), PhiX Control (Illumina), NaOH 1 N, (Illumina), Tris-HCl 10 mM pH 8,5 amb Tween-20 0,1%.
- Càrrega de la mostra desnaturalitzada al cartutx: MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) (**Figura 6**).

PACIENTS I MÈTODES

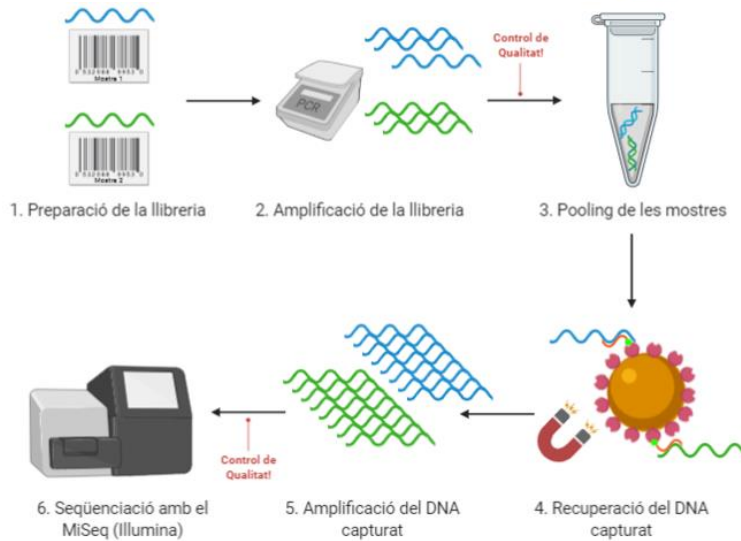


Figura 6. Protocol de seqüenciació genètica massiva.

6.2. Anàlisi de resultats

L'anàlisi inicial dels resultats del panell d'IEI aplicarà els filtres de qualitat estàndard que descarten els *reads* no vàlids. Per a avaluar la fiabilitat dels resultats també s'ha de tenir en compte el nombre de lectures obtingudes i la cobertura horitzontal de les dades obtingudes. A continuació, es realitzarà l'alineament de les dades al genoma de referència i la identificació de les variants (*variant calling*). A partir d'aquest punt, es filtraran les variants candidates seguint dos tipus de criteris: les característiques del propi gen (associació a la malaltia, tipus d'herència) i els de la variant (freqüència en la població, l'efecte a la proteïna i la conservació al llarg de l'evolució). L'objectiu és reduir al mínim el nombre de variants candidates per tal d'identificar les possibles variants patogèniques (Figura 7). Un cop tenim un nombre raonable de variants candidates, es procedeix a la interpretació dels resultats amb una estratègia multidisciplinària.

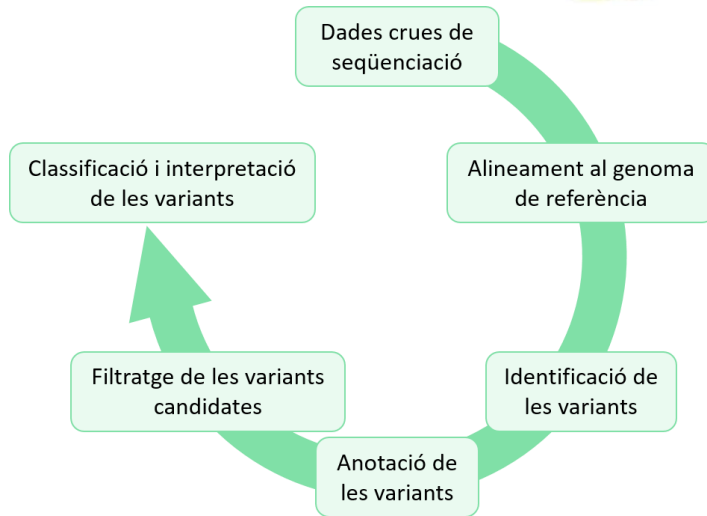


Figura 7. Flux de treball en l'anàlisi de les dades procedents de la seqüenciació gènica massiva.

Un cop analitzats els resultats del panell de gens, es realitza la confirmació de la variant mitjançant seqüenciació Sanger als pacients que han presentat alguna variant genètica amb alta sospita de causalitat. A continuació, es realitza l'estudi familiar més ampli possible i els estudis necessaris per confirmar l'efecte de la variant genètica sobre els aspectes moleculars (estructura, estabilitat, expressió, etc.) i els aspectes funcionals de les proteïnes codificades pels gens candidats.

6.3. Altres aproximacions genètiques

L'estudi genètic per excel·lència d'aquesta tesi doctoral ha estat el panell genètic NGS de 323 gens detallat prèviament. No obstant, cal tenir en compte que en alguns casos l'aproximació genètica ha estat diferent. L'algoritme de treball que s'hauria de seguir idealment pot consultar-se a la **figura 8**, on tots els pacients amb resultat negatiu del panell haurien de ser seqüenciats per WES, i tots els pacients amb resultat negatiu de WES haurien de ser seqüenciats per WGS. Per limitacions temporals i de finançament no s'ha pogut dur a terme aquesta aproximació de forma general i s'ha limitat la realització de WES i/o WGS aquells pacients amb resultat negatiu del

panell, amb un fenotip més greu i sempre per decisió del facultatiu clínic responsable. En els casos amb manifestacions sindròmiques o discapacitat intel·lectual s'ha procedit a l'estudi genètic mitjançant array-CGH, el qual és emprat per a la detecció d'alteracions de número de còpia. Per entendre quina aproximació genètica s'ha emprat i perquè, veure la **figura 8**. Cal tenir present que aquesta aproximació pot haver-se modificat en algun pacient per decisió del facultatiu responsable.

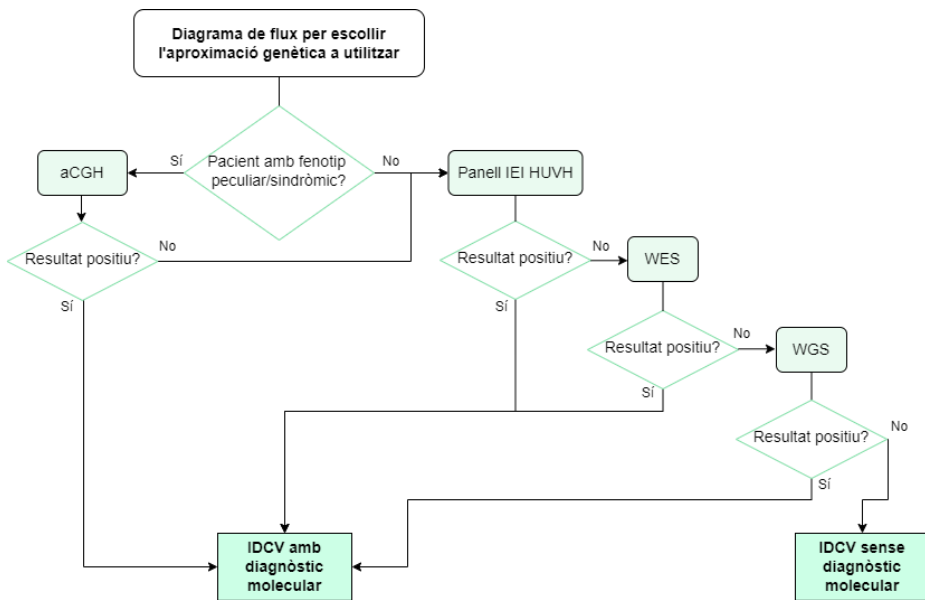


Figura 8. Diagrama de flux proposat per a la realització de l'aproximació genètica.

7. ESTUDIS MOLECULARS/FUNCIONALS PER A LA CONFIRMACIÓ DE LA PATOGENICITAT DE LES VARIANTS GENÈTIQUES

7.1. Aïllament de subpoblacions cel·lulars

S'aïllen limfòcits T i limfòcits B mitjançant selecció negativa amb *beads* (RossetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail i RossetteSep™ Human B Cell Enrichment Cocktail, StemCell Technologies, Vancouver, Canadà) amb un rendiment de 99,5% i 96,8% respectivament, verificat per citometria de flux. Pel que fa als neutròfils, s'aïllen mitjançant el procediment rutinari de separació de cèl·lules mitjançant gradient de densitat (Lymphoprep, StemCell Technologies, Vancouver, Canadà) seleccionant les cèl·lules que queden just per sobre la fracció d'eritròcits. En aquest cas, s'ha aconseguit un rendiment de 91% verificat també per citometria de flux.

7.2. Extracció i quantificació d'ADN

A partir d'un tub de sang d'EDTA que hem congelat prèviament, procedim a la extracció d'ADN per poder dur a terme els corresponents estudis moleculars. Ho fem mitjançant el Kit d'extracció QIAamp de QIAGEN (Hilden, Alemanya). Breument, els passos per a la extracció d'ADN són: (i) lisi cel·lular, (ii) unió de l'ADN a la membrana de la columna, (iii) rentats per la eliminació de molècules contaminants i (iv) elució de l'ADN en aigua.

Un cop tenim l'ADN, el quantifiquem mitjançant l'espectrofotòmetre "Colibrí" de Titerek-Berthold (Bad Wildbad, Alemanya) llegint l'absorbància a 260/280 (puresa ADN respecte a les proteïnes, 1.8-2) i a 260/230 (puresa ADN respecte a sals/impureses, 2-2.5) obtenint una concentració en ng/μL de cada mostra.

7.3. Extracció i purificació d'ARN

En els casos que vulguem treballar a partir d'ARN, és necessària la obtenció d'un tub de sang Tempus™ (ThermoFischer Scientific) el qual conté un reactiu estabilitzador d'ARN i permet, al mateix temps, la lisi de les cèl·lules. L'ARN és menys estable que l'ADN essent fàcilment destruït per l'enzim ribonucleasa (RNasa). Mitjançant el “Kit d'aïllament d'ARN per centrifugació Tempus™” (ThermoFischer Scientific) procedim a extreure i purificar l'ARN.

Si la mostra per a l'extracció d'ARN són pellets cel·lulars, s'ha utilitzat el kit “RNeasy Plus Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanya). Breument, els passos per a la extracció d'ARN són: Lisi cel·lular, eliminació de l'ADN genòmic, rentats per la eliminació dels contaminants i elució de l'ARN en aigua.

7.4. Retrotranscripció i obtenció de l'ADNc

Un cop hem obtingut l'ARN d'interès (de cadena simple), quantifiquem la concentració mitjançant l'espectrofotòmetre “Colibri” de la manera explicada anteriorment.

Mitjançant una retrotranscripció o transcripció inversa amb el kit First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Ref: 11483188001, Roche), generem l'ADNc o ADN complementari. El procés consisteix en una primera part de desnaturalització i una segona part de retrotranscripció mitjançant l'enzim transcriptasa inversa o retrotranscriptasa.

7.5. PCR d'amplificació

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet obtenir moltes còpies d'ADN a partir d'una quantitat mínima i és el pas previ a la PCR de seqüenciació directa, o seqüenciació Sanger. A la mostra d'ADN se li afegeixen desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs), magnesi, encebadors, aigua, buffer d'amplificació i l'enzim polimerasa d'ADN; Taq polimerasa. Els encebadors utilitzats en aquest pas són *forward* i *reverse* per tal de generar ADN de doble cadena d'una regió concreta.

El procés de la PCR consisteix en una sèrie de cicles en els que la temperatura va canviant per optimitzar les diferents fases de l'amplificació: inicialització, desnaturalització, hibridació dels encebadors, elongació, elongació final i conservació.

7.6. Comprovació d'amplificació i purificació

El producte resultant de la PCR d'amplificació es fa córrer en un gel d'agarosa mitjançant electroforesi. El gel és un polímer entrellaçat que formarà un sòlid de base porosa amb aspecte semblant a la gelatina que permetrà el pas dels components. En el cas de voler separar seqüències d'àcids nucleics de mida entre 200 i 1000 parells de bases, el gel conté un 2% d'agarosa (Biotools, Madrid, Espanya) dissolta en TBE 1X (Fisher BioReagents, Madrid, Espanya). Escalfem la mescla fins a l'ebullició per a obtenir una solució homogènia i transparent. Posteriorment s'afegeixen 2 µL de Midori Green (Düren, Alemanya) i esperem 30 minuts fins que solidifiqui amb la pintura posada per crear els forats dels pous on carregarem la mostra.

Procedim a carregar les nostres mostres ja amplificades, amb Flexi Buff 5X (Promega, Wisconsin, EUA, dilució 1:2) dins dels diferents carrils per a comprovar que la PCR d'amplificació ha funcionat correctament i que el nostre ADN s'ha amplificat amb la presència de bandes en el gel. Les mostres, corren per l'aplicació d'un corrent elèctric de 100 volts durant 30 minuts, fent que les seqüències d'àcids

nucleics es separin en funció de la mida (nombre de parells de bases). En un dels carrils, s'afegeix el marcador de pes molecular "FastGene 100 bp Marker" (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Alemanya).

Després de l'electroforesi, s'aplica el mètode de detecció per luminescència en exposició a llum ultraviolada mitjançant l'aparell Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad, Hercules, California). Un cop confirmem que al gel es poden detectar els amplímers, la mescla amplificada mitjançant PCR ha de ser purificada amb l'objectiu d'eliminar subproductes del producte amplificat. Purifiquem amb exoSAP (California, EUA), que conté Exonuclease I, que elimina els encebadors, i Shrimp Alkaline Phosphatase, que elimina els dNTPs sobrants.

7.7. PCR de seqüenciació directa (mètode Sanger)

La PCR de seqüenciació directa (o mètode Sanger) consisteix en conèixer la seqüència concreta de nucleòtids d'una seqüència d'ADN. La tècnica es basa en l'addició de diferents nucleòtids gràcies a la Taq polimerasa.

L'encebador utilitzat en aquest cas només és un de sol (*Forward* o *Reverse*) per la generació de cadenes úniques. Partint de la mescla Big Dye Terminator (Applied Biosystems™, Massachusetts, Estats Units), tampó de seqüenciació, aigua destil·lada, mostra d'ADN i encebadors de seqüenciació, es realitza una PCR de 25 cicles a una temperatura d'hibridació de 50 °C, suficientment baixa perquè els oligonucleòtids es puguin unir a la seva seqüència complementària. Els terminadors BigDye estan etiquetats amb els colorants acceptors de dRhodamine de la **taula 4**.

Taula 4. Relació de nucleòtid i etiqueta de colorant.

Nucleòtid Terminador	Colorant fluorescent
A	R6G
C	ROX
G	R110
T	TAMRA

El BigDye conté un conjunt de colorants units específicament a cadascun dels 4 nucleòtids (**Taula 4**), els quals contenen un colorant donant de fluoresceïna que absorbirà l'energia d'excitació del làser del seqüenciador, enllaçat a un dels quatre colorants acceptors de diclorodamina. Cada nucleòtid queda marcat fluorescentment de manera que cadascun d'ells implica un color de fluoròfor diferent. Els nucleòtids marcats fluorescentment també són terminadors, és dir que quan són incorporats per la ADN polimerasa finalitzen inevitablement l'amplificació d'aquell fragment. A part dels terminadors marcats, el BigDye també inclou nucleòtids no marcats, AmpliTaq ADN polimerasa, FS (Taq-FS, membre de la família Taq F667Y), pirofosfatasa rTth, clorur de magnesi i tampó. Mitjançant una electroforesis capil·lar, els pics de fluorescència de cada dNTP seran detectats per un detector que transformarà aquestes senyals lumíniques en un electroferograma que ens donarà la informació de la seqüència de la nostra mostra d'ADN.

Posteriorment a la PCR de seqüenciació, es purifica l'ADN per eliminar les sals i els terminadors BigDye® no incorporats mitjançant el kit de purificació XTerminator® BigDye (Applied Biosystems™, Massachusetts, Estats Units). Finalment, la mostra és seqüenciada a l'aparell 3500 Genetic Analyzer for Fragment Analysis (#A30468, Applied Biosystems™, Thermofisher Scientific, Massachusetts, Estats Units).

Les aplicacions d'aquesta tècnica en aquesta tesi són la confirmació de variants genètiques trobades al panell genètic per NGS, estudis genètics familiars i la seqüenciació en determinats llinatges cel·lulars en el cas de les variants somàtiques.

7.8. PCR quantitativa (qPCR): expressió gènica

La qPCR (PCR quantitativa, també anomenada PCR a temps real) és una tècnica que hem utilitzat per avaluar l'expressió gènica de forma relativa. El seu principi es basa en amplificar per PCR fragments d'ADN utilitzant algun sistema de monitorització de l'amplificació (en el nostre cas sondes fluorescents) que ens permeti posteriorment realitzar la quantificació.



PACIENTS I MÈTODES

Partint de la mescla TaqMan Universal Master Mix II no UNG, aigua, sonda marcada amb FAM i ADNc es realitza una qPCR de 45 cicles. A part del nostre gen diana, també incorporem un gen de referència o *housekeeping* com pot ser el gen *ACTB* o *GAPDH*. El gen de referència presenta una expressió constant en totes les mostres, sense veure's significativament modificada per les condicions d'estudi o per l'efecte d'un tractament. La qPCR es realitza mitjançant el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, Estats Units).

El resultat obtingut del nostre gen diana es normalitza calculant la expressió relativa amb el gen de referència emprat, utilitzant la següent fórmula: $2^{-\Delta CT}$ on $\Delta CT = CT$ del gen diana – CT del gen de referència.[76]

7.9. Tinció intracel·lular d'LRBA

A partir de 50 μ L de sang total, es procedeix a la tinció intracel·lular d'LRBA seguint el protocol que recomana la casa comercial del kit PerFix-nc (Beckman Coulter, Califòrnia, Estats Units). Breument, el protocol consisteix en fixar les cèl·lules i lisar els hematies, permeabilitzar els leucòcits, incubar amb anticossos superficials i intracel·lulars (conjugats amb un fluorocrom) i un rentat final per eliminar anticossos no units i restes cel·lulars apoptòtiques. Les cèl·lules són tenyides amb l'anticòs primari intracel·lular anti-LRBA (Sigma-Aldrich, Missouri, Estats Units) i l'anticòs secundari Goat Anti-Rabbit IgG H&L – Alexa Fluor 488 (Abcam, Cambridge, Regne Unit). Les mostres són adquirides mitjançant el citometre Navios EX (Beckman Coulter, Califòrnia, Estats Units) durant les següents 24 hores després de l'extracció.

7.10. Estudi de la via NF κ B mitjançant *western blot*

Per a l'anàlisi de les proteïnes involucrades a la via NF κ B (p-P105, P105/p50 i I κ B α), es llisten 2×10^6 de PBMC del pacient i del donant sa, les quals han estat prèviament estimulades a 0, 15, 30 i 60 minuts a 37°C amb PMA [0,1 μ g/mL] + ionomicina [2 μ g/mL].



PACIENTS I MÈTODES

Es quantifiquen les proteïnes de les mostres seguint les instruccions de fàbrica del kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, Estats Units) i ajustem les concentracions de manera que es carreguen 31 µg de proteïna de totes les mostres per igual al gel d'electroforesi.

Les mostres es corren en un gel de Tris-Glycine (#5671094, 4-20% Criterion™ TGX™, Bio-Rad) segons el protocol estàndard i es transfereixen a una membrana PVDF de 0,2 µm (#1704157, Trans-Blot Turbo Mini, Bio-Rad). Seguidament, les membranes es bloquegen amb TBS-T 1X + 5% llet durant 1h 30min a temperatura ambient i en agitació.

Per a la detecció de les proteïnes d'interès, s'incuba la membrana a 4°C en agitació *overnight* amb una dilució 1:1000 dels següents anticossos: anti-p-NFκB p105 (Ser933) (4806S, rabbit, Cell Signaling), anti-IκBα (IκB-alpha) (9242S, rabbit, Cell Signaling) i anti-NFκB p105/p50 (3035S, rabbit, Cell Signaling). Posteriorment, s'incuba 1h en agitació i temperatura ambient amb l'anticòs secundari anti-rabbit HRP (7074S, Cell Signaling) a una dilució 1:6000. Pel control de càrrega, la membrana s'incuba amb l'anticòs de control de càrrega anti-β-actina (MA5-15739, Invitrogen, mouse) i amb l'anticòs secundari HRP anti-mouse (G21040, Thermofisher).

La membrana, és revelada amb el substrat quimioluminiscent SuperSignal® West Pico (Thermo Scientific, Massachusetts, Estats Units) que detecta la peroxidasa de rave picant (HRP de l'anglès *horseradish peroxidase*) en immunoblots. La emissió de senyal extremadament intensa d'aquest substrat permet la detecció de quantitats de picograms d'antigen mitjançant el lector Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA).

Les bandes de proteïna d'interès obtingudes s'han quantificat amb l'objectiu de reflectir les quantitats relatives com a proporció de cada banda de proteïnes en relació amb el control de càrrega del carril. La quantificació s'ha dut a terme mitjançant el software "ImageJ" de Wayne Rasband de l'Institut Nacional de Salut (EUA) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

7.11. Anàlisi de citocines en sobrenedant mitjançant immunoassaig microfluídic

Per a l'anàlisi dels valors de citocines en sobrenedant en el context d'estudi de la via NFκB, s'estimulen 300.000 PBMCs amb PMA [0,05 µg/mL] + ionomicina [1 µg/mL] a 0 i a 72h a 37°C. Passat aquest temps, es recull el contingut dels pous d'una placa de 24 pous i es centrifuga a 1500 rpm durant 5 minuts a 4°C. El sobrenedant obtingut es congela a -20°C fins a la determinació de les citocines.

Els valors circulants de Fas lligand (sFAS-L), IL-10, IL-2 α , IL-6, IFN γ , IL-12p70, IL-1 β i TNF- α es mesuren mitjançant un assaig d'immunofluorescència basat en microfluídica, seguint les instruccions del fabricant. Breument, 40 µL de sobrenedant es dilueixen 1:5 amb el diluent de mostra del kit (Simple Plex Cartridge Kit for 16 samples, containing Fas ligand, IL-10, IL-2ra/CD25, IL-6, Bio-technie. #SPCKA-PS-006875) i s'introdueix dins del cartutx de microfluídica, el qual conté tots els anticossos de detecció. Mitjançant l'aparell ELLA (Protein Simple, Califòrnia, EUA) el qual conté un sistema de vàlvules de pressió, es realitza simultàniament un immunoassaig de tipus sandvitx per a cada citocina a cada nanoreactor de vidre. S'obtenen els resultats per triplicat per a cadascuna de les citocines per a cada mostra. A cada determinació, s'utilitza un control per al valor màxim i mínim per a confirmar la corba de calibratge.

7.12. Estudis genètics familiars

Es realitzen estudis genètics familiars d'aquells pacients amb variant genètica causal identificada mitjançant PCR de seqüenciació (mètode Sanger) amb ADN extret a partir de sang total en EDTA. Es realitza a tots els parents de primer grau del pacient índex, és a dir, pares, germans i fills.

8. ANÀLISI ESTADÍSTICA

S'han obtingut taules resum per a totes les variables d'interès estudiades en funció de la variable resposta seguint el procediment detallat a continuació:

- Variables qualitatives: taula de freqüències amb les freqüències absolutes i relatives per a cadascun dels grups i globalment.
- Variables quantitatives: taula amb els estadístics de resum: N, mitjana, mediana, desviació estàndard, i valors mínim i màxim; per a cada grup i globalment.

8.1. Anàlisi bivariada

La variable “variant genètica” s’ha analitzat envers a la resta de variables demogràfiques, variables clíniques i variables analítiques aplicant la prova Khi-quadrat, la prova exacte de Fisher (per les variables qualitatives) o el T-test i prova Mann-Whitney (per les variables quantitatives) tal i com es mostra a continuació. Les decisions estadístiques s’han realitzat prenent com a nivell de significació el valor 0,05.

- Variables quantitatives: en primer lloc s’han analitzat les condicions d’aplicació de les diferents proves (proves de normalitat de Shapiro-Wilk i proves d’homogeneïtat de variàncies de Levene). S’ha aplicat el model lineal o no paramètric adequat en funció del compliment dels criteris d’aplicació (t-test o prova de Mann-Whitney).
- Variables qualitatives: s’ha utilitzat la prova d’homogeneïtat de distribucions discretes adequada (prova Khi-Quadrat, Raó de Versemblança o Exacte de Fisher) en funció del criteri de Cochran.

8.2. Modelització

Les variables amb major rellevància clínica i que mostraven evidències estadístiques s’han incorporat en un model de regressió logística multivariant. També s’han avaluat

interaccions entre variables. S'han obtingut les oportunitats relatives (*odds ratio*) amb els intervals de confiança del 95%. S'han representat gràficament mitjançant corbes ROC i s'ha obtingut el valor de AUC, sensibilitat i especificitat.

Es realitzen tots els estudis estadístics de modelització de regressió logística multivariants, realitzant dos estudis: per a totes les variants genètiques trobades i per a només les variants que es consideren causals. Es realitzen models sense interaccions i models amb interaccions.

8.3. Proporcions i intervals de confiança

Es calculen les proporcions amb els intervals de confiança del 95% en les variables: resposta vacunal, limfòcits B canvi d'isotip de memòria (smB), cadenes lleugeres (fenotip) i cadenes lleugeres (suma).

8.4. Mesures d'associació

L'índex kappa de Cohen és una mesura de la concordança entre els dos avaluadors i es mesura com la raó entre les concordances observades i esperables a l'atzar, la màxima concordança possible (100%) i l'esperada a l'atzar. S'han enfrontat les variables resposta vacunal, limfòcits B canvi d'isotip de memòria (smB), cadenes lleugeres (fenotip) i cadenes lleugeres (suma).

8.5. Software estadístic

L'anàlisi estadística ha estat possible gràcies a la col·laboració del Servei d'estadística de la UAB i ha estat realitzada amb el software: SAS v9.4, SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Nord, EUA. Les decisions estadístiques s'han realitzat prenent com a nivell de significació el valor 0,05.

9. ASPECTES HUMANS. CONSENTIMENT INFORMAT.

A tots els pacients inclosos a la cohort se'ls ha entregat un consentiment informat per extreure mostres biològiques i emmagatzemar-les al Biobanc d'immunologia de l'HUVH. En ell, s'exposa la utilització de les mostres en projectes d'investigació biomèdica sempre i quan la investigació hagi estat aprovada pel Comitè d'Ètica d'investigació clínica (CEIC) de l'HUVH.

El present estudi ha estat aprovat pel Comitè d'Ètica de l'HUVH amb data 11/05/2017 (número de registre: PR(AMI)372/2016).



RESULTATS

VIII. RESULTATS

1. COHORT

S'ha definit una cohort de 148 pacients amb diagnòstic d'IDCV, dels que finalment s'han inclòs 136 a la seqüenciació gènica massiva. El motiu pel qual 12 pacients –tots ells adults– han estat exclosos de la cohort final ha estat per la manca de mostra per obtenir ADN (n=7), obtenció d'ADN de baixa qualitat (n=1) o per manca de consentiment per a la realització de l'estudi genètic (n=4) (**Figura 9**). Els pacients són adults i pediàtrics i segueixen tractament amb gammaglobulines inespecífiques al Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus. S'han inclòs també 10 pacients de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Tots ells compleixen els criteris d'inclusió detallats anteriorment (apartat **3. Selecció de pacients**, del capítol **VII. Pacients i mètodes**).

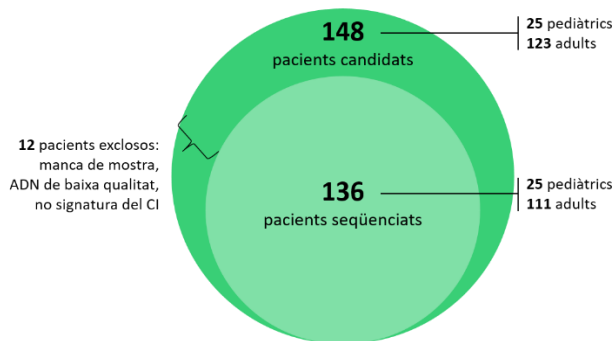


Figura 9. Esquema del nombre de pacients inclosos a l'estudi.

2. VARIABLES DEMOGRÀFIQUES

Els pacients, 73 homes (53,7%) i 63 dones (46,3%) tenen edats compreses dels 11 als 81 anys (veure distribució en funció de l'edat a la **taula 5**) i són seguits per la Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria (UPIIP) –pacients pediàtrics– la Unitat d'Immunologia d'adults, el Servei de Pneumologia del Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus i el Servei d'Immunologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge –pacients adults–.

Taula 5. Nombre i percentatges de les edats dels pacients inclosos a la cohort.

<i>Edat</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Pediàtrics (11 a 17 anys)	14	10,3
Adults (18 a 81 anys)	122	89,7
Mitjana	42,75	
Desviació estàndard	17,87	

Altres variables recollides en aquest treball, com la consanguinitat dels pares, l'ètnia o els antecedents familiars d'IEI es detallen a la **taula 6**.

Taula 6. Nombre i percentatges d'altres variables demogràfiques.

<i>Consanguinitat</i>		<i>Ètnia caucàsica</i>		<i>Antecedents familiars de manifestacions clíniques d'IEI</i>	
<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
3/136	2,2	133*/136	97,8	16/136	11,8

*les 3 ètnies diferents a la caucàsica són l'ètnia llatinoamericana (2 pacients) i l'ètnia asiàtica (1 pacient).

3. MANIFESTACIONS CLÍNiques

L'edat d'inici de signes/símptomes dels pacients de la cohort va des dels poc mesos d'edat fins als 70 anys, tot i que s'observa que en la majoria dels pacients l'edat d'inici de símptomes és durant la infància (dels 2 als 7 anys) (**Figura 10**).

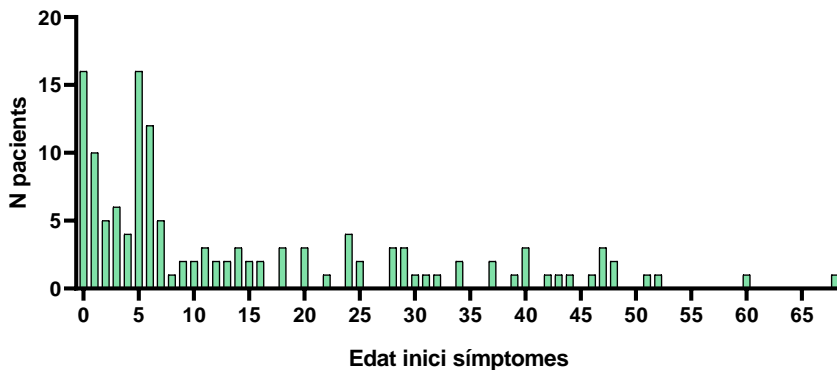


Figura 10. Número de pacients distribuïts en funció de l'edat d'inici de símptomes.

Els signes/símptomes d'inici de tots els pacients de la cohort són les infeccions de repetició de les vies respiratòries altes, concretament otitis, sinusitis, bronquitis i pneumònies.

Al tall transversal fet en ocasió d'aquesta tesi, un 91% dels pacients inclosos a la cohort pateix o ha patit infeccions respiratòries recurrents, un 83% amb afectació pulmonar basada en la presència de bronquièctasis i en l'afectació respiratòria funcional. L'afectació gastrointestinal és la tercera manifestació clínica més comuna, afectant al 76% dels pacients (**Taula 7**). Una representació de les manifestacions clíniques de tots els pacients de la cohort es pot veure a la **figura 12**.

Taula 7. Percentatges de les diferents manifestacions clíniques.

Manifestació clínica	N pacients	%
Infeccions respiratòries bacterianes recurrents	124/136	91,2
Afectació pulmonar	113/136	83,1
Afectació gastrointestinal	104/136	76,5
Limfoproliferació	61/136	44,9
Autoimmunitat	37/136	27,2
Neoplàsies	10/136	7,4

Les neoplàsies detectades a la cohort han estat: limfoma de cèl·lules B (n=2), carcinoma de cordes vocals (n=2), adenocarcinoma de còlon (n=1), limfoma de Hodgkin (n=1), neoplàsia gàstrica (n=1), limfoma intestinal (n=1), neoplàsia d'ovari (n=1), carcinoma de glàndula paròtida (n=1) i carcinoma basocel·lular nasal (n=1).

Les variables anteriorment esmentades, han estat reclassificades en tres subgrups dins de la categoria “Infecció” en: sense infeccions (0), només infeccions (1), infeccions i altres manifestacions clíniques (2) amb la distribució observada a la **taula 8**:

Taula 8. Valors absoluts i percentatge dels subgrups dins la categoria Infecció.

<i>Infecció</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
0	11	8,1
1	3	2,2
2	122	89,7

Es realitza una quantificació de l'acumulació de manifestacions clíniques o “*score clínic*”, obtenint els resultats observats a la **figura 11**:

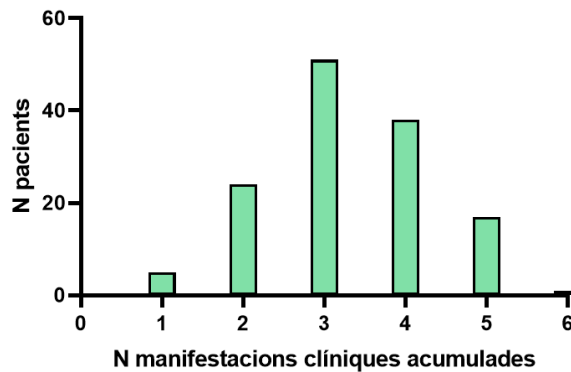


Figura 11. Distribució dels pacients en funció del nombre de manifestacions clíniques acumulades.

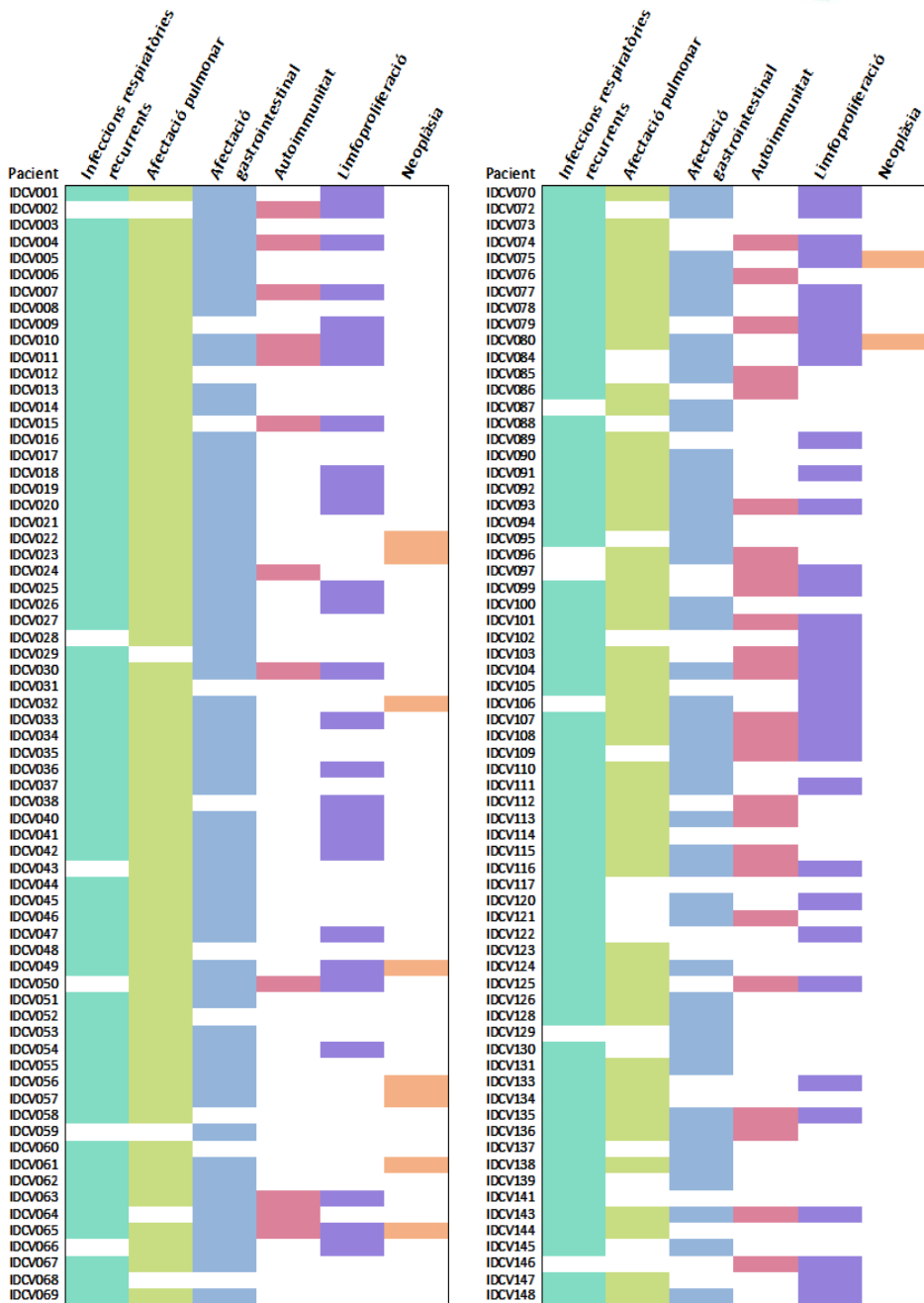


Figura 12. Representació de les manifestacions clíniques de tots els pacients.

4. PARÀMETRES ANALÍTICS

4.1. Valors d'immunoglobulines

A la **taula 9** es detallen els valors *nadir* d'immunoglobulines sèriques previs a l'inici del tractament substitutiu amb gammaglobulina inespecífica en 133/136 pacients (IgG) i en 136/136 pacients (IgA i IgM).

Taula 9. Valors d'immunoglobulines. Nadir d'IgG i valors d'IgA i d'IgM previs a l'inici del tractament substitutiu amb gammaglobulina inespecífica.

<i>Nadir d'IgG (mg/dl)</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>IgA i IgM</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
<200	40	30,1	IgA disminuïda	118/136	86,8
200-399	53	39,8	IgM disminuïda	101/136	74,3
>400	40	30,1	IgA i IgM disminuïdes	88/136	64,7

Valors de referència interns [9]

Pel que fa a les subclasses d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) només s'han pogut recollir dades de 92 dels 136 pacients de la cohort prèvies a l'inici de tractament substitutiu amb gammaglobulina inespecífica, essent els resultats els exposats a la **taula 10**.

Taula 10. Valors de subclasses d'immunoglobulina IgG.

<i>Subclasses</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
IgG1 disminuïda	77/136	83,7
IgG2 disminuïda	85/136	92,4
IgG3 disminuïda	51/136	55,4
IgG4 disminuïda	19/136	20,7

Valors de referència interns [9]

4.2. Poblacions limfocitàries B

Els resultats de l'estudi de subpoblacions de limfòcits B poden veure's a la **taula 11**. El 84,9% (101/119) dels pacients presenten uns percentatges de limfòcits B totals normals i el 63,7% dels pacients presenten els limfòcits de transició elevats (65/102). Un 85% dels pacients de la cohort presenten una expressió de CD21⁺ normal.

Taula 11. Nombres absoluts i percentatge de les diferents subpoblacions de limfòcits B (classificació EUROclass).[50]

<i>Subpoblació</i>	<i>Classificació</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Limfòcits B CD19⁺ (n=119)	B+	101	84,9
	B-	18	15,1
Limfòcits B de canvi d'isotip (n=92)	smB+	53	57,6
	smB-	39	42,4
Limfòcits B de transició (n=102)	Tr norm	37	36,3
	Tr hi	65	63,7
Limfòcits B CD21⁺ (n=78)	21 norm	67	85,9
	21 low	11	14,1

4.3. Cadenes lleugeres lliures en sèrum

Els resultats de l'estudi de les cadenes lleugeres lliures en sèrum de 87/136 pacients es poden veure a la **taula 12**. El 83,9% (73/87) dels pacients presenten un o ambdós subtipus disminuïts, en comparació amb els valors de referència establerts. No s'observen diferències significatives entre pacients pediàtrics i pacients adults.

Taula 12. Valors absoluts de cadenes lleugeres lliures en sèrum. Fenotip, relació κ/λ i suma $\kappa + \lambda$.

	<i>Classificació</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Fenotip (n=87)	$\kappa^+\lambda^+$	14	16,1
	$\kappa^+\lambda^-$	3	3,4
	$\kappa^-\lambda^+$	1	1,1
	$\kappa^-\lambda^-$	69	79,3
Relació κ / λ (n=87)	Disminuïda	2	2,3
	Normal	82	94,3
	Elevada	3	3,4
Suma $\kappa + \lambda$ (n=87)	Disminuïda	78	89,7
	Elevada	9	10,3

4.4. Comparativa de biomarcadors pel diagnòstic d'IDCV

Es realitza una comparativa entre els diferents biomarcadors de la IDCV (resposta vacunal, limfòcits B de memòria) afegint els valors de les cadenes lleugeres (fenotip i suma) per tal d'esbrinar quin d'ells és el més robust i poder oferir així un nou biomarcador pel diagnòstic de la IDCV.

Els millors resultats obtinguts corresponen a la variable “cadenes lleugeres (suma)”, amb un 89,7%. No obstant, no podem dir que sigui millor variable que “cadenes lleugeres (fenotip)” (83,9%) ni que “resposta vacunal” (85,2%) ja que els intervals de confiança estan solapats. Sí que podem afirmar que és millor que la variable “smB” (42,4%) (Taula 13).

Taula 13. Comparativa entre els diferents biomarcadors d'IDCV.

<i>Biomarcador IDCV alterat</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>95% límit conf inferior</i>	<i>95% límit conf superior</i>
Resposta vacunal	69/81	85,2	0,7745	0,9292
smB	39/92	42,4	0,3229	0,5249
Cadenes lleugeres (fenotip)	73/87	83,9	0,7619	0,9163
Cadenes lleugeres (suma)	78/87	89,7	0,8326	0,9605

Pel que fa a les correlacions entre les diferents variables, només les cadenes lleugeres presenten una concordança elevada entre elles (suma i fenotip) ($Kappa=0,75$), pel que podríem dir que mesuren el mateix. En canvi, entre la resta de variables l'índex Kappa és molt baix, fins i tot negatiu en alguns casos, indicant que no hi ha cap tipus de relació entre elles (**Taula 14**). A la **taula 15** es poden veure en detall els resultats obtinguts d'enfrontar les variables “Resposta vacunal” i “Cadenes lleugeres” (fenotip i suma).

Taula 14. Valors d'índex kappa.

<i>Variable</i>	<i>Index Kappa</i>	<i>Interpretació</i>
Resposta vacunal vs. smB	0,0579	Insignificant
Resposta vacunal vs. Cadenes lleugeres (fenotip)	-0,0566	Sense acord
Resposta vacunal vs. Cadenes lleugeres (suma)	-0,1538	Sense acord
smB vs. Cadenes lleugeres (fenotip)	0,0646	Insignificant
smB vs. Cadenes lleugeres (suma)	0,0865	Insignificant
Cadenes lleugeres (fenotip) vs. Cadenes lleugeres (suma)	0,7513	Substancial

Interpretació basada en l'estudi d' Abraira et al 2001 [77]

Taula 15. Taula de contingència amb les variables “resposta vacunal” i “cadenes lleugeres” (fenotip i suma) enfrontades.

Resposta vacunal	Cadenes lleugeres (fenotip)			Resposta vacunal	Cadenes lleugeres (suma)		
	0 (normal)	1 (alterada)	Total		0 (normal)	1 (alterada)	Total
0 (normal)	1 1,79	7 12,5	8 14,29	0 0	8 14,29	8 14,29	
1 (alterada)	9 16,07	39 69,64	48 85,71	7 12,5	41 73,21	48 85,71	
Total	10 17,86	46 82,14	56 100,00	7 12,50	49 87,50	56 100,00	

En verd es destaquen els pacients coincidents i en vermell els discordants.

5. RESULTATS GENÈTICS (SEQÜENCIACIÓ GÈNICA MASSIVA)

S’han realitzat un total de 131 panells genètics, 2 array-CGH, 8 WES i 1 WGS per motius assistencials seguint les indicacions dels facultatius responsables (veure figura 8 i taula 16).

Després d’analitzar els resultats obtinguts dels 136 pacients mitjançant la seqüenciació genètica massiva, es van trobar un total de 36 casos amb variants monogèniques rellevants en gens associats a IDCV (26,5% del total de la cohort) essent en 24 casos variants genètiques considerades com a causals (17,6%) i 12 casos variants de susceptibilitat (8,8%). A la figura 13 es pot veure una representació de tots els gens on s’han identificat variants rellevants així com la distribució de les variants a TACI (*TNFRSF13B*).

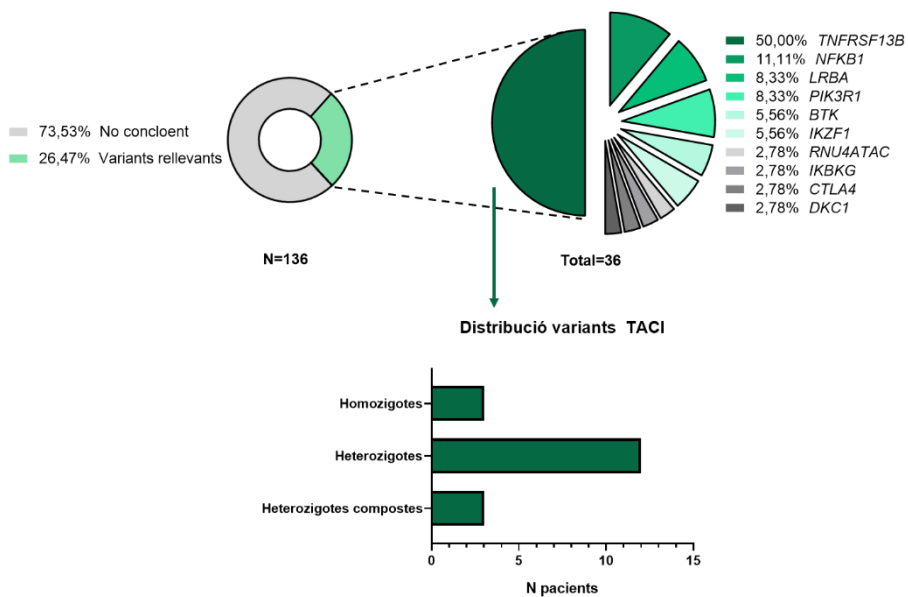


Figura 13. Gens amb variants rellevants identificades.

Taula 16. Informació detallada de les variants genètiques identificades.

Pacient	Variant	Estudi genètic	Zigositat	Variant	Classificació de la variant
IDCV001	<i>RNU4ATAC</i>	WGS	COMP HET	n.8C>T / n.50G>A	Patogènica Patogènica
IDCV012	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.512T>G / p.L171R	Patogènica
IDCV017	<i>IKBK</i>	Panell IEI HUVH	HEMI (X-linked)	c.169G>A / p.E57K	Probablement patogènica*
IDCV022	<i>BTK</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.1252T>C / p.Y418H	Probablement patogènica
IDCV038	<i>BTK</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.1889T>C / p.M630T	VUS
IDCV047	<i>NFKB1</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.932_948del / p.I311Kfs*3	Patogènica
IDCV053	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HOM	c.310T>C / p.C104R	Patogènica
IDCV062	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.62-1G>A	Patogènica
IDCV066	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.266G>A / p.C89Y	Patogènica
IDCV069	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	COMP HET	c.310T>C / p.C104R c.542C>A / p.A181E	Patogènica Patogènica
IDCV074	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.310T>C / p.C104R	Patogènica
IDCV075	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.310T>C / p.C104R	Patogènica
IDCV076	<i>NFKB1</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.1149delT / p.G384E*48	Patogènica
IDCV077	<i>LRBA</i>	Panell IEI HUVH	HOM	c.6386C>A / p.S2129X	Patogènica
IDCV078	<i>TNFRSF13B</i>	WES	HET	c.515G>A / p.C172Y	Patogènica
IDCV080	<i>PIK3R1</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.1425+1G>A	Patogènica
IDCV093	<i>LRBA</i>	WES	HOM	c.3366insA / p.A1123Sfs*1	Patogènica
IDCV095	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HOM	c.310T>C / p.C104R	Patogènica
IDCV097	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.260T>A / p.I87N	Patogènica
IDCV100	<i>IKZF1</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.851-2A>C	Patogènica
IDCV101	<i>NFKB1</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.401delT / p.V134GfsX11	Patogènica
IDCV102	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.236A>G / p.Y79C	Patogènica
IDCV105	<i>CTLA4</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.473_474del / p.P158RfsX3	Patogènica
IDCV106	<i>PIK3R1</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.1425+1G>A	Patogènica
IDCV107	<i>TNFRSF13B</i>	Panell IEI HUVH	HET	c.310T>C / p.C104R	Patogènica

IDCV109	LRBA	Panell IEI HUVH	HOM	c.6155delA / p.N2052Tfs*20	Patogènica
IDCV116	PIK3RI	Panell IEI HUVH	HET	c.1425+1G>A	Patogènica
IDCV122	TNFRSF13B	Panell IEI HUVH	HET	c.109G>C / p.E37Q	VUS
IDCV125	NFKBI	Array CGH	HET	Chr 4 deletion 4q22.2-q24 (13 Mb)	Patogènica
IDCV126	TNFRSF13B	Panell IEI HUVH	HOM	c.310T>C / p.C104R	Patogènica
IDCV128	DKCI	Panell IEI HUVH	HEMI (X-linked)	c.1503_1504delGA / p.K502Efs*12	Probablement patogènica
IDCV131	TNFRSF13B	Panell IEI HUVH	HET	c.605G>A / p.N202H	VUS
IDCV144	IKZFI	Panell IEI HUVH	HET	c.484C>T / p.R162W	Patogènica
IDCV145	TNFRSF13B	Panell IEI HUVH	COMP HET	c.310T>C / p.C104R c.512T>G / p.L171R	Patogènica Patogènica
IDCV147	TNFRSF13B	Panell IEI HUVH	COMP HET	c.542C>A / p.A181E c.310T>C / p.C104R	Patogènica Patogènica
	TNFRSF13B		HET	c.61+2T>A	Patogènica
IDCV148	IKBKG	Panell IEI HUVH	HEMI (X-linked)	c.169G>A / p.E57K	Probablement patogènica*

*Variant hipomòrfica i de penetrància incompleta (veure apartat 5.8 de Resultats)

S'han detectat un total de 28 variants úniques (**taula 16**) de les quals 16 no havien estat prèviament descrites a la literatura. D'aquestes, s'han realitzat un total de 10 estudis funcionals i/o moleculars per tal de confirmar la patogènica de les variants identificades (62,5%). Les 6 mutacions restants no han pogut ser validades per manca de mostra biològica degut a la dificultat de desplaçament d'aquests pacients fins a l'hospital. A més, s'han realitzat un total de 14 estudis familiars (58,3%) que han permès detectar 9 familiars afectes i 17 familiars portadors, això ha permès l'ofertament de consell genètic preconcepcional per a tots aquells familiars en edat reproductiva.

Dels 9 casos detectats de familiars afectes gràcies als estudis familiars, 3 d'ells han pogut ser catalogats d'IDCV per compliment de criteris diagnòstics de la ICON-2015 i un d'ells ha pogut començar tractament amb gammaglobulines inespecífiques.

En els 10 casos en els que no s'ha realitzat l'estudi familiar ha estat degut a la impossibilitat de contactar amb la família o la no conformitat a l'estudi genètic.

Seguidament es procedeix a detallar en profunditat els casos amb variants monogèniques que considerem causals i els casos amb variants que augmenten la susceptibilitat a patir IDCV. Es comenten les característiques clíniques i immunològiques dels pacients amb resultats genètics positius i no s'entra en detall en el diagnòstic d'IDCV en concret ja que és un criteri estricte d'inclusió de l'estudi.

5.1. Variants genètiques a *LRBA*

El gen *LRBA* (*OMIM#606453*) es localitza al cromosoma 4, té herència AR i codifica per la proteïna lipopolysaccharide (LPS)-responsive and beige-like anchor, la qual està involucrada en la re-circularització i reciclatge de les vesícules que contenen la proteïna CTLA4. Variants de pèrdua de funció en aquest gen han estat descrites en fenòmens de desregulació immunitària associada a infeccions recurrents, malaltia inflamatòria intestinal i autoimmunitat (*ORPHAcode#445018*). [78]

S'identifiquen 3 variants genètiques al gen *LRBA* les quals representen un 2,2% respecte a la cohort total, un 8,3% respecte al total de pacients amb variants genètiques identificades i un 12,5% respecte als pacients amb variants genètiques causals.

5.1.1. *IDCV077*

Es tracta d'un pacient masculí de 57 anys amb afectació respiratòria i gastrointestinal. Com a antecedents, presenta adenoma gàstric extirpat, síndrome granulomatosa amb afectació ganglionar, cutània, pulmonar i intestinal, malaltia vascular porto-sinusoidal amb hipertensió portal (esplenomegàlia i varius esofàgiques). Com a conseqüència de la troballa genètica, el pacient inicia tractament amb *abatacept* l'octubre de 2019, presentant una millora clínica i trobant-se estable en el moment de redacció d'aquest treball.

L'estudi genètic ha permès identificar una variant genètica patogènica en homozigosi al gen *LRBA*. Es tracta d'un canvi de nucleòtid (c.6419C>A) que dona lloc a un codó

STOP i a una proteïna truncada (p.S2140X). Aquesta variant genètica és nova (no descrita a les bases de dades ni a la literatura) i s'ajusta a un diagnòstic de deficiència d'*LRBA*.

Per tal de corroborar la deficiència d'*LRBA*, es duu a terme una tinció intracel·lular de la proteïna *LRBA* mitjançant citometria de flux. S'observa una acusada disminució d'expressió d'aquesta comparada amb el control sa, confirmant la patogenicitat de la variant genètica identificada. (Figura 14, Taula 17)

5.1.2. IDCV093

Es tracta d'una pacient de sexe femení, que va presentar diabetis tipus 1, psoriasi, candidíasis bucal i hepatoesplenomegàlia als 8 mesos d'edat. Més tard, va experimentar infeccions bacterianes i virals recurrents, incloent meningitis pneumocòcica i virèmia persistent pel virus d'Epstein Barr (VEB). Es va sotmetre a dos TPH als 8 i 9 anys, essent finalment èxits a causa d'una toxoplasmosi disseminada.

Al llarg d'aquest temps, s'havia realitzat l'estudi genètic mitjançant el panell TruSight One amb resultats negatius. La seqüenciació de l'exoma complet *post-mortem* de la pacient va revelar una inserció en homozigosi d'1 nucleòtid a l'exó 23 del gen *LRBA* de la pacient, provocant un canvi en el marc de lectura i la introducció d'un codó STOP prematur resultant en una proteïna truncada de 1.123 aminoàcids (proteïna *LRBA* canònica: 2.863 aa). Aquesta variant genètica no estava descrita a la literatura.

Les dades de l'exoma dels pares mostraven que la mare de la pacient era heterozigota per a la variant genètica i el seu pare no n'era portador. Tenint en compte l'herència autosòmica recessiva de la deficiència de *LRBA*, es presentava una discordança amb el resultat de la pacient (variant genètica en homozigosi). Es van confirmar els genotips mitjançant la seqüenciació de Sanger i la paternitat es va confirmar mitjançant tipificació HLA d'alta resolució. Una segona anàlisi de les dades de l'exoma de la pacient van mostrar una pèrdua d'heterozigositat (LOH, de l'anglès *loss of heterozygosity*) de 1.013 Mb al cromosoma 4, incloent el gen *LRBA*. En aquesta regió de 1,013 Mb, la pacient era homozigota per l'haplotip present a la mare. Dins de

la regió LOH es van estudiar 5 polimorfismes comuns d'un sol nucleòtid (SNPs) que envoltaven la variant genètica *LRBA* i pels que la pacient havia de ser teòricament heterozigota (ja que pare i mare eren homozigots per al·lels diferents). Els genotips d'aquests SNP es van confirmar mitjançant la seqüenciació Sanger i mostraven que la pacient era homozigota per l'al·lel matern. Amb aquests resultats vam concloure que l'estat d'homozigosi de la variant genètica *LRBA* c.3366insA de la pacient es devia a una isodisomia parcial d'origen matern. Aquest cas va ser publicat pel nostre grup l'any 2018.[79]

5.1.3. *IDCV109*

Es tracta d'un pacient masculí de 47 anys amb múltiples infeccions respiratòries, sinusitis agudes i pneumònies, seguit a l'Hospital Universitari de Bellvitge. Com antecedents, presenta una púrpura trombocitopènica immunitària als 6 anys d'edat. Al llarg del temps, presenta èczema crònic, adenopaties, diarrea per *Salmonella enteritidis* i *Giardia lamblia* i malaltia inflamàtoria intestinal. A l'última TC pulmonar de 2020 s'observen bronquièctasis cilíndriques bilaterals en relació amb patologia inflamatòria/infecciosa d'aspecte residual.

S'identifica una variant genètica patogènica en homozigosi al gen *LRBA*. Es tracta d'una deleció d'un nucleòtid (c.6155delA) que dona lloc a una proteïna truncada (p.Asn2052ThrfsX20). Aquesta variant genètica (no descrita a les bases de dades i a la literatura) s'ajusta a un diagnòstic de deficiència d'*LRBA*.

En el moment de redacció d'aquest treball, rep tractament amb immunoglobulines endovenoses mensuals presentant ocasionalment alguna infecció bacteriana lleu però sense més complicacions, per la qual cosa els seu equip clínic decideix no administrar *abatacept*.

Per tal de confirmar la deficiència de *LRBA*, es realitza una tinció intracel·lular mitjançant citometria de flux en la que s'observa una acusada disminució d'expressió d'*LRBA* comparada amb el control sa, confirmant la patogènica de la variant genètica identificada (**Figura 14** i **Taula 17**).

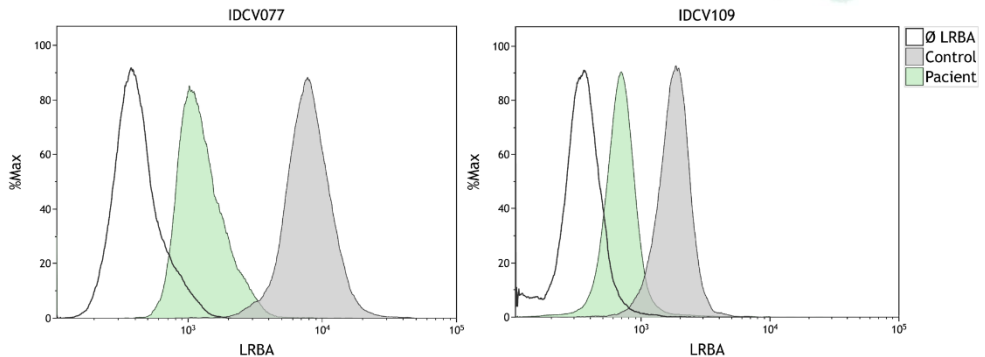


Figura 14. Tinció intracel·lular d'LRBA dels pacients IDCV077 i IDCV109.

Taula 17. Mitjanes aritmètiques i percentatge de la expressió de LRBA mitjançant citometria de flux.

Mostra	Mitja aritmètica de limfòcits		Percentatge de limfòcits (%)	
	fmo LRBA	+LRBA	fmo LRBA	+LRBA
Control	440	8.200	2,40	99,95
IDCV077	450	↓1.330	2,32	↓43,95
Control	396	1.852	1,26	98,32
IDCV109	445	↓787	0,93	↓21,58

Fmo; fluorescence minus one

Les variants genètiques trobades a *LRBA*, en dos dels pacients (IDCV077 i IDCV109) són truncants a les posicions 2140 i 2052 respectivament, pel que s'espera una absència completa d'expressió de la proteïna nativa. El motiu pel qual veiem una aparent expressió intermèdia als histogrames de citometria és un efecte òptic a l'afegir l'expressió d'LRBA a la mostra FMO (fluorescence minus one, "ØLRBA") en la que afegim la mateixa mostra sense l'anticòs anti-LRBA. Si obviem la FMO i ens fixem només en el pacient vs el control sa, observem una clara absència de proteïna. El mateix fenomen s'observa en altres publicacions: "*Flow Cytometric Approach in the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies*" by Sevil Oskay Halacli [80] i a "*Protein Expression in the Diagnosis of LRBA Deficiency by Flow Cytometer*" by İsmail Öğülür *et al.*[81]

5.2. Variants genètiques a *CTLA4*

El gen *CTLA4* (OMIM#616100) es troba localitzat al cromosoma 2 i l'IEI que causa té una herència AD. Codifica per la proteïna CTLA4, acrònim de “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4” (antigen 4 del limfòcit T citotòxic) que és un receptor situat a la membrana cel·lular dels limfòcits T que inhibeix la seva funció i activació. Variants en aquest gen han estat descrites en fenòmens de desregulació immunitària associada a citopènies autoimmunes, enteropatia, malaltia pulmonar intersticial, infiltració limfocítica extra-limfoide i infeccions recurrents. (*ORPHAcode#436159*) [82]

La variant genètica trobada al gen *CTLA4* representen un 0,7% respecte a la cohort total, un 2,8% de respecte a total de variants genètiques trobades i un 4,2% respecte a les variants genètiques causals.

5.2.1. *IDCV105*

El pacient és un home de 28 anys procedent de Pakistan, amb freqüents episodis d'otitis des de la primera infància. Als 17 anys, resident a Barcelona va desenvolupar un episodi de mononucleosi infecciosa clínica amb serologies positives front citomegalovirus i virus d'Epstein Barr (VEB) i esplenomegàlia. Al 2016 es va detectar malaltia pulmonar intersticial en una TC toràcica que va ser tractada amb corticoides sistèmics.

S'identifica un variant genètica patogènica en heterozigosi al gen *CTLA4*. Es tracta de la deleció de dos nucleòtids (c.473_474del) que dona lloc a un canvi en el marc de lectura i a una proteïna truncada (p.P158RfsX3). Aquesta variant genètica és patogènica i compatible amb el diagnòstic d'haploinsuficiència de *CTLA4*. A partir del diagnòstic genètic, el pacient inicia tractament amb *abatacept* a l'agost de 2019 amb una evolució a nivell pulmonar estable amb certa millora de les imatges pulmonars però sense una clara millora a nivell de proves funcionals respiratòries.

Gràcies a l'estudi genètic familiar s'ha identificat que la mare (65 anys), el germà (31 anys) i la filla (4 anys) del pacient presenten la mateixa variant genètica en heterozigosi al gen *CTLA4* (c.473_474del) (**Figura 15**). Al ser una malaltia amb una herència AD i essent tots els portadors asimptomàtics, es confirma la penetrància incompleta d'aquesta entitat.[83]

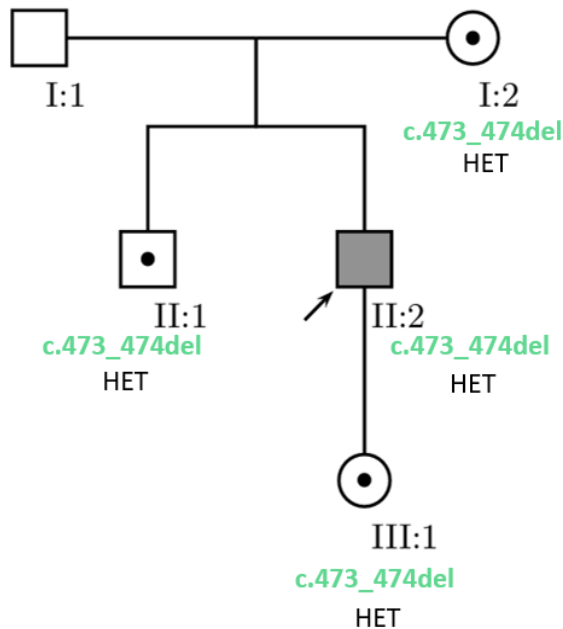


Figura 15. Arbre genealògic del pacient IDC105.
En gris s'indica el pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors.

5.3. Variants genètiques a *NFKB1*

El gen *NFKB1* (*OMIM#164011*) es troba localitzat al cromosoma 4 i té una herència AD (*ORPHAcode#1572*). Codifica per la subunitat p105 del factor nuclear NF-kappa-B, proteïna implicada en la supervivència, proliferació, diferenciació, canvi d'isotip de les immunoglobulines, apoptosi i tolerància dels limfòcits B. Variants genètiques a aquest gen han estat relacionades amb infeccions sinopulmonars recurrents, malaltia pulmonar obstructiva crònica, limfoproliferació associada al VEB, citopènies autoimmunes, alopecia i tiroïditis autoimmune.[84]

Les 4 variants genètiques trobades al gen *NFKB1* representen un 2,9% respecte a la cohort total, un 11,1% de respecte a total de variants genètiques trobades i un 16,7% respecte a les variants genètiques causals.

5.3.1. IDCV047

És un pacient masculí de 47 anys que presenta pneumònies amb bronquièctasis bilaterals, sinusitis, infecció bronquial crònica per *Haemophilus influenzae* (Hib) i psoriasi.

L'estudi genètic en el pacient ha permès identificar una variant genètica en heterozigosi al gen *NFKB1*. Aquesta variant és una deleció de 17 nucleòtids a l'exó 11 del gen (c.932_948del) que provoca un canvi de marc de lectura i l'aparició d'un codó STOP prematur (p.Ile311Lysfs*3). Aquesta variant és de pèrdua de funció i causa un tipus d'IDCV per deficiència d'*NFKB1* concordant amb la clínica del pacient.

5.3.2. IDCV076

Es tracta d'una pacient de gènere femení de 37 anys amb un fenotip greu d'IDCV i manifestacions gastrointestinals greus, inclosa diarrea crònica.

S'identifica una variant genètica truncant en heterozigosi a *NFKB1*, que consisteix en una deleció d'un nucleòtid a l'exó 12 (c.1149delT) que provoca un canvi del marc de lectura i l'aparició d'un codó STOP prematur (p.Gly384GluX48). Aquesta variant genètica no s'ha descrit prèviament a la literatura ni a bases de dades relacionades i ha estat publicada per primera vegada pel nostre grup l'any 2018.[85] En aquest estudi es demostra que la presència de l'al·lel mutat a l'ARNm està clarament reduïda en comparació amb l'al·lel *wild type* (*wt*), cosa que indica que l'al·lel mutat és degradat per la cèl·lula, provocant una haploinsuficiència *de facto*.

La segregació familiar ha pogut identificar que la variant genètica ha estat transmesa a la seva filla de 10 anys. La filla es troba asimptomàtica, tot i que compleix criteris d'IDCV (compleix 2/5 criteris ICON): presenta valors disminuïts tant d'IgG com d'IgM i IgA. No obstant, no rep tractament substitutiu amb gammaglobulines i es controla periòdicament (Figura 16).

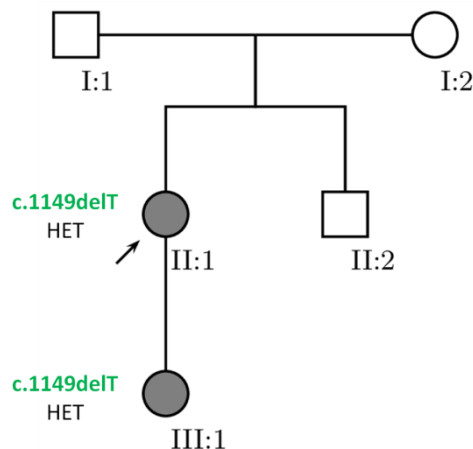


Figura 16. Arbre genealògic de la pacient IDCV076. En gris s'indica les pacients afectes i la fletxa indica la pacient índex.

5.3.3. *IDCV101*

Es tracta d'un pacient de sexe masculí de 56 anys que debuta amb una pneumònia bilobular als 20 anys. A més, presenta gastroenteritis agudes freqüents, hipertròfia parotídia, hiperplàsia nodular regenerativa hepàtica i una anèmia hemolítica autoimmune refractària a diverses línies de tractament pel que va requerir una esplenectomia.

En el pacient, s'ha identificat una variant genètica en heterozigosi a *NFKB1*. Aquesta variant és una deleció d'un nucleòtid a l'exó 6 (c.401delT) que provoca un canvi de marc de lectura i l'aparició d'un codó STOP prematur (p.V134GfsX11). Aquesta variant és clarament de pèrdua de funció i responsable de la IDCV del pacient.

Mitjançant l'estudi de segregació s'ha identificat que un dels fills del pacient índex ha heretat la variant genètica a *NFKB1* (Figura 17). El fill portador de la variant és un home de 33 anys que fins al moment ha fet dues pneumònies sense requerir ingrés hospitalari a més d'infeccions respiratòries de vies altes durant la infància, presenta hipogammaglobulinèmia (IgG, IgA i IgM disminuïdes), compleix criteris d'IDCV i rep tractament substitutiu amb GGEV. És seguit i controlat pel Servei d'Immunologia de l'Hospital Vall d'Hebron i se li ha ofert consell genètic preconcepcional a ell i a la seva parella.

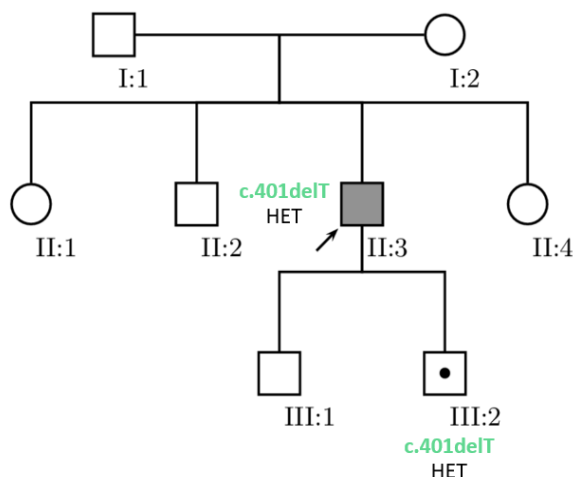


Figura 17. Arbre genealògic del pacient **IDCV101**. En gris s'indica el pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors.

5.3.4. *IDCV125*

És un pacient masculí de 27 anys el qual presenta un fenotip complex. A part de les alteracions clíniques i immunològiques pròpies de la *IDCV*, presenta retard en el desenvolupament neurològic, trets dismòrfics i malformacions. A causa del seu retard en el desenvolupament associat a fenotip dismòrfic, es realitza un estudi d'hibridació genòmica comparativa basada en array-CGH (aCGH) que identifica una deleció de 13 Mb al cromosoma 4q22.2 - q24, la qual implica 53 gens. Alguns d'aquests gens estan relacionats amb les alteracions del desenvolupament del pacient i entre ells es troba el gen *NFKB1* (*GRID2*, *ATOH1*, *SMARCA1*, *HPGDS*, *PDLIM5*, *BMP1B*, *UNC5C*, *PDHA2*, *C4orf37*, *RAP1GDS1*, *TSPAN5*, *EIF4E*, *METAP1*, *ADH5*, *ADH4*, *PCNAP1*, *ADH6*, *ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH7*, *C4orf17*, *RG9MTD2*, *MTPP*, *DAPP1*, *MAPKSP1*, *DNAJB14*, *H2AFZ*, *LOC256880*, *DDIT4L*, *EMCN*, *PPP3CA*, *BANK1*, *SLC39A8*, ***NFKB1***, *MANBA*, *UBE2D3*, *CISD2*, *NHEDC1*, *NHEDC2*, *BDH2*, *CENPE*, *TACR3*, *CXXC4*, *TET2*, *PPA2*, *EEF1AL7*, *FLJ20184*, *INTS12*, *GSTCD*, *NPNT*, *TBCK*, *AIMP1*). En el moment de la realització de l'aCGH, el gen *NFKB1* encara no s'havia associat a cap malaltia humana i va ser uns anys més tard quan, mitjançant un re-anàlisi de les dades, es va identificar l'haploinsuficiència de *NFKB1* com la causa genètica de la *IDCV* del pacient. Aquest cas ha estat recentment publicat pel nostre grup. [86,87]

S'estudien diferents proteïnes de la via NFκB del pacient mitjançant Western Blot, observant una absència de la fosforilació de la subunitat p105 del factor nuclear NFκB (la qual és codificada pel gen *NFKB1*) respecte els controls 791 i 792. Pel que fa a l'expressió de les subunitats p105 i p50, s'observa una expressió disminuïda de p105 i de p50 confirmant l'haploinsuficiència detectada ja que en un dels dos al·lells no s'expressa *NFKB1* però en l'altre s'expressa correctament. No s'observa degradació d'IκBα confirmant-se que la via NFκB del pacient es troba alterada, en consonància amb l'absència de fosforilació de p105 observada. El control de càrrega β-actina presenta una expressió normal, confirmant la presència de proteïna en tots els carrils. (Figura 18)

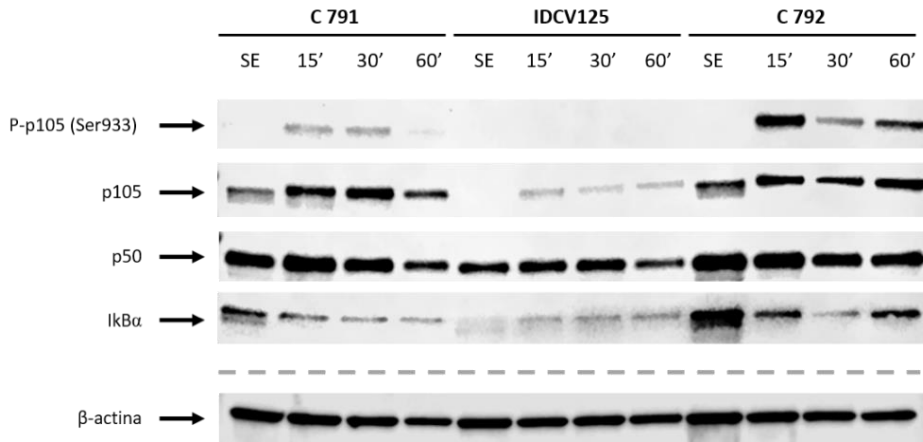


Figura 18. Western Blot del pacient IDCV125. PBMCs estimulades durant 0, 15, 30 i 60 minuts amb PMA [0,1 µg/mL] + IONO [2 µg/mL]. Confirmació dels resultats obtinguts per duplicat.

5.4. Variants genètiques a *PIK3RI*

El gen *PIK3RI* (*OMIM#171833*) es troba al cromosoma 5 i causa diferents malalties segons el tipus de variant genètica i herència: 1) agammaglobulinèmia per deficiència de la subunitat p85 amb herència AR; 2) síndrome de la subunitat p110δ activada (APDS) amb herència AD; 3) síndrome de SHORT (acrònim de **S**hort stature, **H**yperextensibility, **O**cular depression, **R**ieger anomaly, and **T**eething delay), amb herència AD (*ORPHAcode#397596*).

És un gen que codifica per la subunitat reguladora α de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), proteïna que forma part de la via de senyalització AKT/mTOR. Aquesta via està relacionada amb el desenvolupament, l'activació, la proliferació, la supervivència, la diferenciació dels limfòcits B i en el canvi d'isotip de les immunoglobulines. Variants genètiques a *PIK3RI* (i també al gen relacionat *PIK3CD*) han estat descrites com a causants de la síndrome APDS amb infeccions bacterianes greus, reducció de cèl·lules B de memòria i augment de cèl·lules B de transició, limfoproliferació amb risc important de limfoma així com retard del desenvolupament. Degut a que aquests pacients poden tenir un defecte en la producció i les funcions dels anticossos, la majoria dels estudis han demostrat la resposta a la teràpia de substitució d'immunoglobulines (IRT). [88]

Les 3 variants trobades al gen *PIK3RI* representen un 2,2 % respecte a la cohort total, un 8,3% de respecte a total de variants trobades i un 12,5% respecte a les variants causals.

5.4.1. *IDCV080*

Es tracta d'un pacient de sexe masculí que inicia la malaltia als 9 anys presentant baixa estatura, infeccions respiratòries recurrents, infecció vírica crònica (per VEB i CMV), limfoproliferació amb limfadenopaties persistents i esplenomegàlia. A l'immunofenotip avançat presenta una disminució de la proporció de les cèl·lules B de memòria i una elevació en els nombres relatius de limfòcits B de transició (**Taula 18**).

RESULTATS

S'identifica la variant genètica c.1425+1G>A en heterozigosi al gen *PIK3R1*, prèviament reportada a la literatura.[89] Aquesta variant genètica és la més freqüentment reportada en pacients amb síndrome APDS per variants al gen *PIK3R1*. Afecta la primera posició de l'intró 11 (GT→AT), provocant la pèrdua de l'exó 11 i la corresponent supressió dels aminoàcids 434-475 del domini inter-SH2 de la subunitat *PIK3R1*, imprescindible per als contactes inhibitoris amb la subunitat p110 de la proteïna PI3K.

Gràcies a la troballa genètica, el pacient va ser candidat a rebre teràpia dirigida i se li va oferir tractament amb inhibidors específics de PI3Kδ (seletalisib) i posteriorment *sirolimus* amb control parcial de la malaltia. Finalment, però, acabà sent èxitus als 18 anys a causa d'un limfoma, abans de poder-li realitzar un TPH.

L'estudi genètic familiar ha permès evidenciar que la variant en heterozigosi c.1425+1G>A al gen *PIK3R1* del pacient IDCV080 és *de novo* ja que els seus progenitors no en són portadors (Figura 19).

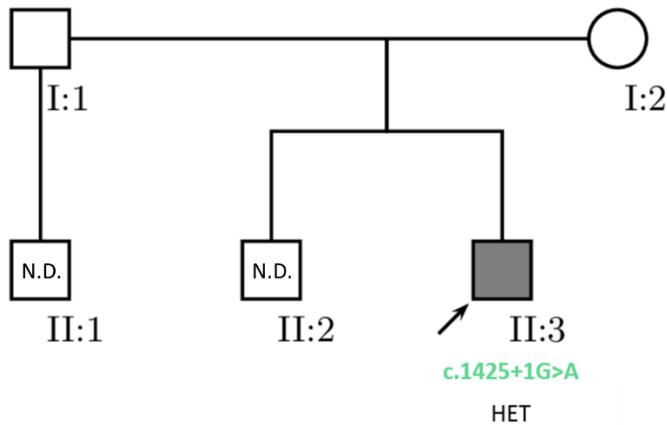


Figura 19. Arbre genealògic del pacient IDCV080.
En gris s'indica el pacient afecte i la fletxa indica el pacient índex. N.D. no disponible.

5.4.2. IDCV106

És un pacient de sexe masculí de 20 anys amb inici de la malaltia als 18 mesos, amb infeccions per VEB, CMV, virus papiloma humà i *Molluscum contagiosum*, juntament amb limfoproliferació, enteropatia i retard en el creixement. A l'immunofenotip presenta una disminució del percentatge de les cèl·lules B de memòria i una elevació en el percentatge de limfòcits B de transició (Taula 18).

S'identifica també la variant genètica c.1425+1G>A en heterozigosi al gen *PIK3RI*, prèviament reportada a la literatura.[89]

Gràcies a la troballa genètica, el pacient va poder rebre tractament amb un inhibidor selectiu oral de PI3Kδ en el marc d'un assaig clínic (Seletalisib (UCB5857)) amb control parcial de la malaltia. Finalment, va ser sotmès a un TPH haploidèntic del seu pare amb una correcta evolució clínica als 3 anys del trasplantament.

L'estudi genètic familiar ha permès evidenciar que la variant genètica en heterozigosi c.1425+1G>A al gen *PIK3RI* del pacient IDCV106 és *de novo* ja que els seus progenitors no en són portadors (Figura 20).

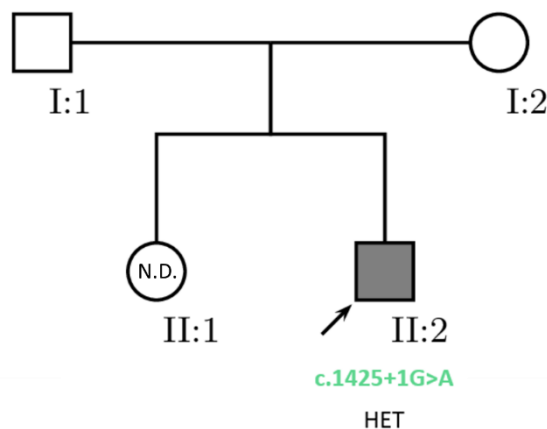


Figura 20. Arbre genealògic del pacient IDCV106.

En gris s'indica el pacient afecte i la fletxa indica el pacient índex. N.D. no disponible.

5.4.3. IDCV116

És tracta d'una dona en tractament substitutiu d'immunoglobulines per infeccions greus i hipogammaglobulinèmia. Presenta una important hepatoesplenomegàlia i diversos episodis de gastroenteritis per *Campylobacter jejuni*. A l'immunofenotip presenta una disminució del percentatge de cèl·lules B de memòria i una elevació en els nombres relatius dels limfòcits B de transició (Taula 18).

S'identifica novament la variant genètica c.1425+1G>A en heterozigosi al gen *PIK3R1* mitjançant seqüenciació Sanger a partir d'ADN procedent de frotis bucal a causa del rebuig de la pacient a la punció venosa. Tot i rebre tractament amb *sirolimus*, va acabar essent èxitus per motius no relacionats amb la seva immunodeficiència als 44 anys.

L'estudi genètic familiar ha permès evidenciar que la variant genètica en heterozigosi c.1425+1G>A al gen *PIK3R1* de la pacient és *de novo* ja que els seus progenitors no en són portadors (Figura 21). La pacient no tenia descendència.

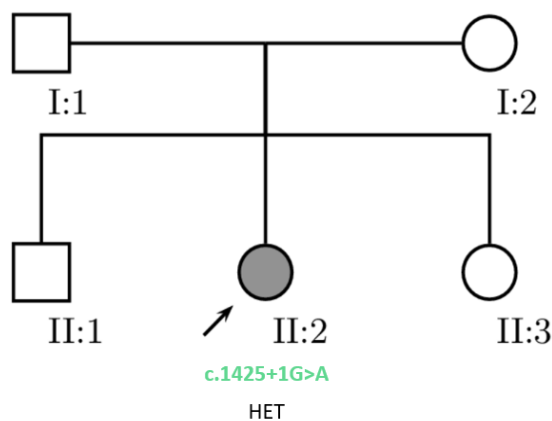


Figura 21. Arbre genealògic de la pacient IDCV116. En gris s'indica la pacient afectada i la fletxa indica la pacient índex.

Taula 18. Percentatges (%) de les diferents poblacions limfocitàries avançades en pacients amb variant genètica a *PIK3R1*.

Subpoblació	IDCV080	IDCV106	Valors de Referència (pediàtrics)	IDCV116	Valors de Referència (adults)
CD4 ⁺ naive	↓7,0	↓12,4	14 – 61	↓0,5	29,5 - 49,95
CD4 ⁺ effector	6,0	7,0	0 – 43,6	↓2,4	4,09 - 12,17
CD4 ⁺ effector memory	↑75,0	↑62,6	11 – 27,8	↑91,4	23,48 - 39,56
CD4 ⁺ central memory	12,0	18,0	11,3 – 23	↓5,8	14,4 - 26,85
CD8 ⁺ naive	↓1,0	↓1,3	26,6 – 51,5	↓23,4	26,83 - 50,09
CD8 ⁺ effector	↑68,0	↑39,4	8,3 – 19,9	19,9	14,56 - 38,39
CD8 ⁺ effector memory	30,0	↑59,1	29,1 – 52,3	↑54	22,78 - 41,47
CD8 ⁺ central memory	↓0,1	↓0,2	3,2 – 8,9	2,7	0,67 - 5,2
Th1	↑38,0	↑47,1	3,8 – 24	↑42	17,05 - 28,65
Th2	↓24,8	37,9	31,5 – 76,9	↓4,8	7,0-16,0
Th1-Th17	↑33,0	10,1	3,8 – 24	↑43,3	6,72 - 16,6
Th17	↓4,2	↓5,0	6,8 – 12,6	6,8	4,95 - 11,86
T regulatory	↑3,4	↑6,0	1,4 – 2,7	↑14	2,34 - 4,8
CD19 ⁺ Naive	65,0	↓54,0	65 – 84	64	48,57 - 72,34
CD19⁺ Transitional	↑97,0	↑75,0	8,2 – 18,6	↑90	2,36 - 11,02
CD19⁺ Preswitch memory	↓0,5	6,2	4,7 – 11	↓3,2	12,9 - 100
CD19⁺ Switch memory	↓0,1	↓3,8	4,7 – 14,8	↓1,2	10,11 - 22,18

Valors de referència de Garcia-Prat et al.[8]

5.5. Variants genètiques a *RNU4ATAC*

El gen *RNU4ATAC* (OMIM# 616651) codifica per un “small nuclear RNA” anomenat RNA U4atac small nuclear (U12-dependent *splicing*) i forma part del complex de l'*spliceosoma* menor dependent de l'U12. Està localitzat al cromosoma 2 i variants en aquest gen han estat associades a la síndrome de Roifman, amb herència AR (ORPHAcode#353298). Aquesta síndrome és un trastorn congènit rar caracteritzat per una associació de deficiència d'anticossos, displàsia condrossea espondiloepifisaria, distròfia de la retina, creixement pre i postnatal deficient, retard cognitiu i dimorfisme facial.[90]

Les variants trobades al gen *RNU4ATAC* representen un 0,7% respecte a la cohort total, un 2,8% de respecte a total de variants trobades i un 4,2% respecte a les variants causals.

5.5.1. IDCV001

Es tracta d'un pacient de sexe masculí de 12 anys amb hipogammaglobulinèmia i dèficit de producció d'anticossos, limfedema unilateral congènit, cavernomatosis portal, hipotiroïdisme congènit amb tiroïdes ortotòpic, talla baixa, displàsia òssia i retinopatia.

La realització del panell genètic d'IEI i la seqüenciació d'exoma complet en el pacient conclou amb resultats negatius. Finalment, a partir la seqüenciació i anàlisi del genoma complet s'identifiquen dues variants genètiques patogèniques (n.8C>T i n.50G>A) en heterozigosi en el gen *RNU4ATAC*. Segons el coneixement actual, les variants (n.8C>T i n.50G>A) al gen *RNU4ATAC* en forma d'heterozigot compost identificades en el pacient, es consideren responsables del seu fenotip clínic.

Els estudis de segregació de les variants trobades al gen *RNU4ATAC* han pogut demostrar que cada una de les variants prové d'un dels progenitors (pare c.8C>T, mare c.50G>A) fet que demostra que les dues variants genètiques estan en *trans* en el pacient, confirmant l'estat d'heterozigot compost. Un dels germans ha heretat la

variant en heterozigosi c.8C>T del pare i l'altre encara no ha estat estudiat per manca de clínica i alteracions immunològiques compatibles. (Figura 22)

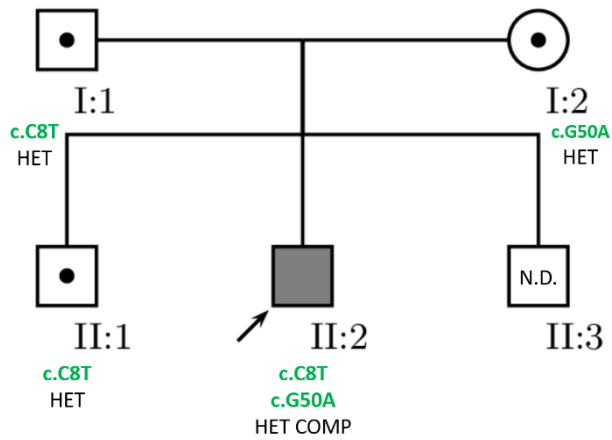


Figura 22. Arbre genealògic del pacient IDCV001.
 En gris s'indica el pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors. N.D. no disponible.

5.6. Variants genètiques a *DKCI*

El gen *DKCI* (*OMIM#305000*) es troba localitzat al cromosoma X (herència XL) (*ORPHAcode#1775*) i codifica per la subunitat 4 del complex ribonucleoproteic H/ACA. Aquesta proteïna està involucrada en el processament i modificació de l'ARN ribosomal. Variants en aquest gen han estat descrites com a causants de disqueratosi congènita provocant insuficiència medul·lar òssia, fibrosi pulmonar i hepàtica, distròfia unguial, leucoplàquia, pigmentació reticulada de la pell, microcefàlia i retard del neurodesenvolupament.

Aquesta variant genètica representa un 0,7% respecte a la cohort total, un 2,8% de respecte a total de variants trobades i un 4,2% respecte a les variants causals.

5.6.1. *IDCV128*

Pacient de sexe masculí de 27 anys amb hipogammaglobulinèmia de debut en la infantesa, infeccions respiratòries recurrents, bronquièctasis, èczema cutani i alteracions de la dentició.

S'identifica una variant genètica en hemiziosi (X-linked) probablement patogènica al gen *DKCI*. Es tracta d'una deleció de dos nucleòtids (c.1503_1504delGA) a l'últim exó del gen que provoca un canvi de marc de lectura i la incorporació d'11 aminoàcids no relacionats i finalment un codó STOP (p.Lys502Glufs*12). La proteïna resultant tindria 512 aminoàcids (respecte als 514 de la *wt*). Per tant, només estaria afectada la part C-terminal (els últims 13 aminoàcids) i la proteïna podria conservar certa funció. No s'han pogut realitzar estudis funcionals en el moment de la escriptura d'aquest treball per manca de mostra biològica disponible.

Entre les múltiples manifestacions associades a variants en hemiziosi al gen *DKCI* es descriu un fenotip immunològic similar a una IDCV com el cas que es presenta.[91] El pacient, no té signes de fracàs medul·lar o complicacions greus de disqueratosi congènita pel que s'ha considerat que no té indicació per a ser sotmès a TPH.

5.7. Variants genètiques a *IKZF1*

El gen *IKZF1* (*OMIM#603023*) es troba localitzat al cromosoma 7 i codifica per la proteïna IKAROS, involucrada en el desenvolupament i l'activació dels limfòcits B. Variants en aquest gen poden donar un fenotip compatible amb IDCG (herència AD per variants amb efecte dominant negatiu) i IDCV (herència AD per variants que causen haploinsuficiència) (*ORPHAcode#317473*). En aquest últim cas, les manifestacions clíniques observades són les clàssiques d'IDCV; disminució de cèl·lules pro-B, infeccions sinopulmonars recorrents, augment del risc de leucèmia limfocítica aguda (LLA) i autoimmunitat. [92]

Les dues variants trobades al gen *IKZF1* representen un 1,5% respecte a la cohort total, un 5,6% de respecte a total de variants trobades i un 8,3% respecte a les variants causals.

5.7.1. IDCV100

Dona de 20 anys amb quadres catarrals recorrents des de la primera infància, pneumònies i otitis recorrents, sordesa de transmissió i quadres gastrointestinals recorrents. També presenta trastorn de l'espectre autista i va necessitar una escolarització especial.

Es detecta una variant genètica en heterozigosi al gen *IKZF1* (IKAROS). Es tracta d'un canvi de nucleòtid al lloc acceptor d'*splicing* de l'intró 7 (c.851-2A>C). La variant genètica és nova (no descrita a les bases de dades i a la literatura).

Els estudis de segregació de la variant en heterozigosi al gen *IKZF1* (c.851-2A>C) han pogut demostrar que la variant presentada per la pacient havia estat heretada de la seva mare i que el seu germà (només de mare) també la presenta (**Figura 23**). No obstant, ambdós portadors són asimptomàtics i, per tant, es tracta d'un cas de penetrància incompleta.

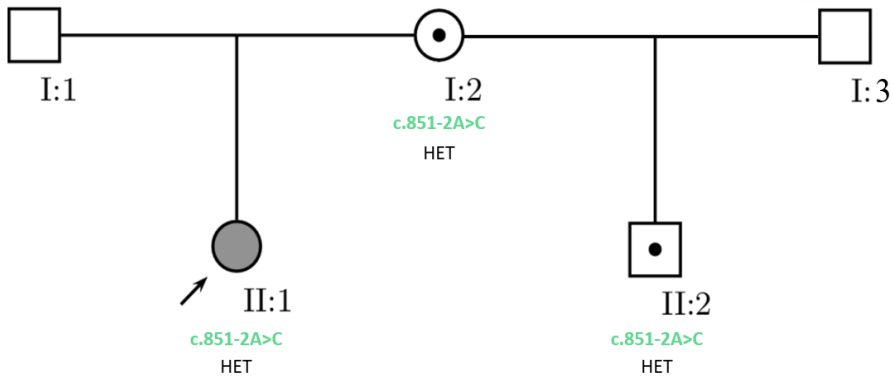


Figura 23. Arbre genealògic de la pacient IDCV100.
 En gris s'indica la pacient afectada, la fletxa indica la pacient índex i el punt els familiars portadors.

Per tal d'esbrinar el possible defecte en el procés d'splicing de la variant c.851-2A>C, s'amplifica i es seqüència l'ADNc del gen *IKZF1* de la pacient índex, sense identificar cap alteració. Finalment, gràcies a la presència d'un polimorfisme a l'ADN genòmic (ADNg) de la pacient, podem demostrar l'absència completa d'un dels al·lels en l'ADNc (Figura 24). Per tal d'esbrinar si en el cas de la mare té lloc el mateix fenomen, es busca la presència d'algun polimorfisme a l'ADNg de la mare amb resultat negatiu, impossibilitant així reproduir el mateix experiment. Per tant, concloem que la variant genètica identificada a la pacient índex provoca un defecte d'splicing que condueix a un ARNm aberrant que és completament degradat.

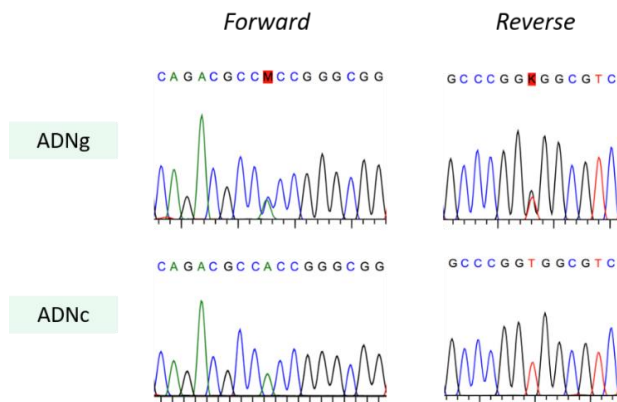


Figura 24. Electroferograma de la seqüenciació Sanger de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV100 (zona del polimorfisme identificat).
 M= A o C = grup amino, K= G o T = grup keto.

Es realitza una PCR quantitativa (qPCR) per veure la expressió relativa d'*IKZF1* dels tres membres de la família així com l'expressió relativa de *CD19* i de *CD3E*. S'inclouen 6 controls interns i es calculen els rangs de normalitat aproximats (mitjana +/- desviació estàndard) (**Taula 19**):

Taula 19 . Expressió gènica relativa d'*IKZF1*, *CD19* i *CD3E* de la família IDCV100 i individus control.

Subjecte	<i>IKZF1</i>	<i>CD19</i>	<i>CD3E</i>
Control 1	598,00	61,17	1.849,81
Control 2	812,33	28,34	1.539,56
Control 3	428,47	23,76	1.064,20
Control 4	507,77	55,64	1.339,26
Control 5	430,55	30,10	1.695,52
Control 6	472,35	76,97	3.448,08
Rangs controls	394 - 688	24 - 67	980 - 2.665
IDCV100-index	↑3.390,74	↓0,14	↓292,02
IDCV100-germà	↑1.075,84	↓7,36	1.250,61
IDCV100-mare	↑1.251,26	↓4,20	↓682,06

Els tres components de la família d'IDCV100 presenten una expressió relativa d'*IKZF1* molt superior a la dels controls, i al mateix temps, una expressió gènica de *CD19* i de *CD3E* molt més baixa comparada amb els controls utilitzats (**Figura 25**).

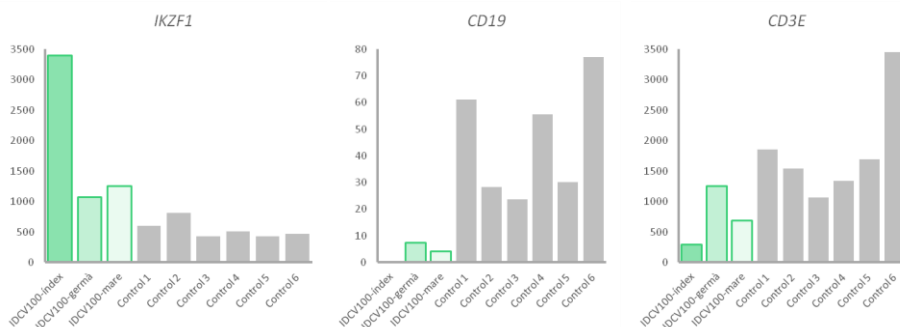


Figura 25. Expressió relativa d'*IKZF1*, *CD19* i *CD3E* en diferents controls interns.

Per mirar de trobar una explicació en aquesta elevada expressió gènica relativa d'*IKZF1* evidenciada en els tres membres de la família, s'estudia l'expressió d'*IKZF1* en diferents poblacions cel·lulars de tres donants sans: limfòcits T (purificats a partir de selecció negativa de CD3), limfòcits B (purificats a partir de selecció negativa de CD19) i neutròfils (purificats mitjançant gradient de densitat i confirmant l'expressió de CD15). Els resultats de la qPCR indiquen que les cèl·lules amb major expressió d'*IKZF1* són els limfòcits T, seguits dels limfòcits B i els neutròfils en un rang similar (**Taula 20**).

Taula 20. Expressió relativa d'*IKZF1* en diferents subpoblacions cel·lulars de 3 controls sans

Població cel·lular	Control sa	Expressió relativa d' <i>IKZF1</i>	Mitjana
Limfòcits T	Control 7	5491,81	7.722,61
	Control 8	12430,84	
	Control 9	5245,17	
Limfòcits B	Control 7	2644,16	2.578,48
	Control 8	3204,89	
	Control 9	1886,40	
Neutròfils	Control 7	1379,92	2.285,85
	Control 8	1195,26	
	Control 9	4282,39	

S'estudien les poblacions limfocitàries dels tres subjectes de la família IDC100 amb els resultats observats a la **taula 21**. El tret característic que tenen en comú els 3 membres de la família és un augment del percentatge de limfòcits T CD3⁺. Aquest augment de limfòcits T, en el cas de la pacient IDC100-índex és a expenses d'una disminució dels limfòcits B CD19⁺ tant en percentatge com en valors absoluts. A més, la pacient índex presenta una disminució, tant de percentatge com de nombres absoluts de cèl·lules natural killer (NK). El fet que els limfòcits T siguin els que tenen una expressió gènica més elevada d'*IKZF1* i alhora sigui la població majoritària explicaria el fet que els tres subjectes d'aquesta família tinguin una expressió relativa d'*IKZF1* significativament més elevada comparada amb els individus control.

Taula 21. Poblacions limfocitàries (percentatge i nombres absoluts) de la família IDCV100.

Poblacions limfocitàries	IDCV100- index	Valors de Referència	IDCV100- mare	Valors de Referència	IDCV100- germà	Valors de referència
Neutròfils %	51,20	25 – 60	70,20	40 – 80	53,60	25 - 60
Limfòcits %	32,10	25 – 60	↓19,90	20 – 50	33,40	25 - 60
Monòcits %	↑11,00	3 – 8	8,70	2 – 11	↑10,10	3 – 8
Eosinòfils %	4,00	3 – 8	0,50	0 – 5	↓1,90	3 – 8
Basòfils %	↑1,70	0 – 1	0,70	0 – 2	1,00	0 - 1
Limfòcits T CD3 ⁺ %	↑95,25	63 – 82	↑84,11	55 – 83	↑78,50	61 - 77
Limfòcits T CD3 ⁺ x10 ⁹ /L	1,84	1,1 – 2,6	1,87	0,7 – 2,1	2,06	1,05 – 2,1
CD4 ⁺ CD3 ⁺ %	45,33	32 – 56	53,96	28 – 57	40,62	30 – 48
CD4 ⁺ CD3 ⁺ x10 ⁹ /L	0,87	0,57 – 1,57	1,20	0,3 – 1,4	1,06	0,57 – 1,38
CD8 ⁺ CD3 ⁺ %	28,83	20 – 32	27,72	10 – 39	29,53	18 – 31
CD8 ⁺ CD3 ⁺ x10 ⁹ /L	0,56	0,32 – 0,97	0,62	0,2 – 0,9	0,77	0,36 – 0,89
Limfòcits B CD19 ⁺ %	↓0,21	5 – 15	7,32	6 – 19	9,89	8 - 22
Limfòcits B CD19 ⁺ x10 ⁹ /L	↓0,00	0,12 – 0,42	0,16	0,1 – 0,5	0,26	0,16 – 0,58
CD56 ⁺ CD16 ⁺ CD3 ⁺ %	↓4,48	6 – 25	8,42	7 – 31	9,23	8 - 23
CD56 ⁺ CD16 ⁺ CD3 ⁺ x10 ⁹ /L	↓0,09	0,12 – 0,77	0,19	0,09 – 0,6	0,24	0,18 – 0,54
INDEX CD4/CD8	1,57	1 – 3,6	1,95	1,00 – 3,60	1,38	0,90 – 3,40

A més, en l'anàlisi del panell genètic de la pacient índex s'identifica una variant en heterozigosi que provoca un al·lel nul al gen *MBL2* (p.Arg52Cys), mentre que l'altre al·lel, tot i ser *wt*, presenta l'haplotip associat a baixa expressió.

Degut a la variant trobada al gen *MBL2* s'estudia la via de les lectines del complement i s'observa que la pacient presenta una activitat absent. Tant la mare com el germà també presenten la variant que provoca un al·lel nul i, mentre que la mare té l'haplotip d'alta expressió en l'al·lel *wt*, el germà té també l'haplotip associat a baixa expressió a l'al·lel *wt*. Tot i això, el germà mostra una activitat normal de la via de les lectines (**Taula 22**).

Taula 22. Resultats de la via de les lectines de la família IDCV100. La variant p.Arg52Cys (causant d'un al·lel nul) s'indica amb una D (en vermell). LXPA correspon a l'haplotip associat a més baixa expressió i HYPA al de més alta expressió.

	<i>Genotip MBL2</i>	<i>Activitat de la via de les lectines</i>	<i>Valors de referència</i>
IDCV100-index	HYPD / LXPA	↓ 0,78 %	10 – 125 %
IDCV100-germà	HYPD / LXPA	52,72%	10 – 125 %
IDCV100-mare	HYPD / HYPA	N/A	10 – 125 %

Tant la freqüència de les variants estructurals com els polimorfismes a *MBL2* varien entre els grups ètnics, cosa que dona lloc a set haplotips principals: HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC i HYPD. Les diferències en la distribució d'aquests haplotips són la causa principal de les variacions interracials en els valors sèrics de *MBL2*. Tant HYPA com LYQA són haplotips d'alta producció, LYPA haplotip de producció intermèdia i LXPA haplotip de baixa producció, mentre que LYPB, LYQC i HYPD són haplotips que causen al·lels nuls de *MBL2*. [93] (Figura 26)

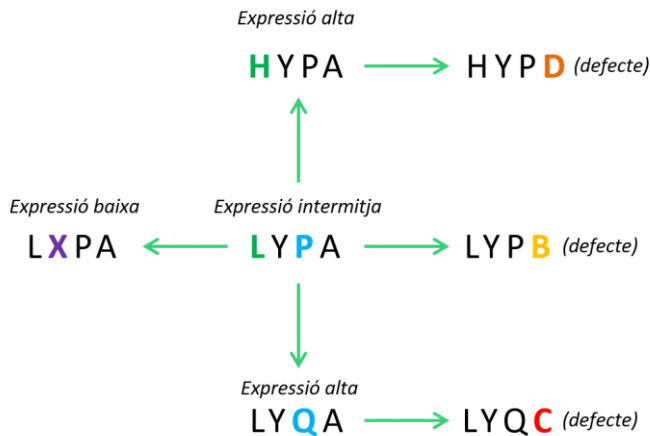


Figura 26. Model d'un possible arbre evolutiu del gen *MBL2*. Adaptat de [93].

5.7.2. *IDCV144*

Pacient de sexe masculí de 28 anys amb història d'otitis recurrents i sinusitis a la infància. També presenta pneumònies recurrents, onicofàgia, infecció del tracte urinari, migranyes i impetigen.

S'identifica una variant genètica a *IKZF1* en heterozigosi. Es tracta d'un canvi de nucleòtid que provoca un canvi d'aminoàcid a l'exó 5 del gen (c.484C>T / p.Arg162Trp). Aquesta variant té una freqüència poblacional nul·la (no es troba a les principals bases de dades com gnomAD o ExAC) i la majoria de predictors computacionals la consideren patogènica. La variant p.Arg162Trp afecta al domini d'unió a l'ADN i ja ha estat descrita anteriorment en pacients amb IDCV.[94,95] Per tot això, es classifica aquesta variant com a patogènica.

Els estudis de segregació familiar evidencien que la variant genètica en heterozigosi c.484C>T al gen *IKZF1* del pacient índex ha estat heretada del pare (Figura 27), el qual presenta diabetis mellitus de tipus II, valors baixos d'immunoglobulines (A, G i M), i valors disminuïts de limfòcits B preswitch memory (CD19⁺IgD⁺CD27⁺). La resposta vacunal no ha estat estudiada. El perfil de l'electroferograma de la seqüenciació Sanger del pare mostra que el pic corresponent a l'al·lel mutat està força disminuït respecte l'al·lel *wt*, la qual cosa ens fa pensar en un possible mosaïcisme (Figura 28).

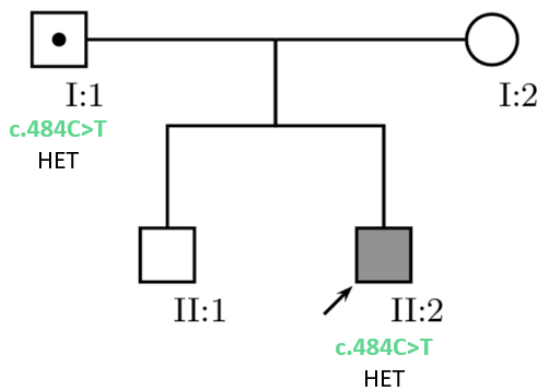


Figura 27. Arbre genealògic del pacient IDCV144.
En gris s'indica el pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors.

Per confirmar-ho, estudiem la presència de la variant genètica en mostres d'ADN del pare del pacient procedents de diferents cèl·lules i teixits: frotis bucal, orina, sang total, limfòcits CD3⁺ i limfòcits CD19⁺. Per obtenir una quantificació precisa i fiable utilitzem la seqüenciació d'amplicons a alta profunditat (DAS, de l'anglès *deep amplicon sequencing*), una tècnica de NGS que ens permet obtenir un elevat nombre de lectures de la nostra zona d'interès.

Els resultats obtinguts de la seqüenciació gènica massiva en els diferents llinatges cel·lulars, demostren una cobertura molt alta (>60.000x) per a cada tipus de mostra analitzada (**Figura 28**). La variant genètica p.Arg162Trp està present en un 41,02% de l'ADN dels limfòcits T CD3⁺, en un 30,57% de l'ADN de la sang total, en un 25,24% de l'ADN obtingut a partir de frotis bucal, en un 25,01% de l'ADN obtingut de la orina i en un 23,71% de l'ADN dels limfòcits B CD19⁺. El fet que la variant estigui present a totes les mostres analitzades, confirma que el pare presenta la variant en forma de mosaïcisme gonosòmic (**Figura 28**).

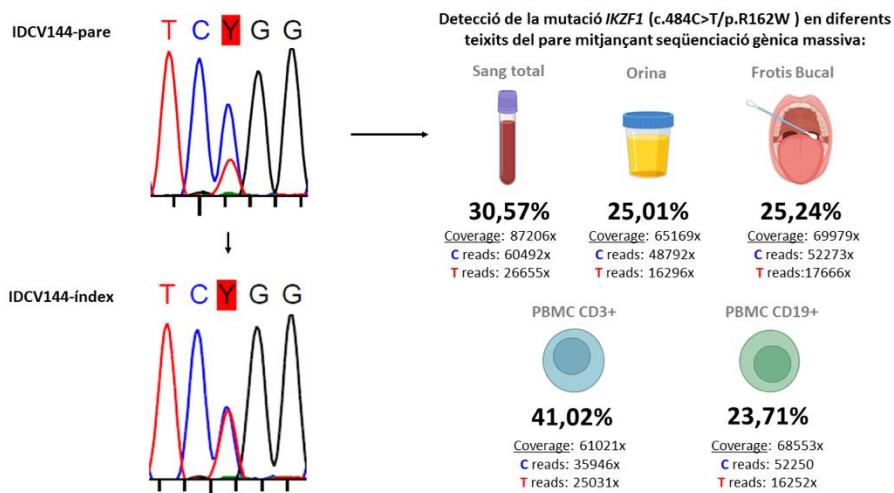


Figura 28. Identificació de la variant genètica a *IKZF1* (IKAROS) en el pacient IDCV144 (variant genètica germinal) i al seu pare (IDCV144-pare, variant genètica somàtica). A l'esquerra, els electroferogrames del pacient IDCV144-índex i IDCV144-pare. A la dreta, els resultats de la seqüenciació gènica massiva per la detecció de la variant genètica en vàris teixits del pare. S'indica la cobertura total (*coverage*), les lectures de cada al·lel (*reads*) i el percentatge de l'al·lel mutat per a cada mostra.

5.8. Variants genètiques a *IKBKG*

El gen *IKBKG* (*OMIM#300248*) es troba localitzat al cromosoma X (herència XL) i codifica per la proteïna NEMO (NF-kappa-B essencial modulator) també coneguda com a subunitat gamma de l'inhibidor del factor nuclear kappa-B. Variants patogèniques al gen *IKBKG* causen un tipus d'immunodeficiència combinada amb característiques associades o sindròmiques; ectodermodislàsia anhidròtica amb immunodeficiència (displàsia ectodèrmica, immunodeficiència) la qual cursa amb displàsia ectodèrmica anhidròtica (en alguns), infeccions recurrents, colitis, dents còniques, defectes variables de pell, cabells i dents i disfunció dels monòcits (*ORPHAcode#319612*). No obstant, variants genètiques a *IKBKG* poden donar una clínica molt variable en funció de la variant genètica. La entitat sense ectodermodislàsia és habitualment coneguda com a NEMO-ID (NEMO-immunodeficiència) i es caracteritza per presentar susceptibilitat a infeccions per micobacteris, infeccions bacterianes piògenes greus en els primers anys de vida i altres infeccions no bacterianes greus com; CMV, virus de l'herpes simple, virus *molluscum contagiosum*, malalties protozoàries, *Giardia lamblia*, infeccions fúngiques per *Candida albicans* i/o aftes prolongades. És a dir, que la NEMO-ID presenta una heterogeneïtat tant clínica com immunològica. [96]

Les dues variants trobades al gen *IKBKG* representen un 1,5% respecte a la cohort total, un 5,6% de respecte a total de variants genètiques trobades i un 8,3% respecte a les variants genètiques causals.

5.8.1. *IDCV017*

El pacient, un home de 65 anys, presenta una història d'otitis de repetició, síndrome diarreica, atrofia de vellositats intestinals i síndrome de malabsorció.

S'identifica una variant probablement patogènica al gen *IKBKG* (NEMO) (c.169G>A/p.E57K) en hemizigosi (*X-linked*). Tot i que la variant p.E57K és una variant reportada en pacients amb deficiència de NEMO, està considerada com a variant genètica hipomòrfica i per aquest motiu es decideix estudiar funcionalment

aquest cas. En els casos clàssics de deficiència en NEMO, s'observa una degradació d'IkBa absent. No obstant, el pacient no compleix criteris clínics ni analítics de deficiència en NEMO (displàsia òssia, defecte de NK, hiper IgM...).

S'estudien diferents proteïnes de la via NFκB del pacient mitjançant Western Blot, observant una fosforilació de p105 disminuïda respecte el control 657, però no absent, coincidint amb una menor degradació de l'inhibidor IkBa respecte el control. S'observa una correcta expressió de les proteïnes p105 i p50 així com del control de càrrega β-Actina. (Figura 29) L'estudi de citocines en sobrenedant a partir de l'estimulació de cèl·lules amb PMA+ionomicina durant 72h mostra que el pacient no té cap defecte en la capacitat de producció de les citocines estudiades. En alguns casos (IL-6, TNFα, IL-10) l'índex de producció (relació entre valors de citocines en condicions estimulades i sense estimular) es veu disminuït respecte als valors de referència, però això és degut a l'alt nivell de citocines que ja presenten les cèl·lules del pacient a nivell basal. Aquest increment a nivell basal també s'observa per IFNγ, IL-1β i sFAS-L, tot i que en aquests casos no es veu afectat el resultat de l'índex. En el cas de IL-12p70 i IL2Rα, on trobem valors basals dins els rangs de referència, observem un clar increment en la producció d'aquestes citocines al estimular les cèl·lules. (Taula 23)

A part d'aquest pacient amb variant genètica al gen *IKBKG*, dins de la cohort trobem una altra pacient amb variant genètica a *IKBKG* detallada més endavant a l'apartat 5.10.9 (pacient IDCV148) ja que forma part de la subcohort de pacients amb variants al gen *TNFRSF13B* (TACI).

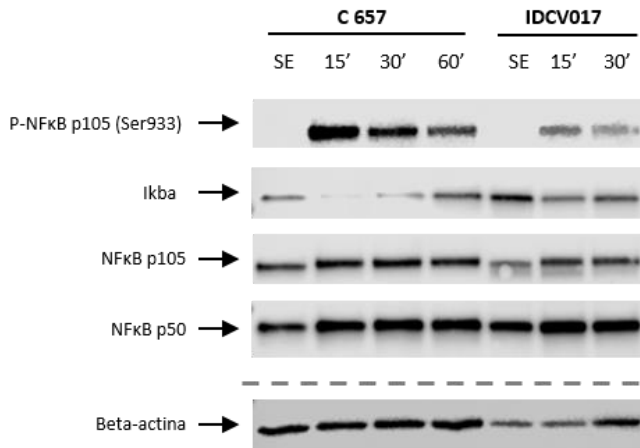


Figura 29. Western Blot del pacient IDCV017. PBMCs estimulades durant 0, 15, 30 i 60 minuts amb PMA [0,1 µg/mL] + IONO [2 µg/mL].

Taula 23. Resultats de la producció de citocines en sobredant del pacient IDCV017 en les condicions sense estimular (SE), estimulant i índex (E/SE).

		IDCV017	Valors de referència*	
			Límit inferior	Límit superior
IL-6	SE (pg/mL)	↑ 63,0	0,0	29,2
	E (pg/mL)	↑ 4746,0	1335,4	4224,8
	Índex	↓ 75,3	455,8	2524,1
TNFα	SE (pg/mL)	↑ 16,6	0,0	6,8
	E (pg/mL)	↑ 5800,0	2368,2	5167,8
	Índex	↓ 349,4	771,5	2524,9
IL-10	SE (pg/mL)	↑ 4,5	2,7	3,3
	E (pg/mL)	→ 49,9	39,1	157,1
	Índex	↓ 11,2	15,1	49,2
IFNγ	SE (pg/mL)	↑ 1,5	0,7	1,1
	E (pg/mL)	↑ 20000,0	4693,7	9030,4
	Índex	↑ 13245,0	5160,8	10171,1
IL-1β	SE (pg/mL)	↑ 4,5	0,0	2,7
	E (pg/mL)	↑ 683,0	0,0	67,1
	Índex	↑ 151,1	6,7	45,9
Fas-L	SE (pg/mL)	↑ 24,5	5,6	13,8
	E (pg/mL)	↑ 306,0	128,6	216,4
	Índex	→ 12,5	10,7	31,3
IL-12p70	SE (pg/mL)	→ 3,1	3,1	3,1
	E (pg/mL)	↑ 5,8	3,0	3,2
	Índex	↑ 1,9	0,98	1,03
IL-2ra	SE (pg/mL)	→ 16,4	16,4	16,4
	E (pg/mL)	↑ 2334,0	571,8	1618,8
	Índex	↑ 142,3	34,9	98,7

*Valors de referència interns obtinguts a partir de 12 donants sans adults (mitjana ± desviació estàndard)

5.9. Variants genètiques a *BTK*

El gen *BTK* (OMIM#300300) es troba localitzat al cromosoma X i codifica per la proteïna Bruton's Tyrosine Kinase, una quinasa que té un paper crucial en el desenvolupament de cèl·lules B (ORPHAcode#47). A la nostra cohort s'han detectat dues pacients femenines amb una variant genètica al gen *BTK*. L'agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X o malaltia de Bruton es caracteritza per presentar infeccions bacterianes greus i agammaglobulinèmia a causa d'absència total de limfòcits B.

Tot i ser un gen amb herència XL, no es pot descartar la seva implicació en dones que hagin patit una inactivació esbiaixada del cromosoma X. Takada *et al.* van descriure per primera vegada al 2004 el cas d'una nena de 10 mesos filla de pare amb malaltia de Bruton amb infeccions respiratòries freqüents i otitis mitjana. La nena presentava absència de cèl·lules B perifèriques i expressió absent de la proteïna BTK en monòcits. En aquest estudi es va identificar una variant patogènica al gen *BTK* i es va considerar causant de la patologia de la pacient després de demostrar que presentava una inactivació esbiaixada del cromosoma X (en el que es troba el gen *BTK*). [97]

5.9.1. IDCV022

Pacient de sexe femení de 70 anys. Presenta afectació a nivell respiratori (pneumònies i infeccions respiratòries recurrents, otitis recurrents, rinitis, hiperreactivitat bronquial, bronquièctasis i dispnea grau 1-2) així com també a nivell gastrointestinal (infecció per *Helicobacter pylori* i per *Campylobacter jejuni*, restrenyiment i diarrees amb canvis dietètics). A més, presenta conjuntivitis de repetició i dacriocistis. Com a altres manifestacions clíniques, la pacient va patir un limfoma de Hodgkin al maig del 2005 que va ser tractat amb quimioteràpia amb bona resposta. Els seus valors de limfòcits B són baixos però superiors a l'1-2% establerts com a llinar pel diagnòstic de malaltia de Bruton (**Taula 24**).

Mitjançant l'estudi d'NGS s'ha identificat una variant en heterozigosi al gen *BTK*. Es tracta d'un canvi de nucleòtid a l'exó 14 del gen (c.1252T>C) que provoca un canvi

d'aminoàcid (p.Y418H). És una variant de baixa freqüència poblacional (MAF=0,0002) i considerada com a patogènica per diversos predictors computacionals (tot i que una minoria la consideren benigna). La variant p.Y418H ha estat descrita en algun pacients amb agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X però amb expressió parcial de *BTK*. [98,99] La patogenicitat d'aquesta variant ha estat qüestionada i s'ha suggerit que podria ser una variant hipomòrfica amb penetrància incompleta. [100] Per tot l'exposat, classifiquem inicialment aquesta variant com a variant de significat incert (VUS). Com s'ha comentat anteriorment, existeixen casos de dones portadores de variants patogèniques a *BTK* que presenten manifestacions clíniques degut a un fenomen d'inactivació esbiaixada del cromosoma X, on s'ha inactivat preferentment el cromosoma X que porta l'al·lel *wt*. [97]

Per tal d'esbrinar si la variant identificada és la causa del fenotip clínic de la nostra pacient a través d'una inactivació esbiaixada del cromosoma X, decidim estudiar la representació dels dos al·lells en el ARNm de la pacient. Es realitza seqüenciació Sanger de l'exó 14 del gen *BTK* a partir del ADNc i s'observa que a l'ADN genòmic hi ha representats els dos al·lells, mentre que a l'ADNc només s'expressa l'al·lel mutat, evidenciant d'aquesta manera que la pacient IDCV022 presenta una inactivació esbiaixada del cromosoma X a favor de l'al·lel *wt* (els cromosomes amb l'al·lel *wt* estan inactivats) (**Figura 30**).

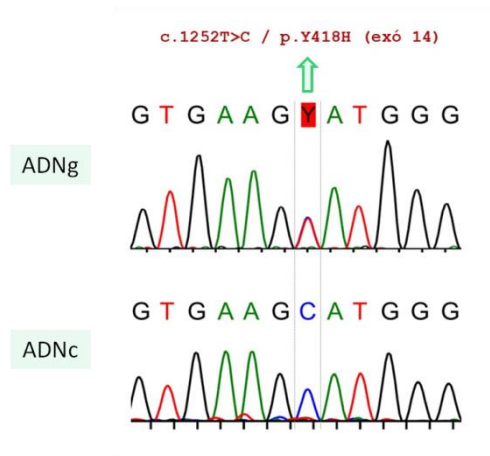


Figura 30. Electroferograma de la seqüenciació Sanger de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV022. Zona de la variant genètica c.1252T>C / p.Y418H. Y= C o T = Pirimidina.

Després d'aquest estudi, re-classifiquem la variant c.1252T>C/p.Y418H com a probablement patogènica. Com s'ha comentat anteriorment aquesta variant ha estat considerada una variant hipomòrfica amb penetrància incompleta. Probablement per aquest motiu la pacient expressa un fenotip compatible amb IDCV i no un fenotip clàssic de la malaltia de Bruton. [100]

5.9.2. IDCV038

Es tracta d'una pacient de sexe femení de 48 anys que només presenta afectació a nivell respiratori; pneumònies de repetició, alguna bronquitis aïllada sense febre amb múltiples opacitats nodulars pulmonars mal delimitades amb àrees en vidre desllustrat i dilatacions i engruiximents bronquials amb àrees d'atrapament aeri a la TC pulmonar. Presenta una limfòcits B disminuïts en nombre absoluts ($0,05 \times 10^9/L$) i en percentatge (5,66%) en relació a una disminució en el percentatge dels limfòcits B pre-canvi d'isotip de memòria, de canvi d'isotip de memòria i plasmablasts observats a l'immunofenotip limfocitari avançat (**Taula 24**).

S'identifica una variant genètica al gen *BTK* a la pacient. Es tracta d'un canvi de nucleòtid a l'exó 18 del gen (c.1787T>C) que provoca un canvi d'aminoàcid (p.M596T). És una variant de nul·la freqüència poblacional (absent a les principals bases de dades) i amb qualificació discordant entre els predictors computacionals (tot i que la majoria la consideren patogènica). No existeixen evidències funcionals sobre l'impacte d'aquesta variant i no està descrita a la literatura. Per tot l'exposat, classifiquem aquesta variant com a VUS.

Tenint en compte el diagnòstic d'IDCV de la pacient, no es pot descartar que aquesta variant tingui relació amb el fenotip clínic per un fenomen d'inactivació esbiaixada del cromosoma X. Per tal d'esbrinar si la variant identificada explicaria el seu fenotip clínic, es realitza seqüenciació Sanger de l'exó 18 del gen *BTK* de la pacient a partir d'ADNc per veure la representació dels dos al·lels.

Els resultats de la seqüenciació demostren que tant en l'ADN genòmic com en l'ADN complementari s'observen els dos al·lels (el *wt* i el mutat) de forma equivalent, fet que evidencia que en aquest cas no hi ha una inactivació esbiaixada del cromosoma X. És a dir, un 50% de cèl·lules expressen l'al·lel *wt* i l'altre 50% expressen l'al·lel amb la variant a *BTK* (**Figura 31**). L'estudi familiar mostra que els dos fills asimptomàtics de la pacient no presenten la variant a *BTK*.

Per tot l'exposat anteriorment, considerem a la pacient portadora d'una variant de significat incert o VUS (*variant of uncertain significance*) al gen *BTK* i per tant, l'excloem de la cohort de pacients amb variant genètica monogènica causant d'IDCV.

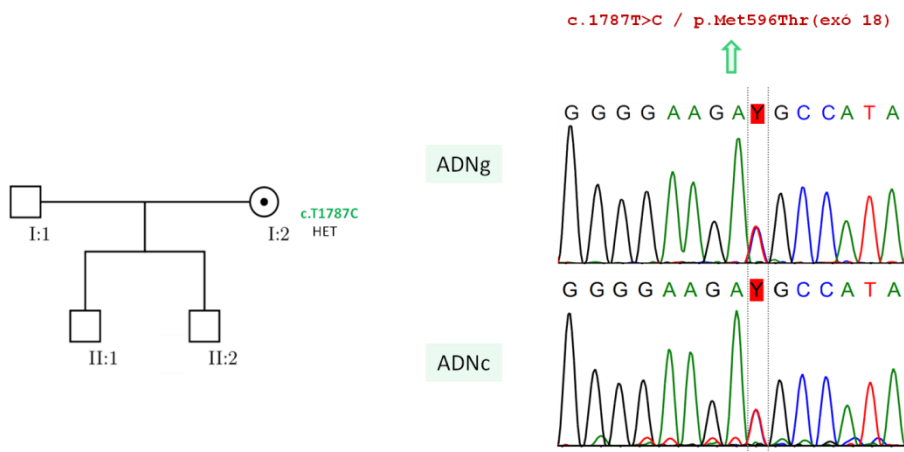


Figura 31. Electroferograma de la seqüenciació de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDCV038. A l'esquerra s'observa l'arbre familiar de la pacient i a la dreta els resultats de la seqüenciació Sanger. Y= C o T = Pirimidina.

A continuació, es mostren les poblacions limfocitaries de les pacients descrites en aquest apartat.

Taula 24. Poblacions limfocitàries de les pacients IDCV022 i IDCV038.

Poblacions limfocitàries	IDCV022	IDCV038	<i>Valors de referència</i>
Limfòcits totals (x10E9/L)	↓0,6	↓0,5	1,2-3,4
CD3 (Limfòcits T) %	63,99	79,75	55 – 83
CD3 (Limfòcits T)	↓0,4	↓0,37	0,7 – 2,1
CD4+ CD3+ (T col·laboradors)%	↓17,4	↑57,61	28 – 57
CD4 + CD3 + (T col·laboradors)	↓0,1	↓0,26	0,3 – 1,4
CD8+ CD3+ (T citotòxics) %	↑45,2	16,01	10 – 39
CD8+ CD3+ (T citotòxics)	0,3	↓0,07	0,2 – 0,9
CD19 (Limfòcits B) %	10,8	↓5,66	6 – 19
CD19 (Limfòcits B)	↓0,06	↓0,03	0,1 – 0,5
CD56+ CD16+ CD3- (NK) %	24,7	13,25	7 – 31
CD56+ CD16+ CD3- (NK)	0,14	↓0,06	0,09 – 0,6

Per tant, la única variant genètica trobada al gen *BTK* considerada com a probablement patogènica representa un 0,7% respecte a la cohort total, un 2,8% de respecte a total de variants trobades i un 4,2% respecte a les variants causals.

5.10. Variants genètiques a *TNFRSF13B* (*TACI*)

El gen *TNFRSF13B* (*OMIM#604907*) es troba al cromosoma 17 i les seves variants poden causar deficiència en *TACI*, amb una herència que pot ser AR o AD (*ORPHAcode#1572*). El gen, codifica per la proteïna *TACI* (Transmembrane Activator and CAML Interactor) la qual controla les respostes d'anticossos de cèl·lules B independents de les cèl·lules T, el canvi d'isotip i l'homeòstasi de les cèl·lules B. Variants mono- i bial·lèliques al gen *TNFRSF13B* (*TACI*) han estat àmpliament descrites en pacients amb IDCV, tot i que amb penetrància incompleta i expressivitat variable.[101,102] Per tot això la causalitat d'aquestes variants a *TACI* no està clara i en molts casos, especialment quan les trobem en heterozigosi, es consideren més com a variants de susceptibilitat a IDCV, mentre que les variants bial·lèliques -homozigotes i heterozigotes compostes- es consideren com a causants.

Els pacients amb deficiència a *TACI* presenten una clínica d'expressió variable tot i que la manifestació clínica més freqüent són les infeccions (majoritàriament respiratòries), seguida d'esplenomegàlia i limfadenopatia.[103]

En aquest treball, s'han trobat 18 pacients (13,2%) amb variants a *TACI*, les edats dels quals van des de 12 fins a 60 anys, amb una distribució de gènere equilibrada d'1:1. Dels 18 pacients, en 6 (33,34%) les variants a *TACI* s'han considerat causals (variants en homozigosi o heterozigotes compostes) i en 12 (66,67%) s'han considerat variants de predisposició (en heterozigosi) (**Taula 25**). Si ens fixem en la subcohort de variants genètiques causals, les edats van de 12 a 41 i la distribució de gènere és de 2:1 (home:dona).

Les principals manifestacions clíniques observades en els pacients amb variants genètiques a *TACI* de la cohort d'aquest treball són les infeccions recurrents del tracte respiratori (en un 88,9%), seguides de l'afectació funcional respiratòria (72,2%), afectació gastrointestinal (55,6%) i limfadenopaties (44, 4%).

Seguidament, es detallaran els 6 casos amb variants genètiques causals a *TNFRSF13B* i 1 cas amb contribució digènica.

Taula 25. Variants mono- i bial·lèliques trobades al gen TNFRSF13B (TACI).

<i>Pacient</i>	<i>Variant genètica ADN</i>	<i>Variant genètica proteïna</i>	<i>Freqüència poblacional gnomAD (MAF, minor allele frequency)</i>	<i>Tipus</i>	<i>Zigositat</i>	<i>Predictors computacionals</i>	<i>Prèviament descrita en IDCV</i>	<i>PMID</i>
IDCV012	c.512T>G	p.L171R	0,0001	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[58,104]
IDCV053	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Homozigosi	Patogènica	Sí	[104–106]
IDCV062	c.62-1G>A	-	0,00002	Afecta el lloc acceptor d'splicing de l'intró 1	Heterozigosi	Patogènica	No	-
IDCV066	c.266G>A	p.C89Y	0,00001	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[107]
IDCV069	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Heterozigosi composta	Patogènica	Sí	[104–106]
	c.542C>A	p.A181E	0,005	Canvi d'aa		Prediccions discordants	Sí	[101,102,104]
IDCV074	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[104–106]
IDCV075	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[104–106]
IDCV078	c.515G>A	p.C172Y	0,0002	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[104,108]
IDCV095	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Homozigosi	Patogènica	Sí	[104–106]
IDCV097	c.260T>A	p.I87N	N.D.	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[104]
IDCV102	c.236A>G	p.Y79C	0,0002	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[104,109]
IDCV107	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Heterozigosi	Patogènica	Sí	[104–106]



RESULTATS

IDCV122	c.109G>C	p.E37Q	0,000008	Canvi d'aa	Heterozigosi	VUS	No	-
IDCV126	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Homozigosi	Patogènica	Sí	[104–106]
IDCV131	c.605G>A	p.R202H	0,0008	Canvi d'aa	Heterozigosi	VUS	Sí	[101,102]
IDCV145	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa	Heterozigosi composta	Patogènica	Sí	[104–106]
	c.512T>G	p.L171R	N.D.	Canvi d'aa		Patogènica	Sí	
IDCV147*	c.542C>A	p.A181E	0,005	Canvi d'aa	Heterozigosi composta	Prediccions discordants	Sí	[101,102,104]
	c.310T>C	p.C104R	0,004	Canvi d'aa		Patogènica	Sí	[104–106]
IDCV148 [‡]	c.61+2T>A	-	-	Afecta el lloc donador d'splicing de l'intró 1	Heterozigosi	Patogènica	No	-

aa. aminoàcid, N.D. No disponible, VUS variant de significat incert, *També presenta una variant a NFKBI, [‡]També presenta una variant a IKBKG.

5.10.1.IDCV053

La pacient és una dona de 41 anys que presenta infeccions de repetició de vies altes superiors recurrents acompanyades també de clínica digestiva amb una clínica *sprue-like* (entitat que es caracteritza per símptomes gastrointestinals que inclouen diarrea en combinació amb troballes histològiques d'arquitectura vil·losa anormal de l'intestí prim).

L'estudi genètic realitzat ha identificat una variant en homozigosi al gen *TNFRSF13B* (TACI): c.310T>C/p.C104R.

L'estudi genètic familiar de la pacient ha evidenciat que cada progenitor porta la variant genètica p.C104R en heterozigosi i el seu germà és també homozigot per la variant genètica (Figura 32). El germà, de 45 anys, presentava amigdalitis de repetició des de la infància, i actualment presenta 2-3 infeccions respiratòries/any que requereixen tractament antibiòtic. Actualment no rep tractament substitutiu amb gammaglobulines per presentar uns valors d'IgG dins dels rangs de normalitat, amb una TC toràcica normal i una resposta vacunal normal a *Haemophilus influenzae b* i a *Streptococcus pneumoniae* i alterada a *Salmonella typhi*.

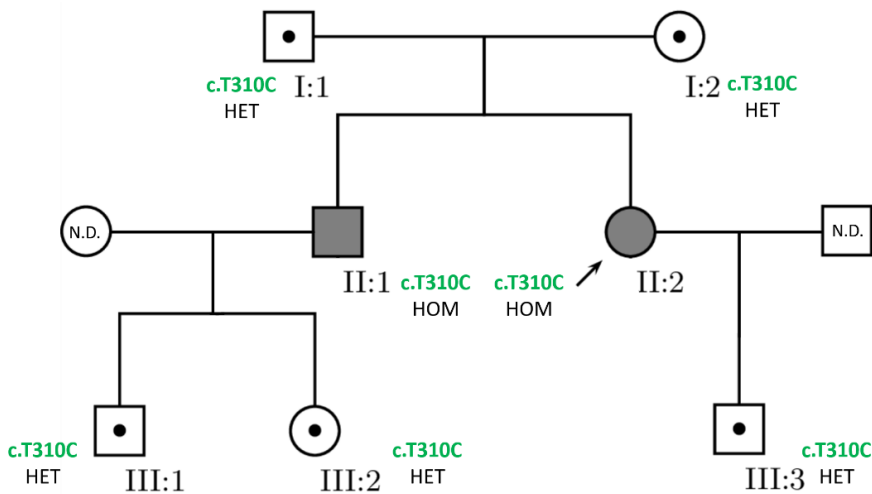


Figura 32. Arbre genealògic de la pacient IDCV053.
En gris s'indica els pacients afectes, la fletxa indica la pacient index i el punt els familiars portadors. N.D.: no disponible.

5.10.2.IDCV069

Es tracta d'un pacient masculí de 31 anys que presenta quadres gastrointestinals i infeccions respiratòries altes i baixes de repetició des de la infància amb valors baixos d'IgG pel que va iniciar tractament amb gammaglobulines inespecífiques des dels 6 mesos de vida. L'evolució de la malaltia és correcta sense infeccions intercurrents significatives ni bronquièctasis tot i presentar valors d'IgG en el límit inferior de la normalitat per una mala adherència al tractament.

En l'estudi genètic s'han identificat dues variants en heterozigosi al gen *TAC1*: c.310T>C/p.C104R i c.542C>A/p.A181E. Amb l'anàlisi de les dades obtingudes no es pot determinar si les dues variants estan en *cis* o en *trans* ja que l'estudi genètic familiar no s'havia realitzat en el moment d'escriptura d'aquesta tesi doctoral.

5.10.3.IDCV095

El pacient és un noi de 13 anys amb otitis de repetició des de la infància, lleu trastorn obstructiu a les proves funcionals respiratòries, manifestacions gastrointestinals i hipogammaglobulinèmia amb mala resposta vacunal pel que actualment rep tractament substitutiu amb gammaglobulines i es troba asimptomàtic.

L'estudi genètic realitzat al pacient ha identificat una variant en homozigosi al gen *TNFRSF13B* que provoca un canvi d'aminoàcid: c.310T>C/p.C104R.

L'estudi familiar mostra que ambdós progenitors són portadors de la variant c.310T>C/p.C104R en heterozigosi, de la mateixa manera que el seu germà (**Figura 33**). Cap d'ells presenta cap manifestació clínica rellevant. No obstant, el germà presenta uns valors disminuïts d'IgG i d'IgM i el pare uns valors disminuïts d'IgG i IgA. Ambdós compleixen 2/5 criteris de la ICON-2015 i per tant, poden ser classificats dins el grup d'IDCV. Tenint en compte que ambdós són portadors d'una variant en heterozigosi caldria pensar en una possible contribució d'altres factors genètics no identificats en el moment d'escriptura d'aquest treball.

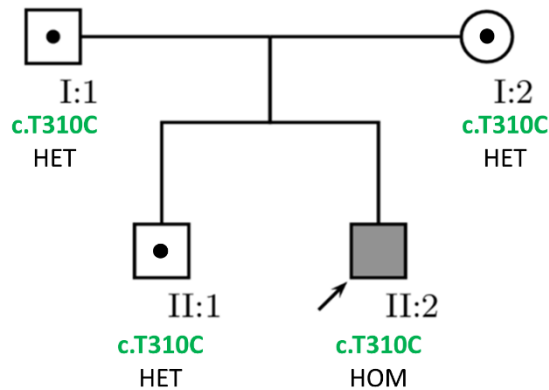


Figura 33. Arbre genealògic del pacient IDCV095.
En gris s'indica el pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors.

5.10.4.IDCV126

Es tracta d'un pacient de sexe masculí de 12 anys que presenta gastroenteritis i otitis de repetició a la infància que han requerit col·locació de drenatges transtimpànics. En el moment de redacció d'aquest treball, el pacient creix amb normalitat i no té infeccions clínicament significatives.

L'estudi genètic realitzat al pacient ha identificat una variant en homozigosi al gen *TNFRSF13B*: c.310T>C/p.C104R.

5.10.5.IDCV145

Es tracta d'un pacient de sexe masculí de 17 anys amb historial d'infeccions recurrents de vies altes (bronquitis i otitis) i infeccions d'orina associades a reflux vesicoureteral bilateral i atròfia renal esquerra, amb hipertròfia funcional compensatòria de ronyó dret.

L'estudi genètic realitzat al pacient ha identificat dues variants en heterozigosi al gen *TNFRSF13B*: c.310T>C/p.C104CR i c.512T>G/p.L171R. Ambdues variants estan considerades com a patogèniques pels predictors.

Els estudis de segregació de les variants trobades al gen *TNFRSF13B* han pogut demostrar que cada una de les variants prové d'un dels progenitors (pare c.512T>G, mare c.310T>C) fet que demostra que les dues variants genètiques estan en *trans* en el pacient, confirmant l'estat d'heterozigot compost. El germà ha heretat la variant en heterozigosi c.512T>G del pare, i la germana la variant en heterozigosi c.310T>C de la mare (**Figura 34**). Cap d'ells mostra clínica rellevant en excepció de la mare, que presenta dermatitis atòpica i múltiples al·lèrgies. A nivell analític, només el pare presenta una lleugera disminució de la IgM.

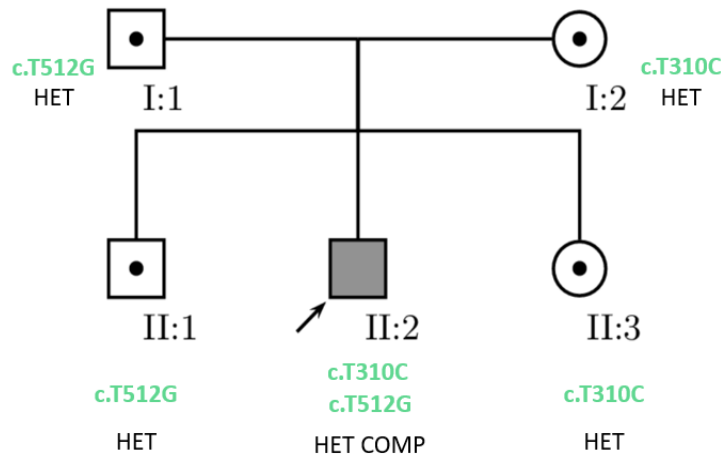


Figura 34. Arbre genealògic del pacient IDC145.
 En gris s'indica el pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors.

5.10.6.IDCV147

Es tracta d'una pacient de sexe femení de 17 anys amb bronquitis i pneumònies de repetició al llarg de la infància. Presenta hipogammaglobulinèmia i una TC pulmonar patològica amb bronquiectasis post-infeccioses que es normalitzen a *posteriori*.

S'han identificat dues variants en heterozigosi al gen *TNFRSF13B*: c.310T>C/p.C104R, i c.542C>A/p.A181E.

L'estudi genètic familiar mostra que la mare és portadora en heterozigosi de la variant c.C542A/p.A181E i el pare és portador en heterozigosi de la variant c.T310C/p.C104R fet que demostra que les dues variants genètiques estan en *trans* en la pacient, confirmant l'estat d'heterozigot compost. (Figura 35)

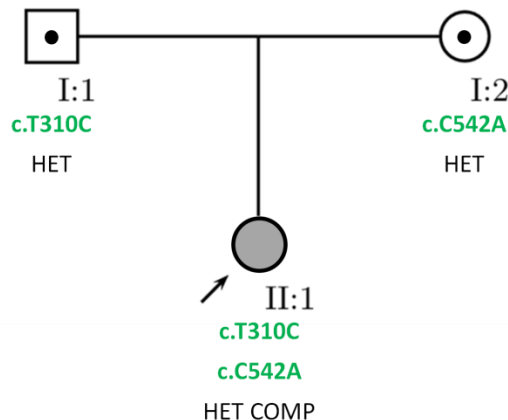


Figura 35. Arbre genealògic de la pacient IDCV147.

En gris s'indica la pacient afecte, la fletxa indica el pacient índex i el punt els familiars portadors.

A més, en aquesta pacient s'ha identificat una variant en heterozigosi al gen *NFKB1*: c.670A>G/p.S224G. És una variant de freqüència poblacional nul·la (no present a les principals bases de dades poblacionals) i els predictors computacionals tenen classificacions discordants, tot i que la majoria la consideren benigna. La variant es troba al domini RHD de la proteïna, on es troben la majoria de variants patogèniques identificades. La majoria de variants descrites són clarament loss-of-function (LOF)

tot i que també hi ha algunes *missense*. [84] La variant p.S224G no es troba descrita en cap publicació i no existeixen evidències del seu possible impacte funcional. Per tot això classifiquem aquesta variant com a variant de significat incert (VUS). Per tal d'estudiar l'efecte d'aquesta variant en la funcionalitat de la via NF-κB en la pacient, i atès que no es troba descrita a cap publicació, es decideix estudiar funcionalment aquest cas.

S'estudien diferents proteïnes de la via NFκB de la pacient mitjançant Western Blot, observant una expressió normal de p105, p50 i fosfo-p105. També s'observa una degradació d'IκBα normal en comparació amb els controls sans així com del control de càrrega β-Actina (**Figura 36**). L'estudi de citocines en sobrenedant a partir de l'estimulació de cèl·lules amb PMA+ionomicina durant 72h mostra una producció de citocines normal pel que fa a TNF-α i IFNγ, una producció augmentada d'IL-6, IL-10, IL-1β i IL-2ra, i una producció disminuïda de Fas-L en comparació amb els valors de referència interns (**Taula 26**). Amb tot, es demostra que la primera part de la via de senyalització NF-κB funciona correctament i que no existeix un defecte en la producció de citocines. Amb els resultats obtinguts no es pot atribuir un paper a la variant de *NFKB1*, consistent amb els resultats de Li *et al.* on testen bioquímicament una variant a la mateixa posició (tot i que un canvi diferent; p.S224N) i demostren que és neutral. [110] Per tant, es conclou que en aquest cas la IDCV es deu a la variant heterozigota composta a TACI.

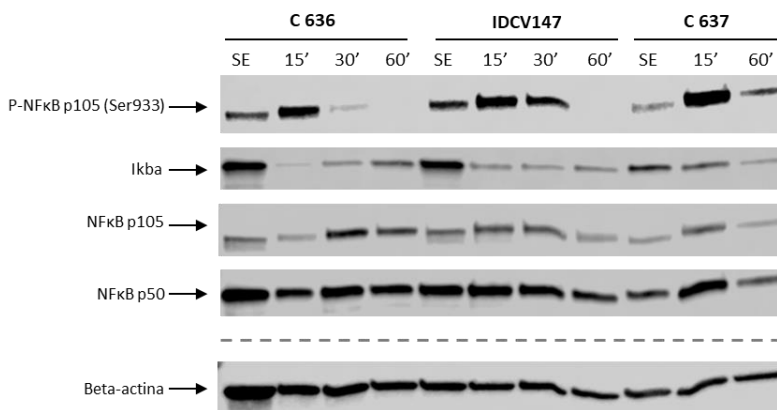


Figura 36. Western Blot de la pacient IDCV147. PBMCs estimulades durant 0, 15, 30 i 60 minuts amb PMA [0,1 µg/mL] + IONO [2 µg/mL].

Taula 26. Resultats de la producció de citocines en sobrenedant de la pacient IDCV147 en les condicions sense estimular (SE), estimulant i índex (E/SE).

		IDCV147	Valors de referència*	
			Limit inferior	Limit superior
IL-6	SE (pg/mL)	⇒ 1,6	0,0	29,2
	E (pg/mL)	↑ 5143,0	1335,4	4224,8
	Índex	↑ 3318,1	455,8	2524,1
TNFα	SE (pg/mL)	⇒ 2,6	0,0	6,8
	E (pg/mL)	↑ 5628,0	2368,2	5167,8
	Índex	⇒ 2139,9	771,5	2524,9
IL-10	SE (pg/mL)	⇒ 2,9	2,7	3,3
	E (pg/mL)	↑ 277,0	39,1	157,1
	Índex	↑ 95,5	15,1	49,2
IFNγ	SE (pg/mL)	⇒ 0,9	0,7	1,1
	E (pg/mL)	⇒ 8621,0	4693,7	9030,4
	Índex	⇒ 10142,4	5160,8	10171,1
IL-1β	SE (pg/mL)	⇒ 0,8	0,0	2,7
	E (pg/mL)	↑ 76,2	0,0	67,1
	Índex	↑ 95,3	6,7	45,9
Fas-L	SE (pg/mL)	↓ 5,2	5,6	13,8
	E (pg/mL)	↓ 55,7	128,6	216,4
	Índex	↓ 10,6	10,7	31,3
IL-2ra	SE (pg/mL)	⇒ 16,4	16,4	16,4
	E (pg/mL)	↑ 1976,0	571,8	1618,8
	Índex	↑ 120,5	34,9	98,7

*Valors de referència interns obtinguts a partir de 12 donants sans adults (mitjana ±desviació estàndard)

5.10.7.IDCV148

Es tracta d'una dona de 46 anys amb antecedents de pneumònies i infeccions respiratòries de repetició amb bronquièctasis a la TC i colonització respiratòria per *S. pneumoniae*, juntament amb sinusitis de repetició a la infància. A més, presenta gastroenteritis de repetició per *Campylobacter jejuni* i per *Salmonella* spp. També presenta múltiples adenopaties, hiperplàsia nodular regenerativa hepàtica amb hipertensió portal secundària, pancitopènia i manifestacions gastrointestinals amb estudis d'endoscòpia i biòpsia normals.

Mitjançant l'estudi genètic a la pacient, s'ha identificat una variant en heterozigosi al gen *TNFRSF13B*: c.61+2T>A (rs760885614). Aquesta variant afecta el lloc donador d'*splicing* de l'intró 1 del gen. És una variant de freqüència poblacional nul·la i no està descrita a la literatura. Considerem aquesta variant com una variant de pèrdua de funció i la classifiquem com a patogènica.

També s'ha identificat una variant en heterozigosi (X-linked) al gen *IKBKG* (c.G169A/p.E57K). Aquesta variant (rs148695964) té una freqüència poblacional baixa (MAF=0,001) i la majoria de predictors computacionals la consideren patogènica. Aquesta variant ha estat reportada en pacients amb deficiència de NEMO però amb fenotips més lleus a l'habitual.[111–113] L'efecte funcional d'aquesta variant ha estat reportat en diversos articles i confirma la condició de variant genètica hipomòrfica.[114,115] S'han reportat casos de portadors asimptomàtics, per la qual cosa la penetrància és incompleta. Per tot l'exposat considerem aquesta variant com a probablement patogènica. En aquest cas, la pacient és portadora de la variant en heterozigosi i com que el model d'herència descrit és lligat al cromosoma X i recessiu, es consideraria com a portadora asimptomàtica. La pacient, no presenta cap característica típica dels pacients amb deficiència a NEMO, excepte una disminució en els nombres absoluts de cèl·lules NK.

Pel que fa a la variant trobada a *TNFRSF13B* (TACI) (c.61+2T>A) és una variant genètica que afecta el lloc donador d'*splicing* i com que no hi ha evidència del seu efecte concret sobre aquest procés, decidim estudiar-ho. Per això, estudiem l'ADNc de la pacient amplificant-lo amb una parella d'oligonucleòtids situats a l'exó 1 i 3. A la imatge del gel d'electroforesi s'observen dues bandes (**Figura 37A**). La nostra hipòtesi és que es tracta del transcrit complet (una banda de 373 pb) i d'una isoforma sense l'exó 2 (isoforma $\Delta 2$, de 200 pb aproximadament). Cal dir que en 3 mostres utilitzades com a control aquestes dues bandes també s'observen, tot i que amb una distribució diferent. Per la intensitat de banda observada, i fent una quantificació aproximada, els controls les tenen distribuïdes en una relació 80% (completa) - 20% (isoforma $\Delta 2$). En canvi, la pacient presenta una relació 50%-50%, és a dir, té menys quantitat d'isoforma completa i més representació de la isoforma $\Delta 2$ (**Figura 37A**).

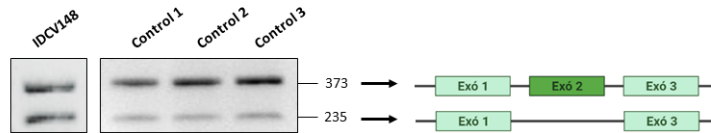
Revisant la literatura confirmem que, de forma fisiològica, el gen *TNFRSF13B* genera la isoforma $\Delta 2$ per *splicing* alternatiu.[116,117]

Per confirmar els productes de les dues bandes seqüenciem amplimers de *TNFRSF13B* de la pacient i de les mostres controls. En les imatges de l'electroferograma, es confirma la nostra hipòtesi sobre la manca de l'exó 2 a la banda de menor pes molecular. Al començar a llegir la seqüència de l'electroferograma d'esquerra a dreta, s'observa un sol pic de fluorescència, és a dir, un sol nucleòtid a cada posició. A partir d'un cert moment, (entre l'exó 1 i l'exó 2) es percep una seqüència amb doble pic. En el cas de la mostra control, el pic més representat correspon a la seqüència de l'exó 2, i el pic menys representat correspon a la seqüència de l'exó 3, és a dir, és la isoforma $\Delta 2$. En el cas de la pacient, passa el mateix; a l'inici de la seqüència es veu un sol pic de fluorescència corresponent a l'exó 1 i a partir d'un cert moment (entre l'exó 1 i l'exó 2) passem a veure una seqüència amb doble pic. No obstant, en aquest cas, el pic més representat (més alt) correspon a la seqüència de l'exó 3 (isoforma $\Delta 2$), i el pic menys representat (el més petit) correspon a l'exó 2 (isoforma completa). Això és així ja que la pacient té un al·lel *wt* (que generarà la forma completa + isoforma $\Delta 2$) i un al·lel amb la variant genètica c.61+2T>A que només produirà la isoforma $\Delta 2$ (**Figura 37B**).

Pel que fa a la variant genètica trobada al gen *IKBKG* (NEMO) (c.G169A/p.E57K), plantegem la hipòtesi de que pugui tenir algun paper en la clínica de la pacient en el cas de que hi hagi una inactivació esbiaixada del cromsoma X. En una aproximació similar a la realitzada en les pacients amb variants a *BTK*, amplifiquem i seqüenciem l'exó 2 del gen *IKBKG* a partir de l'ADNc de la pacient i analitzem la contribució dels 2 al·lells. Observem que en la posició de la variant hi ha un doble pic (concordant amb el genotip de la pacient) però amb representació desigual: el pic corresponent a l'al·lel amb la variant alternativa representa aproximadament el 75% de la senyal i el pic *wt* el 25%. Això indicaria que hi ha hagut un fenomen d'inactivació del cromosoma X esbiaixada. Es seqüencia també l'ADN genòmic com a control per a comprovar que s'observen dos pics en igual proporció (**Figura 38**).

Aquest cas seria un exemple d'una possible contribució digènica en IDCV (*TNFRSF13B* + *IKBK*), aprofundint en la idea que les variants heterozigotes a TACI necessiten d'altres factors (genètics, epigenètics, etc.) per causar una clínica d'IDCV.

A.



B.

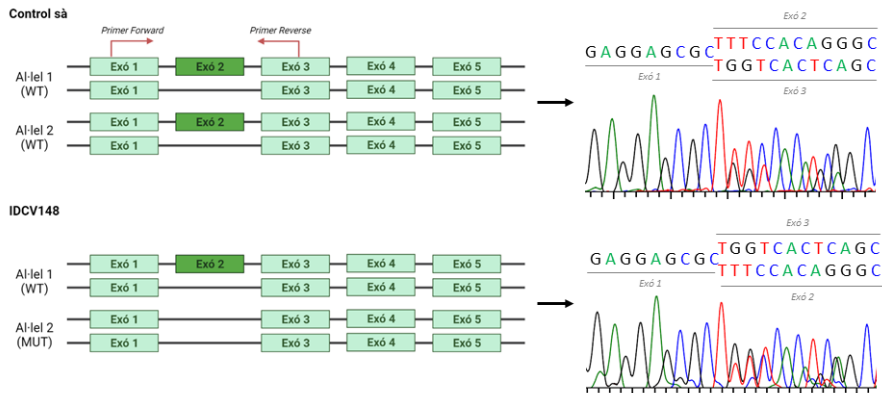


Figura 37. Estudis moleculars del gen *TNFRSF13B* a la pacient IDCV148.

A. Gel d'electroforesi de l'amplificació dels exons 1 al 3 del gen *TNFRSF13B*.

B. Representació esquemàtica dels exons del gen *TNFRSF13B* i el resultat de la seqüenciació Sanger.

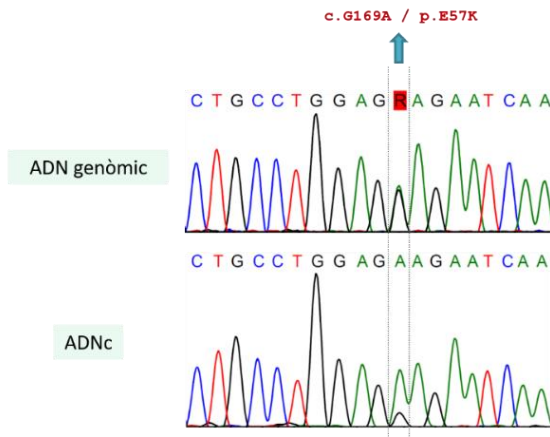


Figura 38. Electroferograma de la seqüenciació de l'ADN genòmic i de l'ADN complementari de la pacient IDC148 on es mostra la variant c.G169A / p.E57K del gen *IKBKG*. R = A o G.

6. MODIFICACIÓ DEL PLA TERAPÈUTIC A PARTIR DEL DIAGNÒSTIC GENÈTIC

De tots els pacients amb diagnòstic genètic considerat com a causal se n'han detectat 8 (33%) subsidiaris a rebre un tractament específic i dirigit que permeti millorar el pronòstic del pacient, més enllà de l'administració de gammaglobulines inespecífiques. D'aquests, 5 pacients l'han rebut, 3 d'ells amb resposta completa i parcial en els altres dos (Taula 27, Figura 39).

Taula 27. Resum dels pacients que s'han pogut veure beneficiats d'un tractament dirigit.

Pacient	Gen afectat	Tractament	Resposta clínica a fàrmac	TPH	Resultat a TPH
IDCV077	<i>LRBA</i>	Abatacept	Resposta favorable	No	N/A
IDCV080	<i>PIK3R1</i>	Sirolimus	Resposta parcial/toxicitat	No	N/A
IDCV093	<i>LRBA</i>	Abatacept	N/A (diagnòstic genètic post-mortem)	Si	No favorable
IDCV105	<i>CTLA4</i>	Abatacept	Resposta favorable	No	N/A
IDCV106	<i>PIK3R1</i>	Seletalisib	Resposta parcial i toxicitat	Si	Favorable
IDCV109	<i>LRBA</i>	Abatacept	N/A (no administrat per clínica lleu)	No	N/A
IDCV116	<i>PIK3R1</i>	Sirolimus	Resposta favorable	No	N/A
IDCV128	<i>DKC1</i>	TPH	N/A	No (no realitzat per clínica lleu)	N/A

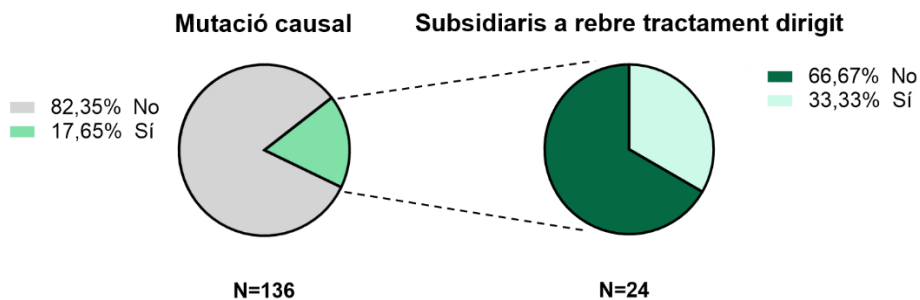


Figura 39. Distribució dels pacients de la cohort subsidiaris a rebre tractament dirigit.

7. MODEL PREDICTOR DE FORMES MONOGENÈTIQUES D'IDCV

Amb l'objectiu de determinar en quins pacients s'ha de prioritzar l'estudi genètic per motius d'eficiència assistencial si és necessari es realitza un estudi de factors predictors de defectes monogènics en IDCV. L'avaluació del potencial model es realitza incloent tant totes les variants trobades (causals i d'associació) com només les variants causals (**taula 28**).

Taula 28. Resum de l'anàlisi bivariada de l'estudi amb totes les variants genètiques trobades, i de l'estudi amb només les variants genètiques causals.

<i>Variant genètica (Si/No)</i> <i>Vs:</i>	<i>Variants causals+modificadores</i>		<i>Variants causals</i>	
	<i>P-Value</i>	<i>Test</i>	<i>P-Value</i>	<i>Test</i>
Gènere	0,384	KQ	0,094	KQ
Edat (quantitativa)	0,007*	MW	0,006*	MW
Edat (2 categories)	<0,001*	KQ	0,006*	KQ
Edat inici símptomes (quantitativa)	0,061	MW	0,004*	MW
Edat inici símptomes (2 categories)	0,323	KQ	0,026*	KQ
Consanguinitat	0,569	EF	1	EF
Ètnia	1	EF	0,429	EF
Antecedents familiars d'IEI	0,496	KQ	0,616	KQ
Infeccions respiratòries recurrents	0,951	KQ	0,406	KQ
Limfoproliferació	0,037*	KQ	0,439	KQ
Autoimmunitat	0,818	KQ	0,895	KQ
Afectació pulmonar	0,631	KQ	0,587	KQ
Afectació gastrointestinal	0,724	KQ	0,446	KQ
Neoplàsies	0,749	KQ	0,787	KQ
Infecció	0,325	LR- KQ	0,064	LR-KQ
Score (categòrica)	0,327	EF	0,589	EF
Nadir d'IgG	0,252	KQ	0,366	KQ
IgA↓	0,784	KQ	0,200	KQ
IgM↓	0,472	KQ	0,374	KQ
IgA↓ i IgM↓	0,574	KQ	0,834	KQ
Limfòcits B	0,645	KQ	0,104	KQ
Limfòcits B de canvi d'isotip	0,903	KQ	0,360	KQ
Limfòcits B de transició	0,025*	KQ	0,003*	KQ
Cèl·lules CD21low	0,317	KQ	0,690	KQ
Fenotip de cadenes lleugeres	0,351	LR- KQ	0,823	LR-KQ
Ratio de cadenes lleugeres	0,515	LR- KQ	0,300	LR-KQ
Suma de cadenes lleugeres	0,830	KQ	0,439	KQ

* estadísticament significatiu ($p < 0,05$), EF: Exacte de Fisher, KQ: Khi-quadrat, MW: Mann-Whitney, LR-KQ: Likelihood Ratio Khi-Square (Relació de probabilitat Khi-quadrat)

Seguidament, s'indiquen les taules de contingència (amb percentatges) o les taules amb mitjanes +/- desviació estàndard per a les variables significatives corresponents a l'estudi realitzat a partir de les variants causals:

7.1. Edat (quantitativa)

S'observen diferències estadísticament significatives segons l'edat (p -valor=0,006). Els pacients que tenen variants genètiques són més joves (27 anys de mediana) que els que no es troba variant genètica causal (42 anys de mediana) (**Taula 29, Figura 40**).

Taula 29. Mitjanes +/- desviació estàndard per a la variable edat (quantitativa) enfrontada a la variable variant genètica.

Variant genètica	N	Mitjana	Mediana	DesvEst	Min	Max
No	113	44,12	42,00	17,65	13,00	81,00
Sí	23	32,48	27,00	17,82	11,00	70,00
Total	136	42,15	41,00	18,14	11,00	81,00

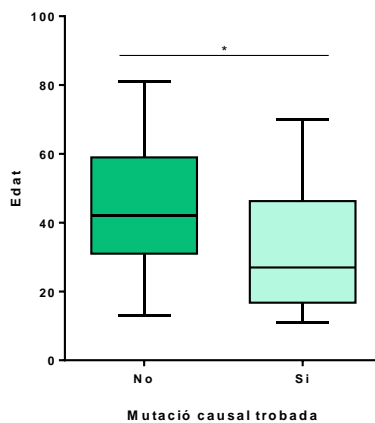


Figura 40. Implicació de l'edat en la probabilitat de trobar una variant genètica causal (p -value = 0,006).

De totes maneres, cal tenir present que l'edat dels pacients va ser recollida en el moment de realització de l'estudi, pel que, en tractar-se d'un estudi principalment transversal, l'edat quantitativa no té sentit incloure-la en el model predictiu.

7.2. Edat (2 categories)

S'observen diferències estadísticament significatives entre els dos grups d'edat (p -valor=0,006). La probabilitat de trobar una variant genètica causal és més elevada en els pacients pediàtrics (grup d'11 a 17 anys) que en els pacients adults (grup de 18+) (Taula 30, Figura 41).

Taula 30. Taula de contingència entre grup d'edat i variant genètica trobada.

Edat	Variant genètica trobada?				Total	
	No		Sí		N	%
	N	%	N	%	N	%
11-17	8	57,1%	6	42,9%	14	100%
18+	105	86,1%	17	13,9%	122	100%

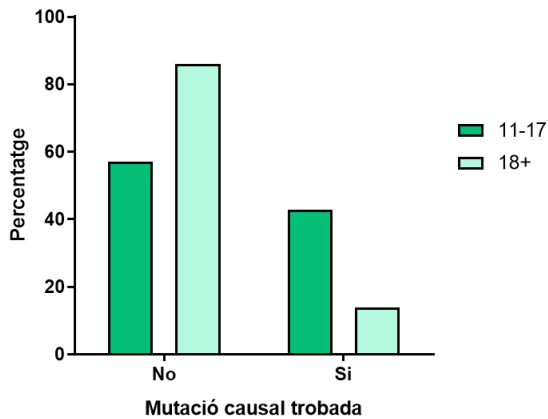


Figura 41. Implicació del grup d'edat en la probabilitat de trobar una variant genètica causal (p -value = 0,006).

Tot i que en aquest cas ens trobem en el mateix problema que en l'anterior variable, realitzant grups d'edats és una possible sol·lució per a diferenciar entre adults i pediàtrics habitualment atesos per professionals diferents. A més, tot i les diferències estadísticament observades, cal destacar que la n del grup 11-17 és molt baixa.

7.3. Edat inici de símptomes (quantitativa)

Per evitar el biaix de l'edat dels pacients en el moment de l'estudi, s'avalua l'inici de símptomes significativament associats al diagnòstic d'IDCV. S'observen diferències estadísticament significatives segons l'edat d'inici de símptomes (p -valor=0,004). Els pacients amb variants causals tenen un inici de símptomes més precoç (3 anys de mediana) en comparació amb els pacients sense variant genètica causal (8 anys de mediana) (Taula 31, Figura 42).

Taula 31. Mitjanes +/- desviació estàndard per a la variable edat d'inici de símptomes (quantitativa) enfrontada a la variable variant genètica

<i>Variant genètica trobada?</i>	<i>N</i>	<i>Mitjana</i>	<i>Mediana</i>	<i>DesvEst</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
No	112	15,81	8,00	15,95	0,25	68,00
Si	24	8,09	3,00	13,00	0,08	51,00
Total	136	14,50	6,00	15,72	0,08	68,00

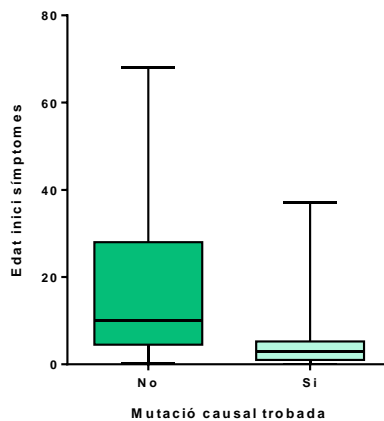


Figura 42. Implicació de l'edat d'inici de símptomes en la probabilitat de trobar una variant genètica causal (p -value = 0,004).

Cal tenir present, però, que en tractar-se d'un estudi retrospectiu i al ser molts dels pacients adults, aquesta dada pot estar esbiaixada i està sotmesa a la valoració clínica dels metges responsables.

7.4. Edat inici de símptomes (2 categories)

La probabilitat de trobar una variant genètica causal és més elevada en els pacients amb inici de la malaltia en edat pediàtrica que en els pacients amb inici de la malaltia en edat adulta (p-valor=0,026) (Taula 32, Figura 43).

Taula 32. Taula de contingència entre grup d'edat d'inici de símptomes i variant genètica trobada.

Edat inici símptomes	Variant genètica trobada?				Total	
	No		Sí		N	%
	N	%	N	%	N	%
0-17	72	77,4%	21	22,6%	93	100%
18+	40	93,0%	3	7,0%	43	100%

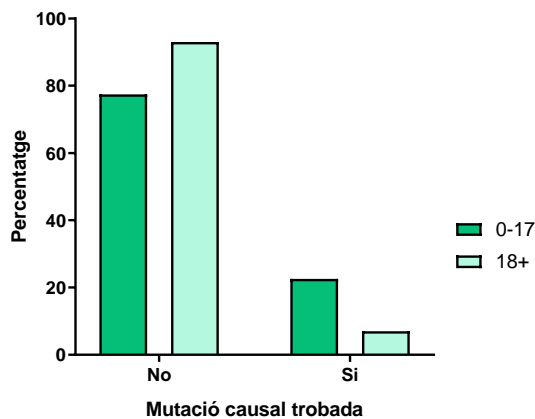


Figura 43. Implicació del grup d'edat d'inici de símptomes en la probabilitat de trobar una variant genètica causal (p-value = 0,026).

A més, els pacients amb un inici de la malaltia abans dels 5 anys tenen més probabilitats de tenir una mutació monogènica causal que els que debuten més enllà d'aquesta edat pel que s'estableix aquesta edat com a punt de tall. Considerant aquest punt de tall, el model tindria una sensibilitat del 70,8%, una especificitat del 61,6% i una AUC de 0,67.

7.5. Infecció

Es detecten diferències marginalment significatives entre els diferents subgrups d’“Infecció” (p-valor=0,064). La taula de contingència per la variable “Infecció” es pot veure a la **taula 33** i a la **figura 44**. Atesa la seva importància, es decideix incloure aquesta variable marginalment significativa a l’anàlisi multivariada.

Taula 33. Taula de contingència entre la variable “Infecció” i variant genètica trobada.

Infecció	Variant genètica trobada?				Total	
	No		Sí		N	%
0	11	100%	.	.	11	100%
1	3	100%	.	.	3	100%
2	99	81,1%	23	18,9%	122	100%

0; sense infeccions, 1; només infeccions, 2; infeccions i altres manifestacions clíniques.

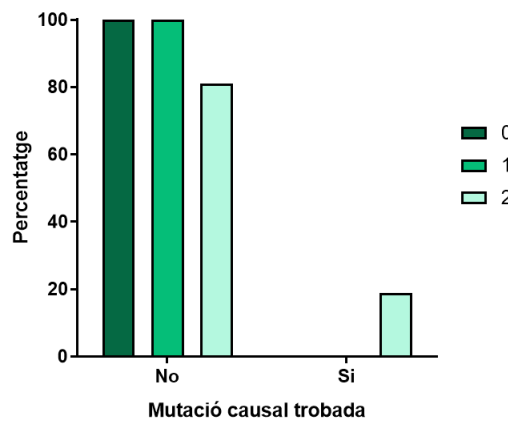


Figura 44. Implicació del fenotip clínic “Infecció” en la probabilitat de trobar una variant genètica causal (p-value = 0,064).

7.6. Limfòcits B de transició

S'observen diferències estadísticament significatives en funció del valor dels limfòcits B de transició (p -valor=0,003). Un 94,4% dels pacients als que hem trobat una variant genètica causal tenen els limfòcits B de transició elevats (B-Tr hi) (Taula 34, Figura 45).

Taula 34. Taula de contingència entre la variable “limfòcits B de transició” i variant genètica trobada.

Limfòcits B de transició	Variant genètica trobada?				Total	
	No		Sí		N	%
	N	%	N	%	N	%
BTr hi	48	73,8%	17	26,2%	65	100%
BTr norm	36	97,3%	1	2,7%	37	100%

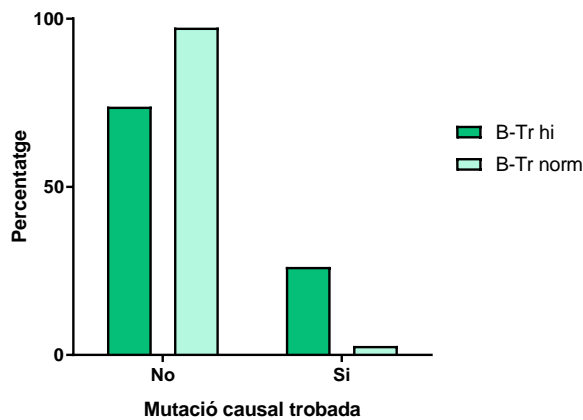


Figura 45. Implicació dels valors de limfòcits B de transició en la probabilitat de trobar una variant genètica causal (p -value = 0,003).

7.7. Model de regressió logística multivariant

A continuació es presenten els resultats del model de regressió logística multivariant en el que s'han inclòs totes les variables estadísticament significatives amb sentit clínic, incloent la variable "infecció" com s'ha comentat anteriorment. El model escollit com a millor predictiu de variants causals és el model amb interaccions i "infecció", amb una sensibilitat del 83%, una especificitat del 82% i una AUC de 0,87 (**Taula 35, Figura 46**).

La variable amb més pes a l'hora de trobar una variant genètica causal és "limfòcits B de transició", amb el valor estadístic més gran (7,7055) i una p-valor menor (0,0055).

S'observa una interacció entre l'edat d'inici de símptomes i els limfòcits B de transició estadísticament significativa, indicant que l'efecte de l'edat d'inici de símptomes és diferent segons el percentatge de limfòcits B de transició. És a dir, en pacients amb valors de limfòcits B de transició normals, no hi ha efecte de l'edat d'inici de símptomes. En canvi, en pacients amb valors de limfòcits B de transició elevats, el risc de tenir una variant genètica disminueix amb l'edat d'inici de símptomes, és a dir, tenen més risc els pacients amb una edat d'inici de símptomes més primerenca.

Taula 35. Model de regressió logística multivariants amb interaccions i incorporant la variable infecció.

Variable	Wald Khi-Square	P-valor	
Limfòcits B de transició	7,7055	0,0055	*
Edat inici símptomes * Limfòcits B de transició	5,3729	0,0205	*
Edat inici símptomes	2,5366	0,1112	
Infecció	2,1765	0,3368	

* estadísticament significatiu ($p < 0,05$)

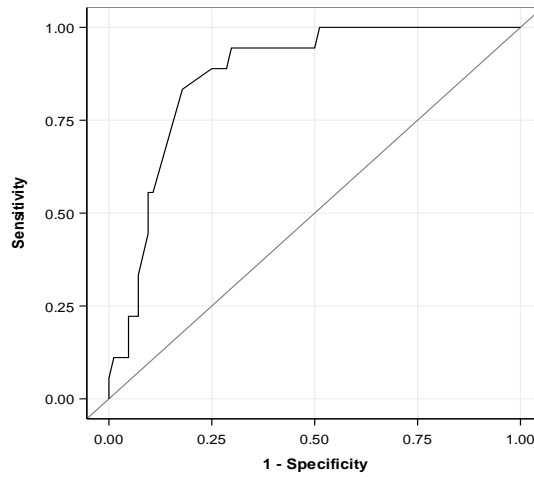


Figura 46. Corba ROC pel model amb interaccions amb infecció.
 Valors de sensibilitat i d'especificitat de 0,83333 i 0,82143 respectivament. AUC = 0,8707.

En resum, els pacients amb més probabilitats de una variant genètica causal d'IDCV són els pacients pediàtrics, amb un inici de manifestacions clíniques més precoç, amb un fenotip clínic no limitat a infeccions i amb percentatges de limfòcits B de transició elevats.



DISCUSSIÓ

IX. DISCUSSIÓ

El present treball mostra que un percentatge important de pacients amb diagnòstic d'IDCV presenta defectes monogènics causals o facilitadors de presentar el defecte immunitari. Els pacients amb diagnòstic a edats precoces, amb un fenotip clínic no limitat a les infeccions i amb limfòcits B de transició elevats presenten més possibilitats de patir un defecte monogènic i seran els principals candidats a un estudi genètic a través de NGS pel diagnòstic de la malaltia. A més, el treball aporta informació sobre la validesa de la determinació de les cadenes lleugeres lliures en sèrum en el procés diagnòstic dels pacients amb IDCV.

Cal esmentar que la discussió del present treball d'investigació presenta certes limitacions especialment relacionades amb la heterogeneïtat de la IDCV: els criteris diagnòstics emprats per diferents grups, els mètodes emprats per a la classificació dels pacients, les tècniques emprades per a l'anàlisi de les subpoblacions limfocitàries i la poca informació sobre estudis genètics en cohorts àmplies de pacients amb IDCV. A més, el fet que aportem dades clíniques, genètiques i funcionals que relacionem per trobar una correlació entre elles i, d'aquesta manera, poder predir en quins casos és òptima la realització de l'estudi genètic complica la comparació amb les altres cohort publicades ja que algunes comprenen només l'estudi de manifestacions clíniques com la de Gathmann *et al.* [35] i d'altres només contenen l'estudi genètic de la cohort.[41,55,118]

9.1. Característiques de la cohort

La nostra cohort està formada majoritàriament per pacients adults i amb una distribució per gènere gairebé paritària, de forma similar a les dades publicades (Gathmann *et al.* [35]). També la distribució d'edat dels pacients és molt similar, amb l'excepció que a la nostra cohort no hi ha representació del grup d'edat de 4 a 11 anys. Això és així ja que pacients amb un defecte T important s'han classificat com a immunodeficiències combinades i no com a IDCV i perquè hem estat molt estrictes a l'hora de posar la etiqueta "IDCV" a pacients pediàtrics amb hipogammaglobulinèmia.

L'ètnia caucàsica suposa la pràctica totalitat de la cohort i només s'observa consanguinitat en 3 pacients (2,2%) – valors similars als de consanguinitat a l'Estat Espanyol (1-4% de la població) [119] -, fet que dificulta l'avaluació de la relació d'aquesta variable amb la IDCV. Cal remarcar, però, que rarament s'ha descrit el paper de la consanguinitat en la IDCV clàssica i en moltes publicacions amb grans cohorts manca aquesta dada. Aquestes característiques són importants ja que les troballes observades en aquest treball poden no ser traslladables a d'altres entorns amb diferències demogràfiques significatives on la consanguinitat és molt més freqüent.

Pel que fa a les manifestacions clíniques observades, el fenotip clínic més prevalent són les infeccions respiratòries bacterianes recurrents (91,2%), en consonància amb el que hi ha publicat a la literatura fins al moment de la redacció d'aquesta tesi. No obstant, al treball de Gathmann *et al.* només un 32% dels pacients de la seva cohort presenten pneumònia i només un 23% presenten bronquièctasis, mentre que en el present treball, les bronquièctasis estan recollides en el segon grup més freqüent, "afectació pulmonar". Igualment, l'afectació gastrointestinal (76,5%) és molt més freqüent al nostre estudi que en d'altres cohorts com la de Gathmann *et al.* on l'enteropatia és present només en un 9% dels pacients estudiants. Les diferències observades entre el nostre treball i els treballs publicats a la literatura poden ser degudes a: (1) diferent criteri diagnòstic d'IDCV emprat, (2) estudi monocèntric, (3) diferències demogràfiques, (4) diferents criteris a l'hora de definir una afectació

orgànica i/o diferents protocols de cribratge d'aquestes manifestacions als pacients asimptomàtics [120]

Mitjançant l'agrupació de les manifestacions clíniques, observem que la major part dels nostres pacients (89,7%) presenten infeccions i altres manifestacions clíniques secundàries a fenòmens d'immunodesregulació. Resulta difícil comparar aquesta dada amb el que hi ha publicat a la literatura degut a que normalment es classifiquen en només dos grups: només infeccions i complicacions. No obstant, el grup més nombrós és sempre el de "complicacions" en consonància amb els nostres resultats. [42,44,121–123]. Fixant-nos en l'*score* d'acumulació de manifestacions clíniques, el més freqüent és tenir almenys 3 manifestacions clíniques acumulades. El predomini de població adulta a la nostra cohort i el fet que el nostre hospital sigui un centre de referència nacional d'IEI on ens fan arribar els pacients més complexes, poden explicar aquests resultats.

9.2. Eines pel diagnòstic d'IDCV

En quant als criteris diagnòstics utilitzats en el nostre estudi, la classificació de la ICON-2015 ha estat escollida pels següents motius: (1) el diagnòstic és definitiu si es compleixen tots els criteris diagnòstics, (2) a diferència d'altres aproximacions, en aquest cas no es defineix IDCV probable ni IDCV possible, (3) els valors sèrics d'IgG han de ser inferiors als valors de referència del laboratori clínic local o regional i no inferiors a un punt de tall en concret, (4) es requereix, estrictament, que la IgA i/o la IgM estiguin disminuïdes, (5) la resposta vacunal ha d'estar alterada, (6) el diagnòstic pot ser establert únicament sobre la base de criteris de laboratori, (7) el diagnòstic no està influït per criteris de laboratori addicionals i (8) el diagnòstic no depèn de criteris histològics.[35]

Així, tot i que l'estudi de les subpoblacions de limfòcits B no és un criteri diagnòstic de la ICON-2015, altres treballs si que el tenen com un dels criteris pel diagnòstic d'IDCV pel que es va recollir de manera sistemàtica en el nostre estudi. [37,38] A la nostra cohort, trobem que només un 42,4% dels pacients amb IDCV presenten uns limfòcits B de canvi d'isotip disminuïts ($+/\leq 2\%$; 'smB-') seguint la classificació

EUROclass.[50] De la mateixa manera, en el treball publicat per Bright *et al.*, en el qual s'utilitza la mateixa classificació EUROclass, s'evidencia que un 47% dels pacients amb IDCV presenten limfòcits B de canvi d'isotip disminuïts.[124] Ambdós resultats queden una mica per sota de les dades publicades per Wehr *et al.* (EUROclass trial) on es descriu que un 58% dels pacients amb IDCV són smB-. Cal destacar que en totes tres cohorts els valors són baixos per ser un criteri diagnòstic d'IDCV, suggerint que és un criteri molt poc sensible. Fins i tot, dins la cohort de pacients amb defectes monogènics causals, 9 d'ells (64,3%) presenten uns resultats de smB normals indicant la necessitat de poder disposar d'una millor eina pel diagnòstic de la IDCV. [50]

Per contra, els resultats obtinguts per la resta de subpoblacions estudiades difereixen dràsticament de l'article de Wehr *et al.* on es mostra un 19% de B-Tr^{hi} i un 81% de B-Tr^{norm} pel que fa als limfòcits B de transició i un 43 % de CD21^{low} i un 57% dels CD21^{norm} pel que fa als limfòcits B CD21^{low}. Aquest fet pot ser degut a que no tots els nostres pacients han estat subsidiaris a l'estudi de subpoblacions limfocitàries avançades i els resultats poden veure's esbiaixats. A més, cal tenir en compte que la utilització d'estratègies de *gating* diferents per diferenciar els limfòcits B de transició i els limfòcits CD21^{low}, i la presència de pacients amb APDS a la nostra cohort (els quals es caracteritzen per presentar uns valors de limfòcits B de transició elevats) podria explicar les diferències observades amb els resultats de Wehr *et al.* Poder disposar d'un grup control de donants sans ens hagués permès comparar els nostres resultats i saber els nivells de significança de les diferències observades.[125] Tot i la baixa sensibilitat de la determinació dels smB, la determinació de les subpoblacions de limfòcits B és útil en l'estudi del pacient amb una possible IDCV ja que pot ajudar-nos a decidir si incloure al pacient al panell genètic o no, ja que com hem vist els pacients amb limfòcits B de transició elevats tenen major probabilitat de tenir una mutació monogènica causal.

Una altra de les eines diagnòstiques àmpliament emprada és la resposta vacunal, inclosa com a criteri diagnòstic en la ICON-2015. Tot i que totes les guies pel diagnòstic d'IDCV recomana la seva realització ja que té una alta sensibilitat per a detectar pacients amb IDCV, hi ha una sèrie de consideracions que cal tenir en

compte: en la pràctica assistencial del nostre laboratori i de la majoria de centres a Europa la resposta vacunal enfront al pneumococ es realitza de forma global i no mitjançant els diferents serotips, manquen uns valors de referència per grups d'edat, es requereix de temps per a estudiar-la (entre 3-6 setmanes), s'han de realitzar dues extraccions sanguínies i pacients amb hipogammaglobulinèmia greu (IgG<100 mg/dL) no poden ser avaluats.

Les limitacions evidents d'aquests dos criteris, fa que en aquest treball proposem la determinació de les cadenes lleugeres lliures en sèrum com un nou biomarcador pel diagnòstic d'IDCV. L'any 2021, Unsworth *et al.* van posar de manifest per primera vegada que els valors de les cadenes lleugeres lliures κ i/o λ eren extremadament baixos o indetectables en una petita cohort de pacients amb deficiències primàries d'anticossos, la majoria d'ells amb IDCV, suggerint que un κ/λ determinat podria ser un indicador de disfunció de les cèl·lules B.[126] De la mateixa manera, Scarppa *et al.* estudien 345 pacients adults amb IDCV i 138 pacients control, i no només mostren que els pacients amb IDCV presenten valors més baixos de les cadenes κ i λ comparant-ho amb els controls, sinó que els classifiquen en 4 grups en funció del seu fenotip: $\kappa\lambda^+$ (25%), $\kappa^+\lambda^-$ (3%), $\kappa\lambda^-$ (51%), $\kappa^+\lambda^+$ (22%) essent el grup $\kappa^+\lambda^+$ el més predominant en el grup control. D'aquesta manera, relaciona els valors de sFLC amb un epifenomen de l'alteració de la diferenciació dels limfòcits B, cosa que comporta als pacients a un major risc d'infeccions bacterianes i a un defecte pulmonar crònic. En la mateixa línia, Guevara-Hoyer *et al.* estudien les sFLC de 100 pacients amb IEI i de 49 amb immunodeficiències secundàries i proposen un punt de tall de la suma $\kappa+\lambda$ de 16,7 mg/L amb aplicació diagnòstica per als pacients amb IDCV.[51]

El nostre estudi valida els treballs esmentats anteriorment trobant un 83,5% dels pacients de la cohort amb un dels dos o ambdós subtipus disminuïts, en comparació amb els valors de referència establerts, cosa que indica que la determinació de sFLC és un bon predictor d'IDCV. A més, també detectem un 89,7% de pacients amb la suma $\kappa+\lambda$ disminuïda per sota de 16,7 mg/L validant d'aquesta manera el *cut-off* proposat per Guevara-Hoyer *et al.* [51] No observem diferències significatives entre pacients adults i pacients pediàtrics pel que sembla raonable afirmar que pot ser un

bon biomarcador independentment de l'edat dels pacients. Tot i això, cal tenir present el número limitat de pacients pediàtrics inclosos a la nostra cohort.

Un pas més seria determinar si, atesa la complexitat i el retard en el diagnòstic que pot suposar la determinació de la resposta vacunal, la determinació de les cadenes lleugeres pot substituir-la com a criteri diagnòstic d'IDCV. D'aquesta manera, evitariem el procés de vacunació, la realització de dues analítiques (pre- i post-vacunació) i evitariem també el problema que presenta la vacunació en pacients amb hipogammaglobulinèmia greu. Per aquest motiu hem analitzat la correlació entre la resposta vacunal i les cadenes lleugeres lliures en sèrum, que ha resultat en una correlació positiva però no significativa a nivell estadístic. No obstant, hem vist que afegir la determinació de les sFLC dins dels criteris diagnòstics de la IDCV és molt útil per a pacients amb resposta vacunal normal i alta sospita d'IDCV o pels pacients en els que la determinació de la resposta vacunal no es pot determinar pel seu grau d'hipogammaglobulinèmia ja que ens permetria detectar molts pacients que han quedat fora del paraigües de la IDCV.

9.3. Model predictiu per l'estudi genètic

Un cop establert de manera correcta un diagnòstic d'IDCV, els pacients han de ser estudiats genèticament per establir un diagnòstic genètic que permetrà escollir el tractament més adequat i oferir consell genètic. Per això, en aquest treball proposem un model per predir quins pacients han de ser prioritzats per l'estudi genètic si no es pot dur a terme de forma generalitzada. Tot i que els costos de la NGS han baixat substancialment en els últims anys, el preu segueix sent una barrera per a la seva utilització i l'anàlisi de dades és fa difícil de gestionar per a alguns centres degut a l'alt volum de dades generades. Tampoc s'ha d'oblidar que la NGS no està disponible a arreu del món. [12,127,128]

En l'estudi del nostre model de priorització, les variables que han resultat ser significatives són l'edat d'inici de símptomes i els limfòcits B de transició elevats. Pel que fa a l'edat d'inici de símptomes, trobem que els pacients que han tingut l'inici de símptomes en edat pediàtrica tenen més probabilitats de tenir una variant genètica

causal, fet que remarca la necessitat de fer una bona història clínica quan s'atén per primera vegada un pacient adult amb IDCV. Aquestes dades van en la línia dels resultats obtinguts per Mafucci *et al.* on troben que l'edat d'inici de símptomes dels pacients amb variants causals és de 14 anys (mediana) i de 16 anys (mitjana). [128] La resta de cohorts publicades no aporten informació sobre l'edat dels pacients estudiats i el seu paper en la predicció de patir un defecte monogènic. Respecte a l'alteració dels percentatges de limfòcits B de transició com a variable associada a un defecte monogènic, cal tenir en compte que aquest resultat es pot veure esbiaixat ja que a la nostra cohort tenim 3 pacients amb diagnòstic d'APDS, on una de les característiques immunològiques principals és la presència de limfòcits B de transició augmentats. Des del punt de vista de paràmetres immunològics, crida l'atenció que cap de les variables relacionades amb les cadenes lleugeres lliures en sèrum hagi resultat significativa en el model generat. No obstant, creiem que és degut a una molt bona caracterització de la cohort de pacients amb IDCV, on pràcticament la totalitat de pacients presenten les cadenes lleugeres disminuïdes i per tant, no es poden observar diferències significatives si (pràcticament) tota la cohort té aquesta variable com a denominador comú.

Tot i que la variable "infecció" només presenta una relació marginalment significativa l'hem afegida a la modelització ja que un model amb edat d'inici de símptomes, fenotip clínic i una troballa de laboratori (limfòcits B de transició) té sentit des d'un punt de vista clínic. A més, afegint la variable "infecció" s'aconsegueix augmentar lleugerament el valor d'AUC del model de predicció de formes monogèniques. De nou, aquesta aproximació basada en paràmetres clínics útils pels professionals que atenen als pacients amb IDCV no s'ha utilitzat en publicacions prèvies.

L'avaluació del valor d'AUC no és una tasca senzilla. Tot i que estadísticament valors per sobre 0,7 es consideren significatius, a nivell pràctic el llinard pot variar. Per tal de determinar aquest llinard recentment Guevara-Hoyer *et al.* han desenvolupat una classificació "VISUAL" tot i que en aquest cas, amb l'objectiu de predir la gravetat utilitzant les dades individuals de pacients amb IDCV i no la probabilitat de trobar una variant genètica causal, com és el nostre cas. En el cas del treball de Guevara-

Hoyer *et al.*, s'inclouen els limfòcits sMB, el valor d'IgA, les respostes d'anticossos específics, els limfòcits T CD4⁺ i l'augment d'IgM, obtenint una AUC de 0,72.[129]

9.4. Aproximacions en el diagnòstic genètic

L'estudi genètic aporta molts avantatges i de fet, molts experts apunten que actualment és l'estàndard d'atenció dels pacients amb IEI. Alguns dels avantatges específics del diagnòstic genètic en pacients amb IDCV són: (1) l'establiment del diagnòstic, (2) l'oferiment d'un tractament específic ja sigui farmacològic, TPH en els casos més greus, o fins i tot mitjançant tractaments basats en la teràpia o edició gèniques, (3) el coneixement del pronòstic del pacient, (4) la possibilitat de la realització d'estudis familiars i (5) l'aportació de noves dades per a la recerca d'entitats de nova descripció. [127] Aquest enfocament té un valor afegit en subjectes amb fenotips més greus. [128]

Un altre argument potent per a la seqüenciació dels pacients amb IDCV a través de NGS és que la contribució digènica, oligènica i fins i tot poligènica de la IDCV, pot ser molt més fàcilment detectada mitjançant NGS. [127] A més, els resultats dels estudis genètics poden conduir a la reassignació del pacient a la categoria de defecte immunitari correcta o fins i tot contribuir a que descobreixin noves causes monogèniques addicionals en els casos d'estudis de WES o WGS. [130]

Per tot això, és important que, un cop seleccionats els pacients candidats a la realització de l'estudi genètic, definim quina és la millor aproximació a dur a terme. La utilització d'un panell genètic d'IEI per a pacients amb diagnòstic d'IDCV sembla ser la millor opció tal i com demostra Orange *et al.* ja que és l'aproximació d'estudi genètic amb més rendiment per a aquest tipus de patologia. [131] No obstant, cal que el panell estigui actualitzat, fet força difícil tenint en compte la constant descripció de nous gens causants d'IEI. [3] Tot i els clars beneficis de l'aplicació d'estudis genètics mitjançant aquests panells en pacients amb IDCV, són molts els pacients que segueixen sense poder obtenir un diagnòstic monogènic. Això és així per la possible interacció de varis gens, la implicació de factor ambientals o fins i tot causes

epigenètiques. [130] Però sobretot, el principal inconvenient de l'aplicació de panells genètics és que molts d'ells no contenen tots els gens associats a IEI ja que no estaven descrits en el moment de disseny del panell. [12] A més, cal tenir en compte que els panells proporcionats comercialment no són fàcilment personalitzables i queden obsolets amb facilitat. [12] En el nostre cas, el rendiment del nostre panell d'IEI és d'un 14,17%. Aquesta taxa diagnòstica augmenta fins a 17,6% si afegim array-CGH, WES i WGS a casos seleccionats. Amb els estudis realitzats en aquest treball, trobem un resultat positiu en 1/2 array-CGH, 1/8 WES i 1/1 WGS.

Idealment, l'aproximació diagnòstica en pacients amb un resultat del panell negatiu o no concloent hauria d'incloure la realització de WES i/o de WGS. De fet, els panells genètics comercials, tot i que són més limitats, proporcionen una cobertura i una profunditat de seqüenciació més gran que el WES. [128] El WES permet la identificació molecular de defectes en gens que no estan presents a la IUIS així com la identificació d'etiologies moleculars insospitades i recentment s'està convertint en la tècnica estàndard per al diagnòstic de malalties genètiques substituint l'aplicació de panells més restringits aportant un enfocament imparcial que cobreix totes les regions codificants del genoma. [12] No obstant, en el nostre treball, limitacions de temps i finançament ho han impedit i s'ha limitat la seva realització als aquells pacients amb un fenotip clínic greu.

Una altra aproximació interessant en el grup de pacients amb estudi genètic negatiu seria estudiar altres models d'herència basats en l'acumulació de diverses variants funcionals en gens relacionats amb el desenvolupament i funció de la cèl·lula B. Aquesta aproximació requereix un nombre elevat de pacients amb IDCV amb resultat genètic negatiu i també una grup control d'individus sans seqüenciats amb la mateixa tècnica. En aquesta tesi no s'ha abordat aquest tipus d'estudi però el considerem de gran interès i esperem poder-lo fer en el futur.

Finalment, es important remarcar que en el recent treball de Rodríguez-Ubreva *et al.* on estudien a nivell d'epigenètica i transcriptòmica a dues parelles de bessons monozigòtics discordants per a la IDCV identifiquen defectes en la metilació de l'ADN, en l'accessibilitat de la cromatina, i defectes transcripcionals als limfòcits B

de memòria evidenciant defectes en la comunicació entre cèl·lules durant l'activació cel·lular. Aquests defectes han estat validats posteriorment en una cohort de pacients amb IDCV i amb una de donants sans i proporcionen un mapa multiòmic complet d'alteracions en els limfòcits B de memòria en pacients amb IDCV posant de manifest la necessitat d'estudis òmics en aquells pacients amb resultat genètic negatiu.[68]

Sigui quina sigui l'aproximació de NGS que s'empri, sempre hi ha el risc d'identificar variants de significat incert (VUS) la patogenicitat de les quals s'ha de resoldre mitjançant estudis funcionals tot i que no sempre són fàcils de reproduir ni d'interpretar.[127] És per això que el centre que porti a terme els estudis genètics en pacients amb IDCV ha d'estar preparat i ha de disposar d'un laboratori de recerca amb capacitat de realitzar proves avançades per ser capaçs d'interpretar totes les mutacions trobades que no estiguin descrites a la literatura a nivell funcional i/o molecular. El nombre de VUS obtingudes en els panells genètics, en WES i especialment en WGS també és un aspecte desafiant inherent als enfocaments de NGS. S'han de dur a terme esforços per resoldre la classificació de la variant com a patogènica o benigna sense oblidar que la interpretació de les VUS en un entorn clínic és un tema de debat continu. [12]

9.5. Defectes monogènics identificats

El present treball detecta un 17,6% de casos amb defectes monogènics que considerem com a causals en una cohort de pacients diagnosticats amb IDCV, un resultat similar a les altres sèries descrites a la literatura. [55,118] Els principals gens causants d'IDCV descrits en aquest treball, i que coincideixen amb les principals cohorts d'IDCV de la literatura, són: *LRBA* (12,5%), *PIK3R1* (12,5%), *NFKB1* (16,7%) i *CTLA4* (4,2%) (**Taula 36**).

Taula 36. Comparativa de gens causals d'IDCV descrits a la literatura.

	Present treball n=136	Bogaert et al. [54] n=n.d.	De Valles-Ibáñez et al. [55] n=36	Rojas-Restrepo et al. [132] n=291
N variants causals	24	n.d.	7	72
Zona geogràfica	Catalunya	Revisió literatura	Catalunya	Alemanya
LRBA (%)	12,5	26,7	14,3	2,8
PIK3R1 (%)	12,5	4,8	28,6	0
NFKB1 (%)	16,7	1,6	14,3	22,2
CTLA4 (%)	4,2	6,4	14,3	20,8
Altres gens (%)	54,1	60,5	28,5	54,2

n.d. = no disponible

La identificació de variants causals als gens *LRBA* i/o *CTLA4* pot determinar el pronòstic del pacient ja que en aquest cas hi ha la possibilitat d'administrar un tractament dirigit, l'*abatacept*. L'any 2015, Lo *et al.* publicaven a la revista *Science* un treball on demostraven per primera vegada que pacients amb deficiència a *LRBA* mostraven una millora del seu estat clínic general, de les tomografies computaritzades i de la funció pulmonar després de ser tractats amb *abatacept*. [24] Recentment, Kiykim *et al.* han demostrat els beneficis a llarg termini de l'*abatacept* com a teràpia dirigida per a la deficiència de *LRBA*. [132] En el present treball, s'ha administrat *abatacept* en dos casos observant-se una resposta favorable. Per altra banda, els treballs publicats a la literatura mostren que el TPH és una bona opció a tenir en compte de tractament per als pacients amb deficiència d'*LRBA* o de *CTLA4*. No obstant, el conjunt de dades publicades i les cohorts estudiades són massa heterogènies i no suficientment grans com per obtenir cap recomanació sobre la millor pauta d'acondicionament o el nivell necessari de quimerisme del donant. [133–135]

Pel que fa a les variants al gen *NFKB1*, cal tenir en compte que la relació causal entre aquestes i la IDCV no està del tot clara ja que fins fa poc no s'havia demostrat ni funcionalment ni genèticament. En general, hi ha proves suggestives, però no conclouents, de que les variants deletèries a *NFKB1* poden causar IDCV. Al 2021, Li *et al.* comprovaven la validesa d'aquesta hipòtesi desenvolupant un assaig funcional nou, robust i precís per classificar les variants a *NFKB1* segons la capacitat d'activar la transcripció. Utilitzaven aquest assaig per avaluar l'impacte bioquímic de 365 variants no sinònimes a *NFKB1*. Van trobar 59 de les 90 variants en pacients amb IDCV o

condicions relacionades de pèrdua de funció o hipomòrfiques i van demostrar que els pacients amb IDCV poden mostrar un enriquiment en variants a *NFKB1* demostrades experimentalment que són deletèries. [110] En el nostre cas, les variants a *NFKB1* de la cohort són totes deletèries, confirmant així l'aproximació proposada per Li *et al.* [110]

Els pacients amb variants a *PIK3R1* (i a *PIK3CD*) són candidats per a rebre tractament dirigit com pot ser el *sirolimus* o els inhibidors específics de PIK3δ. L'any 2017, Saettini *et al.* van demostrar l'efectivitat del *sirolimus* per a pacients amb APDS mitjançant la inhibició de l'activitat de la fosfatidilinositol-3-kinasa. [136] Igualment, els assajos clínics per avaluar l'eficàcia de *leniolisib* (un potent i inhibidor selectiu de PI3Kδ) pel tractament d'APDS han mostrat uns resultats molt prometedors. [137,138] A més, recentment, s'han dut a terme esforços internacionals en els que ha col·laborat el nostre grup per estudiar l'efecte d'aquests fàrmacs en APDS així com l'impacte del trasplantament de cèl·lules hematopoètiques al·logèniques per a l'APDS. [23,70,139] Així, Dimitrova *et al.* estudia una cohort de 57 pacients amb APDS sotmesos a TPH i conclouen que cal fer un seguiment a llarg termini de més pacients després del TPH per dilucidar la cinètica de la reconstitució immunitària i el quimerisme del donant, establir enfocaments que redueixin la inestabilitat de l'empelt i avaluar la totalitat de la reversió del fenotip al llarg del temps. [139] En el present treball, s'ha administrat *sirolimus* a dos casos, observant una resposta favorable i una resposta parcial amb toxicitat. A la nostra cohort, s'ha tractat un pacient amb *seletalisib* en el context d'un assaig clínic presentant una resposta parcial amb toxicitat hepàtica associada al fàrmac. [70]

Si ens centrem en defectes monogènics detectats menys freqüentment a la nostra cohort, en el cas concret de la deficiència de *RNU4ATAC*, cal tenir present una particularitat important: *RNU4ATAC* no és un gen convencional, entenent com a gen "convencional" aquell que codifica per una proteïna i té una estructura basada en exons i introns. *RNU4ATAC* codifica per un ARN nuclear petit (snRNA, de l'anglès *small nuclear RNA*) i no està inclòs la captura dels gens que es realitza en un WES. Això explica perquè el panell genètic i l'exoma que es van realitzar en el pacient que presentem van resultar negatius. En aquest cas, la seqüenciació del genoma complet

va permetre identificar les dues variants patogèniques a *RNU4ATAC*, fet que il·lustra una dels avantatges del WGS respecte el WES com és la detecció de variants en regions no codificants.

Finalment, variants genètiques en hemizigosi al gen *DKCI* estan associades a disqueratosi congènita lligada al cromosoma X. La disqueratosi congènita pot presentar-se inicialment com una immunodeficiència humoral i entre les múltiples manifestacions es descriu un fenotip immunològic similar a una IDCV.[91] Pràcticament totes les variants descrites en pacients amb disqueratosi congènita per deficiència de *DKCI* són del tipus *missense* (de canvi d'aminoàcid). De fet, el gen *DKCI* és extremadament intolerant a les variants de pèrdua de funció (té un pLI = 1, segons dades de gnomAD. [140] Curiosament, a l'únic article on es descriu un pacient amb una variant genètica a *DKCI* i fenotip IDCV sense altres manifestacions típicament associades a disqueratosi congènita, la variant que descriuen és una deleció d'un aminoàcid de la regió C-terminal de la proteïna. [91] i la variant identificada en el nostre pacient és una deleció de dos nucleòtids que provoca un canvi de marc de lectura situat també a la regió C-terminal, molt proper al final de la proteïna i a la variant reportada en aquest treball. La nostra hipòtesi és que variants de pèrdua de funció com la nostra podrien ser viables només si estan situades a l'extrem C-terminal, de forma que es podria generar una proteïna que preservaria part de la funció donant un fenotip més lleu (IDCV) que la disqueratosi congènita clàssica associada a *DKCI*.

9.6. Variants genètiques no descrites avaluades funcionalment

Com hem comentat anteriorment, sigui quina sigui la aproximació de NGS que s'empri, sempre hi ha la possibilitat d'identificar variants no descrites anteriorment o catalogades com a VUS, la patogenicitat de les quals pot requerir d'estudis addicionals (moleculars i/o funcionals) tot i que no sempre són fàcils de realitzar ni d'interpretar com es mostra a l'apartat resultats per diferents variants potencialment causants de IDCV. [127,141]

En aquest sentit, per exemple, variants genètiques patogèniques al **gen *IKZF1*** han estat descrites a la literatura amb una herència autosòmica dominant (AD) i amb un fenotip compatible amb l'IDCV.[95,142,143] Al nostre estudi hem demostrat que la variant genètica descrita en la família IDCV100 (c.851-2A>C) causa un defecte d'*splicing* que provoca la degradació completa de l'al·lel mutat (haploinsuficiència). En l'estudi familiar, s'observa que la mare i el germà de la pacient índex són portadors de la mateixa variant genètica -però al·lells *wt* diferents ja que la pacient índex i el seu germà tenen pares diferents- i són clínicament asimptomàtics, fet que en complica la interpretació. Una possible hipòtesi per aquestes troballes seria que la mare i el germà, tot i ser portadors de la mateixa variant, tinguin uns valors d'expressió d'*IKZF1* (procedent de l'al·lel *wt*) més elevats que la pacient índex. Per això vam realitzar experiments d'expressió gènica per qPCR. Els resultats inicials mostraven una aparent sobreexpressió gènica d'*IKZF1* en tots els membres - però especialment en la pacient índex - de la família IDCV100. Cal fer, però dues consideracions importants:

1-S'ha realitzat una metodologia de qPCR que ens indica l'expressió relativa, i no absoluta, dels gens analitzats.

2-Els nostres resultats d'expressió de *IKZF1* en diferents subpoblacions limfocitàries en individus controls indiquen que els limfòcits T expressen 3 vegades més de *IKZF1* que els limfòcits B o els granulòcits, resultats similars amb els que es troben al The Human Protein Atlas (disponible a: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185811-IKZF1/single+cell+type>).

Per tant, l'expressió relativa augmentada d'*IKZF1* dels portadors de la variant genètica de *IKZF1* a la família IDCV100 es deu al seu major percentatge de cèl·lules T en sang. Aquest fet és especialment evident en la pacient índex que presenta una important disminució del nombre de limfòcits B i invalida la metodologia utilitzada per validar la nostra hipòtesi.

Tenint en compte els resultats obtinguts sobre la diferent expressió de *IKZF1* en les diferents subpoblacions leucocitàries, el següent pas que realitzarem és la qPCR per quantificar *IKZF1* en cèl·lules B purificades. D'aquesta forma, i corregint per la

diferent quantitat de cèl·lules B dels portadors de la variant, podem veure si realment la contribució de l'al·lel *wt* podria explicar la diferent penetrància de la variant en aquesta família.

En el cas de les variants genètiques trobades al **gen *BTK***, la p.Y418H (pacient IDCV022) ja ha estat prèviament descrita a la literatura [98,99] on els pacients expressen parcialment la proteïna BTK i classifiquen aquesta variant com a variant hipomòrfica i amb penetrància incompleta. És per aquest motiu que la pacient, tot i presentar una inactivació del cromosoma X completament esbiaixada a favor de l'al·lel *wt*, presenta un fenotip compatible amb IDCV i no un fenotip clàssic de l'agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X (ALX), amb uns valors disminuïts de limfòcits B però no suficients pel diagnòstic d'ALX. [100]

En canvi, la variant p.M596T (pacient IDCV038) no ha estat descrita prèviament a la literatura, i després de l'estudi de la inactivació del cromosoma X demostrem que la pacient expressa en la mateixa mesura els dos al·lells (el mutat i el *wild type*) i, per tant, l'excloem de la cohort de pacients amb variants monogèniques causants d'IDCV. Cal remarcar que això no exclou la possibilitat que la variant p.M596T sigui patogènica. De fet, és una variant de freqüència poblacional nul·la, amb un canvi d'aminoàcid en una posició evolutivament molt conservada i amb predicció de patogenicitat per la majoria de predictors computacionals. A més, es troba en una regió amb diverses variants patogèniques descrites, també de canvi d'aminoàcid. La variant no es troba descrita a la literatura i no hi ha cap estudi funcional reportat. Els dos fills de la pacient no presenten la variant i, per tant, no podem saber el seu efecte en hemizigosi. Per tot això, hem classificat la variant p.M596T com a variant de significat incert, tot i que no es pot descartar que en el futur es demostrï la seva patogenicitat. Igualment, en el cas que la variant fos patogènica, la pacient la presenta en heterozigosi i hem descartat una inactivació esbiaixada del cromosoma X. Per tant, tampoc la considerariem causant, per si sola, de la clínica de IDCV de la pacient. En resum, davant d'una variant genètica al gen *BTK* en una dona (o en qualsevol altre gen d'herència lligada al cromosoma X) no es pot descartar l'absència de patogenicitat i cal estudiar la inactivació del cromosoma X.

Pel que fa a les variants al gen ***IKBKG***, més concretament a la variant p.E57K, diversos articles han reportat l'efecte funcional d'aquesta variant i confirmen la condició de variant hipomòrfica. Les variants hipomòrfiques a ***IKBKG*** en homes s'associen normalment a la displàsia ectodèrmica anhidròtica amb immunodeficiència (EDA-ID) tot i que s'han reportat algunes variants genètiques que causen immunodeficiència sense EDA (NEMO-ID) així com casos de portadors asimptomàtics, per la qual cosa la penetrància és incompleta.[114,115] Per tots aquests motius, davant d'una variant possiblement patogènica a ***IKBKG*** cal aprofundir amb la realització de proves funcionals i/o moleculars exhaustives que determinin la patogenicitat de la variant trobada i ens ajudin a interpretar-la. En aquesta línia, Glynis Frans *et al.* estudien l'impacte patogènic de la variant genètica p.E57K mitjançant estudis *in vitro*, observant una degradació d'IkBa normal i una disminució de la producció d'IL-6 després de l'estimulació amb IL1β, Pam3CSK4 o FSL-1.

Degut a la falta de més casos publicats i per ajudar a concretar la implicació d'aquesta variant a nivell funcional, paral·lelament a la realització d'aquesta tesi doctoral hem estudiat 4 pacients portadors de la variant p.E57K amb diversos fenotips clínics. Hem realitzat un Western Blot per estudiar les proteïnes de la via de senyalització NF-κB i hem quantificat la producció de citocines en el sobrenedant de cultius cel·lulars. Els nostres resultats mostren una alta variabilitat interindividual en els fenotips immunològics i clínics dels quatre subjectes estudiats, de la mateixa manera que els altres dos casos publicats a la literatura amb la mateixa mutació. [113,115] No s'observa cap anormalitat clara de la via NF-κB quan s'avalua mitjançant WB, però s'evidencia una alteració variable en la producció de citocines. Aquests resultats reforcen el concepte que la variant p.E57K a ***IKBKG*** és una variant hipomòrfica amb penetrància incompleta i expressivitat variable, però el seu paper real en el fenotip clínic dels nostres pacients queda per dilucidar.

A més, en el cas de la pacient IDCV148, que també presenta la variant p.E57K, el primer estudi a realitzar és la inactivació del cromosoma X per veure quina representació té l'al·lel mutat. Els resultats obtinguts evidencien una expressió del 75% del nucleòtid mutat i 25% del nucleòtid *wild type*, suggerint un fenomen d'inactivació del cromosoma X parcialment esbiaixada. Aquest cas no va ser

incorporat a l'estudi funcional de la variant p.E57K esmentat anteriorment ja que el seu diagnòstic genètic va ser posterior en el temps i actualment resta pendent d'avaluar funcionalment.

A la mateixa pacient IDCV148 es troba una variant en heterozigosi al **gen *TNFRSF13B* (TACI)**. Globalment, mentre que les variants genètiques monoal·lèliques a *TNFRSF13B* es consideren factors de risc a IDCV però no suficients per causar malaltia per si soles, es causals amb penetrància alta (però no completa) les variants bial·lèliques (homozigotes o heterozigotes compostes). La hipòtesi més acceptada és que els casos de pacients IDCV amb variants genètiques heterozigotes a *TNFRSF13B* van acompanyats d'altres factors ja siguin genètics, epigenètics, ambientals o d'altres encara pendents d'identificar.[144,145] En el nostre cas, hem detectat un 13,2% de pacients de la cohort amb variants genètiques a TACI, on només un 4,35% han estat variants causants (bial·lèliques). Aquest resultat és semblant al que obté Gathmann *et al.* en la seva cohort de pacients amb IDCV, on troba un 2% de pacients amb variants genètiques a TACI. [41] Per tot l'exposat, les variants genètiques al gen *TNFRSF13B* han d'interpretar-se amb cautela, especialment quan les trobem en heterozigosi.

La pacient IDCV 148 presenta una variant genètica que afecta al lloc donador d'*splicing* de l'intró 1 (c.61+2T>A). Al gel d'electroforesi de validació d'amplificació de l'ADNc de la pacient IDCV148, s'observen dues bandes corresponents al transcrit complet (373 pdb) i a una isoforma incompleta d'uns 200 pdb aproximadament a la que li manca l'exó 2 (isoforma $\Delta 2$). La presència d'aquesta isoforma $\Delta 2$ ja ha estat descrita prèviament en treballs publicats a la literatura, on descriuen que el gen *TNFRSF13B* humà té un exó 5' addicional, que mitjançant l'*splicing* alternatiu de l'ARNm permet saltar l'exó 2, conduint a la producció de 2 isoformes TACI (wt i $\Delta 2$) que no es troben en ratolins. Per tant, en el cas de la pacient IDCV148, la variant c.61+2T>A provoca un defecte en el procés d'*splicing* que dona lloc a una isoforma ($\Delta 2$) que, alhora, és una isoforma que es produeix de forma fisiològica per un fenomen d'*splicing* alternatiu. La diferent proporció entre les dues isoformes (amb menys quantitat de la forma wt) seria el mecanisme patogènic d'aquesta variant. La isoforma wt conté 2 dominis d'unió a lligands (CRD1 i CRD2)

mentre que la curta ($\Delta 2$) només conté el domini CRD2 proximal de la membrana.[116,117] Hymowitz *et al.*, examinant les isoformes humanes en cèl·lules transfectants, demostren que, tot i que ambdues isoformes activen el factor nuclear NF-kB, la isoforma $\Delta 2$ té una afinitat d'unió més alta per APRIL i BAFF en comparació amb la isoforma més llarga.[116,117,146] Malgrat aquestes dades, desconeixem quin pot ser el mecanisme patogènic que expliqui perquè tenir una proporció més elevada de la isoforma $\Delta 2$ respecte la forma *wt* condiciona un risc més elevat de presentar un fenotip clínic compatible amb una IDCV.

Un cas similar a TACI és el que passa amb les **variants genètiques a *MBL2*** que causen un dèficit de lectina d'unió a la manosa (MBL, de l'anglès *mannose-binding lectin*) que, al seu torn, causa un dèficit funcional de la via de les lectines del complement. Aquest dèficit, que per si sol no causa clínica habitualment, pot ser rellevant quan es troba en pacients que presenten altres variants genètiques causants d'IEI. Aquest rol de factor de susceptibilitat en la IDCV s'exposa en varis treballs de la literatura. [147–149] Un exemple il·lustratiu del nostre treball és la pacient IDCV100, la qual presenta una variant patogènica en heterozigosi a *IKZF1* i una variant en heterozigosi que provoca un al·lel nul al gen *MBL2*. L'altre al·lel d'*MBL2*, el *wt*, presenta l'haplotip associat a baixa expressió. El paper de les variants a *MBL2* en la IDCV no queda clar i, com passa en altres IEI, sembla tenir un paper modificador del fenotip infeccions de la malaltia i en cap cas un paper directament causant. En general, per confirmar el paper de les variants trobades a *MBL2*, cal comprovar-ho funcionalment mitjançant una estudi de la via de les lectines del complement (tal com hem fet en el cas de la pacient IDCV100).[150]

Amb tot l'exposat, volem insistir en la importància de disposar d'un centre de referència que compti amb un laboratori de proves avançades en IEI amb capacitat de dur a terme proves funcionals i/o moleculars que s'escapen de la pràctica clínica rutinària per a la validació de les variants genètiques trobades no descrites mitjançant l'estudi genètic. En cas de no disposar-ne, és important crear xarxes per establir col·laboracions entre centres amb diferents recursos.

9.7. Altres beneficis dels estudis genètics

L'estudi genètic no només serveix de confirmació del diagnòstic clínic sinó que si es fa extensiu al resta familiars, permet conèixer si hi ha portadors (que poden presentar, o no, manifestacions clíniques). Aquells familiars portadors de variants genètiques i amb desig reproductiu necessitaran d'un adequat assessorament genètic, per conèixer el risc de transmetre la malaltia. En aquest treball s'han realitzat un total de 14 estudis familiars on s'han trobat: (i) 11 progenitors portadors, permetent realitzar consell genètic preconcepcional en el cas de requerir-ho; (ii) 4 germans heterozigots portadors i asimptomàtics; (iii) 2 germans portadors i afectes de la malaltia; (iv) 3 fills de pacients índex portadors i afectes de la malaltia, permetent l'administració de profilaxis i una monitorització clínica en tots ells; (v) en 3 dels casos, la variant genètica ha resultat *de novo*. A més, l'estudi genètic mitjançant diferents aproximacions (seqüenciació Sanger, panell personalitzat, exoma o genoma) permetrà teràpies dirigides i és de vital importància per a pacients amb presentacions atípiques. [127,151]

Tot i que en la majoria dels pacients no se'ls ha pogut oferir un tractament específic i dirigit que millori el seu pronòstic, poder identificar el seu defecte genètic fa que en aquells casos més greus es puguin arribar a plantejar el TPH, més enllà de la seva indicació global en IDCV. En aquesta línia, actualment el projecte STEM-PAD coordinat per l'ESID té l'objectiu d'avaluar el nombre, la indicació, la mortalitat, la morbiditat i la reconstitució immune després de TPH en pacients amb deficiència d'anticossos, i d'aquesta manera, poder avaluar la possibilitat d'utilitzar aquesta eina terapèutica en pacients amb IDCV. Més informació sobre el projecte i el seu avenç pot trobar-se a la pagina web del projecte: <https://esid.org/Working-Parties/Clinical-Working-Party/Studies/StemPAD-study-recruitment-closed>

9.8. Limitacions de l'estudi

Aquest estudi presenta una sèrie de limitacions que es comenten a continuació:

1. Es tracta d'un projecte unicèntric i amb un número limitat de pacients inclosos en el que no hi ha variabilitat ètnica. Tot i que això sigui una limitació, també ens permet tenir una cohort molt homogènia i amb informació molt detallada, fet que ens permet aprofundir molt més en l'estudi de la IDCV sense la addició d'altres variables que podrien alterar els resultats obtinguts. De totes maneres, sembla evident la necessitat de validar els resultats en d'altres àmbits geogràfics i orígens poblacionals.
2. La distribució de les edats dels pacients de la cohort està esbiaixada degut al baix nombre de pacients pediàtrics inclosos. Això és degut a que hem estat molt estrictes en els criteris diagnòstics d'IDCV i s'han exclòs tots aquells pacients amb immunodeficiències combinades o amb hipogammaglobulinèmies inespecífiques. Aquest fet diferencia el nostre estudi de moltes de les cohorts analitzades anteriorment i això també complica dur a terme comparacions detallades.
3. Els estudis genètics familiars no han pogut ser realitzats a la totalitat dels pacients de la cohort, especialment per la negativa dels familiars a cedir mostra per a l'estudi o per la impossibilitat de contactar amb ells. No obstant, s'han detectat un total de 9 casos afectes, 17 casos portadors i tots ells s'han pogut beneficiar de consell genètic preconcepcional.
4. No s'ha dut a terme un estudi mitjançant WES o WGS en tots els pacients inclosos amb un resultat genètic inicial negatiu. La necessitat de major finançament i de més temps han impedit dur-ho a terme com a part de la present tesi doctoral.
5. L'estudi dels valors de les cadenes lleugeres lliures en sèrum s'ha realitzat només en pacients amb IDCV i manca l'estudi en un grup control ja sigui de donants sans o de pacients amb una altra patologia. Tot i això, l'existència de treballs previs que validen la determinació de les sFLC com biomarcador per a la IDCV reforça el nostre enfocament.

9.9. Futures línies de recerca

Els resultats actuals ja han beneficiat a un nombre significatiu de pacients i la intenció del nostre grup és seguir aquesta línia de recerca de cara a validar la seva aplicabilitat a d'altres cohorts i a aprofundir en els estudis dels pacients sense un diagnòstic concloent. Els aspectes que es pretenen abordar són:

1. El seguiment a llarg termini de la cohort més enllà dels 3 anys de l'estudi per obtenir més informació de l'evolució clínica dels pacients.
2. L'aplicació d'estudis genètics avançats de forma rutinària en els pacients amb un resultat genètic negatiu; WES, WGS, estudis de transcriptòmica, d'epigenètica, etc.
3. L'aplicació d'estudis on es considerin altres models d'herència més enllà del monogènic (herència digènica, oligogènica, poligènica) en els pacients amb un resultat genètic negatiu.
4. L'ampliació de la cohort amb pacients amb diagnòstic d'IDCV procedents d'altres hospitals del territori Català-Espanyol per augmentar la n de pacients estudiats.
5. La replicació del model predictor de formes monogèniques d'IDCV a altres cohorts per a la seva validació.
6. La identificació de nous gens o noves variants genètiques associades a IDCV. Durant la redacció d'aquest treball, la doctoranda ha participat en la publicació de l'article científic "*Labrador-Horrillo M, Franco-Jarava C, Garcia-Prat M, Parra-Martínez A, Antolín M, Salgado-Perandrés S, et al. Case Report: X-Linked SASH3 Deficiency Presenting as a Common Variable Immunodeficiency. Front Immunol. Front Immunol; 2022;13.*" el segon article sobre la deficiència de *SASH3* a la literatura. Es tracta d'un pacient adult inicialment diagnosticat amb IDCV que gràcies a l'aplicació del panell genètic d'IEI se li detecta una variant genètica al gen *SASH3* recentment descrit com a causant d'immunodeficiència combinada lligada al cromosoma X. No obstant, el pacient presentava un fenotip més lleu de l'habitual i per això havia estat catalogat com a IDCV.[152] Malauradament, el pacient no es va poder incloure a la cohort d'estudi d'aquesta tesi doctoral per manca de temps.



CONCLUSIONS

X. CONCLUSIONS

El present estudi aporta noves dades sobre la genètica relacionada amb la immunodeficiència comuna variable:

1. S'ha detectat una causa monogènica causal en un 17,6% de casos en una cohort de pacients diagnosticats amb IDCV.
2. Els criteris que han resultat ser rellevants per a l'estudi genètic son: l'edat d'inici de símptomes, la presència d'altres manifestacions clíniques a part d'infeccions i la presència de limfòcits B de transició elevats.
3. Les cadenes lleugeres lliures en sèrum (κ i λ) són un bon biomarcador pel diagnòstic d'IDCV.
4. Disposar de les eines necessàries per a l'anàlisi funcional de les variants genètiques no descrites o de significat incert ens ha permès confirmar les nostres troballes en un percentatge significatiu de pacients.
5. La nostra aproximació diagnòstica ha permès realitzar l'estudi genètic familiar i oferir consell genètic tant a pacients com a familiars.
6. L'estudi genètic ens ha permès identificar pacients que es poden beneficiar potencialment de tractaments específics.

XI. FONTS DE FINANÇAMENT

La realització d'aquest projecte ha estat possible parcialment gràcies al finançament que el grup de recerca "Infecció en el pacient pediàtric immunodeprimit" del VHIR ha rebut per part de Grifols International SA (Sant Cugat del Vallès, Barcelona Catalunya, Espanya).

L'estudi de les cadenes lleugeres lliures en sèrum en pacients amb IDCV ha estat possible gràcies a la col·laboració amb The Binding Site España (Barcelona Catalunya, Espanya).



BIBLIOGRAFIA

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Yamashita M, Inoue K, Okano T, Morio T. Inborn errors of immunity-recent advances in research on the pathogenesis. *Inflamm Regen. Inflamm Regen*; 2021;41:9.
2. Modell V, Knaus M, Modell F, Roifman C, Orange J, Notarangelo LD. Global overview of primary immunodeficiencies: a report from Jeffrey Modell Centers worldwide focused on diagnosis, treatment, and discovery. *Immunol Res. Humana Press Inc.*; 2014;60:132–44.
3. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol. J Clin Immunol*; 2022;
4. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol. J Clin Immunol*; 2020;40:24–64.
5. Bastard P, Gervais A, Voyer T Le, Rosain J, Philippot Q, Manry J, et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~ 4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~ 20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol. Sci Immunol*; 2021;6.
6. Thalhammer J, Kindle G, Nieters A, Rusch S, Seppänen MRJ, Fischer A, et al. Initial presenting manifestations in 16,486 patients with inborn errors of immunity include infections and noninfectious manifestations. *J Allergy Clin Immunol. J Allergy Clin Immunol*; 2021;148:1332-1341.e5.
7. Sánchez-Ramón S, Bermúdez A, González-Granado LI, Rodríguez-Gallego C, Sastre A, Soler-Palacín P, et al. Primary and secondary immunodeficiency diseases in oncohaematology: Warning signs, diagnosis, and management. *Front Immunol. Frontiers Media S.A.*; 2019;10.
8. Garcia-Prat M, Álvarez-Sierra D, Aguiló-Cucurull A, Salgado-Perandrés S, Briongos-Sebastian S, Franco-Jarava C, et al. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. *Cytometry B Clin Cytom. John Wiley and Sons Inc.*; 2019;96:223–33.
9. Garcia-Prat M, Vila-Pi Joan G, Martos Gutierrez S, Gala Yerga G, García Guantes E, Martínez-Gallo M, et al. Age-specific pediatric reference ranges for immunoglobulins and complement proteins on the Optilite™ automated turbidimetric analyzer. *J Clin Lab Anal. John Wiley and Sons Inc.*; 2018;32.
10. Scarpa R, Pulvirenti F, Pecoraro A, Vultaggio A, Marasco C, Ria R, et al. Serum Free Light Chains in Common Variable Immunodeficiency Disorders: Role in

Differential Diagnosis and Association With Clinical Phenotype. *Front Immunol. Frontiers Media S.A.*; 2020;11.

11. Pecoraro A, Jolles S, Crescenzi L, Varricchi G, Marone G, Savoia M, et al. Validation of Calculated Globulin (CG) as a Screening Test for Antibody Deficiency in an Italian University Hospital. *Curr Pharm Biotechnol. Curr Pharm Biotechnol*; 2018;19:728–33.

12. Rudilla F, Franco-Jarava C, Martínez-Gallo M, Garcia-Prat M, Martín-Nalda A, Rivière J, et al. Expanding the Clinical and Genetic Spectra of Primary Immunodeficiency-Related Disorders With Clinical Exome Sequencing: Expected and Unexpected Findings. *Front Immunol. Front Immunol*; 2019;10.

13. Martínez-Cano J, Campos-Sánchez E, Cobaleda C. Epigenetic Priming in Immunodeficiencies. *Front cell Dev Biol. 2019*;7:125.

14. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet. Curr Protoc Hum Genet*; 2013;Chapter 7.

15. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*; 2003;31:3812.

16. Flanagan SE, Patch AM, Ellard S. Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers. Genet Test Mol Biomarkers*; 2010;14:533–7.

17. Aguilar C, Malphettes M, Donadieu J, Chandesris O, Coignard-Biehler H, Catherinot E, et al. Prevention of infections during primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis. Clin Infect Dis*; 2014;59:1462–70.

18. Ballow M, Paris K, de la Morena M. Should Antibiotic Prophylaxis Be Routinely Used in Patients with Antibody-Mediated Primary Immunodeficiency? *J Allergy Clin Immunol Pract. J Allergy Clin Immunol Pract*; 2018;6:421–6.

19. Thakar MS, Hintermeyer MK, Gries MG, Routes JM, Verbsky JW. A Practical Approach to Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Using the T Cell Receptor Excision Circle Assay. *Front Immunol. Front Immunol*; 2017;8.

20. Milito C, Pulvirenti F, Cinetto F, Lougaris V, Soresina A, Pecoraro A, et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized trial on low-dose azithromycin prophylaxis in patients with primary antibody deficiencies. *J Allergy Clin Immunol. 2019*;144:584-593.e7.

21. Eibl MM, Wolf HM. Vaccination in patients with primary immune deficiency, secondary immune deficiency and autoimmunity with immune regulatory abnormalities. *Immunotherapy. Immunotherapy*; 2015;7:1273–92.

22. Bonilla FA. Update: Vaccines in primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol. J Allergy Clin Immunol*; 2018;141:474–81.

23. Maccari ME, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Aiuti A, Aleinikova O, Bangs C, et al. Disease Evolution and Response to Rapamycin in Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome: The European Society for Immunodeficiencies-Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome Registry. *Front Immunol. Frontiers Media SA*; 2018;9:543.
24. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science. Science*; 2015;349:436–40.
25. Forbes LR, Vogel TP, Cooper MA, Castro-Wagner J, Schussler E, Weinacht KG, et al. Jakinibs for the treatment of immune dysregulation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) or STAT3 mutations. *J Allergy Clin Immunol. J Allergy Clin Immunol*; 2018;142:1665–9.
26. Gennery AR, Albert MH, Slatter MA, Lankester A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Primary Immunodeficiencies. *Front Pediatr. Front Pediatr*; 2019;7.
27. Castagnoli R, Delmonte OM, Calzoni E, Notarangelo LD. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Primary Immunodeficiency Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Front Pediatr. Frontiers Media SA*; 2019;7:295.
28. Argudo-Ramírez A, Martín-Nalda A, González de Aledo-Castillo JM, López-Galera R, Marín-Soria JL, Pajares-García S, et al. Newborn Screening for SCID. Experience in Spain (Catalonia). *Int J neonatal Screen. Int J Neonatal Screen*; 2021;7.
29. Froehlich M, Schwaneck EC, Gernert M, Gadeholt O, Strunz P-P, Morbach H, et al. Autologous Stem Cell Transplantation in Common Variable Immunodeficiency: A Case of Successful Treatment of Severe Refractory Autoimmune Encephalitis. *Front Immunol. 2020*;11:1317.
30. Kohn LA, Kohn DB. Gene Therapies for Primary Immune Deficiencies. *Front Immunol. Front Immunol*; 2021;12.
31. Ochs HD. Common variable immunodeficiency (CVID): new genetic insight and unanswered questions. *Clin Exp Immunol. 2014*;5–6.
32. Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, et al. Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee. *Pediatrics. 1971*;
33. Bergbreiter A, Salzer U. Common variable immunodeficiency: a multifaceted and puzzling disorder. *Expert Rev Clin Immunol. Expert Rev Clin Immunol*; 2009;5:167–80.
34. Ameratunga R, Woon ST, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for CVID. *Expert Rev. Clin. Immunol. Expert Rev Clin Immunol*; 2014. p. 183–6.



BIBLIOGRAFIA

35. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;4:38–59.
36. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol.* Academic Press Inc.; 1999;93:190–7.
37. Ameratunga R, Woon ST, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin. Exp. Immunol. Clin Exp Immunol;* 2013. p. 203–11.
38. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, et al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology;* 2019;7:1763–70.
39. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Aghamohammadi A. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2020;30:14–34.
40. Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med. Clin Exp Med;* 2004;3:211–7.
41. Gathmann B, Mahlaoui N, Gérard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze I, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol. Elsevier;* 2014;134:116-126.e11.
42. Macpherson ME, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Mollnes TE, Berge RK, et al. Impaired HDL Function Amplifies Systemic Inflammation in Common Variable Immunodeficiency. *Sci Rep.* 2019;9:9427.
43. Cunningham-Rundles C. Common variable immune deficiency: Dissection of the variable. *Immunol Rev.* 2019;287:145–61.
44. Jørgensen SF, Trøseid M, Kummen M, Anmarkrud JA, Michelsen AE, Osnes LT, et al. Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunol.* 2016;9:1455–65.
45. Arroyo-Sánchez D, Cabrera-Marante O, Laguna-Goya R, Almendro-Vázquez P, Carretero O, Gil-Etayo FJ, et al. Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Vaccines in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* Springer; 2022;42:240–52.
46. Wong GK, Huissoon AP. T-cell abnormalities in common variable immunodeficiency: the hidden defect. *J Clin Pathol.* 2016;69:672–6.
47. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytom. Part B - Clin. Cytom. Cytometry B Clin Cytom;* 2008. p. 261–71.

48. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: A new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002;99:1544–51.
49. Piqueras B, Lavenu-Bombléd C, Galicier L, Bergeron-Van Der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003;23:385–400.
50. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111:77–85.
51. Guevara-Hoyer K, Ochoa-Grullón J, Fernández-Arquero M, Cárdenas M, Pérez de Diego R, Sánchez-Ramón S. Serum Free Immunoglobulins Light Chains: A Common Feature of Common Variable Immunodeficiency? *Front Immunol*. Frontiers Media S.A.; 2020;11.
52. Del Pino-Molina L, Rodríguez-Ubrea J, Canizales JT, Coronel-Díaz M, Kulis M, Martín-Subero JJ, et al. Impaired CpG Demethylation in Common Variable Immunodeficiency Associates With B Cell Phenotype and Proliferation Rate. *Front Immunol*. Front Immunol; 2019;10.
53. Rae W. Indications to Epigenetic Dysfunction in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65:101–10.
54. Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. 2016;53:575–90.
55. de Valles-Ibáñez G, Esteve-Solé A, Piquer M, Azucena González-Navarro E, Hernandez-Rodriguez J, Laayouni H, et al. Evaluating the Genetics of Common Variable Immunodeficiency: Monogenetic Model and Beyond. *Front Immunol*. Front Immunol; 2018;9.
56. Stray-Pedersen A, Sorte HS, Samarakoon P, Gambin T, Chinn IK, Coban Akdemir ZH, et al. Primary immunodeficiency diseases: Genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders. *J Allergy Clin Immunol*. J Allergy Clin Immunol; 2017;139:232–45.
57. Lee TK, Gereige JD, Maglione PJ. State-of-the-art diagnostic evaluation of common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. American College of Allergy, Asthma and Immunology; 2021;127:19–27.
58. Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, Martínez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol*. J Allergy Clin Immunol; 2013;131:468–76.

59. Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* Nat Genet; 2007;39:429–30.
60. Tuijnenburg P, Lango Allen H, Burns SO, Greene D, Jansen MH, Staples E, et al. Loss-of-function nuclear factor κ B subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *J Allergy Clin Immunol.* Elsevier; 2018;142:1285.
61. Savinova O V., Hoffmann A, Ghosh G. The Nfkb1 and Nfkb2 Proteins p105 and p100 Function as the Core of High-Molecular-Weight Heterogeneous Complexes. *Mol Cell.* NIH Public Access; 2009;34:591.
62. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol.* J Clin Immunol; 2020;40:66–81.
63. Vermijlen D, Braun MY, Marchant A. Do PI3-kinase mutations drive T cells insane? *Cell Mol Immunol.* Cell Mol Immunol; 2014;11:320–2.
64. Angulo I, Vadas O, Garçon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, et al. Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science.* Science; 2013;342:866–71.
65. Similuk MN, Yan J, Ghosh R, Oler AJ, Franco LM, Setzer M, et al. Clinical Exome Sequencing of 1000 Families with Complex Immune Phenotypes: Towards comprehensive genomic evaluations. *J Allergy Clin Immunol.* J Allergy Clin Immunol; 2022;
66. Rodríguez-Cortez VC, Del Pino-Molina L, Rodríguez-Ubreva J, Ciudad L, Gómez-Cabrero D, Company C, et al. Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-to-memory B-cell transition. *Nat Commun.* 2015;6:7335.
67. Del Pino-Molina L, Rodríguez-Ubreva J, Canizales JT, Coronel-Díaz M, Kulis M, Martín-Subero JI, et al. Impaired CpG demethylation in common variable immunodeficiency associates with B cell phenotype and proliferation rate. *Front Immunol.* Frontiers Media S.A.; 2019;10:878.
68. Rodríguez-Ubreva J, Arutyunyan A, Bonder MJ, Del Pino-Molina L, Clark SJ, de la Calle-Fabregat C, et al. Single-cell Atlas of common variable immunodeficiency shows germinal center-associated epigenetic dysregulation in B-cell responses. *Nat Commun.* Nat Commun; 2022;13:1779.
69. Bonilla FA. Personalized therapy for common variable immunodeficiency. *Allergy Asthma Proc.* OceanSide Publications Inc.; 2020;41:19–25.
70. Diaz N, Juarez M, Cancrini C, Heeg M, Soler-Palacín P, Payne A, et al. Setlelisib for Activated PI3K δ Syndromes: Open-Label Phase 1b and Extension

Studies. *J Immunol*. *J Immunol*; 2020;205:2979–87.

71. Korhonen R, Moilanen E. Abatacept, a novel CD80/86-CD28 T cell costimulation modulator, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; 2009;104:276–84.

72. Houghton PJ, Huang S. mTOR as a target for cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*. *Curr Top Microbiol Immunol*; 2004;279:339–59.

73. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther*. *Cancer Biol Ther*; 2003;2.

74. Wehr C, Gennery AR, Lindemans C, Schulz A, Hoenig M, Marks R, et al. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. Mosby Inc.; 2015;135:988-997.e6.

75. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:191–200.

76. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. Academic Press Inc.; 2001;25:402–8.

77. Abaira V. El índice kappa. *Notas estadísticas | Med Fam Semer*. 2001;27.

78. Lopez-Herrera G, Tampella G, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, Simon AK, Moutschen M, et al. Deleterious Mutations in LRBA Are Associated with a Syndrome of Immune Deficiency and Autoimmunity. *Am J Hum Genet*. 2012;90:986–1001.

79. Soler-Palacín P, Garcia-Prat M, Martín-Nalda A, Franco-Jarava C, Rivière JG, Plaja A, et al. LRBA Deficiency in a Patient With a Novel Homozygous Mutation Due to Chromosome 4 Segmental Uniparental Isodisomy. *Front Immunol*. 2018;9:2397.

80. Halacli SO. Flow Cytometric Approach in the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Cell Interact - Mol Immunol Basis Dis Manag*. IntechOpen; 2021;

81. Öğülür İ, Kıyıkım A, Nain E, Somer A, Güven A, Barış S, et al. LRBA Eksikliği Tanısında Akan Hücre Ölçerinde Protein İfadesi. *Asthma Allergy Immunol*. Turkish National Society of Allergy and Clinical Immunology; 2017;

82. Verma N, Burns SO, Walker LSK, Sansom DM. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. *Clin Exp Immunol*. *Clin Exp Immunol*; 2017;190:1–7.

83. Schwab C, Gabrysch A, Olbrich P, Patiño V, Warnatz K, Wolff D, et al. Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-

insufficient subjects. *J Allergy Clin Immunol.* *J Allergy Clin Immunol*; 2018;142:1932–46.

84. Lorenzini T, Fliegauf M, Klammer N, Frede N, Proietti M, Bulashevskaya A, et al. Characterization of the clinical and immunologic phenotype and management of 157 individuals with 56 distinct heterozygous NFKB1 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* *J Allergy Clin Immunol*; 2020;146:901–11.

85. Dieli-Crimi R, Martínez-Gallo M, Franco-Jarava C, Antolin M, Blasco L, Paramonov I, et al. Th1-skewed profile and excessive production of proinflammatory cytokines in a NFKB1-deficient patient with COVID and severe gastrointestinal manifestations. *Clin Immunol.* 2018;195:49–58.

86. Fliegauf M, L. Bryant V, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, et al. Haploinsufficiency of the NF- κ B1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* Elsevier; 2015;97:389.

87. Franco-Jarava C, Valenzuela I, Rivière JG, Martínez-Gallo M, Dieli-Crimi R, Castells N, et al. Common variable immunodeficiency and neurodevelopmental delay due to a 13Mb deletion on chromosome 4 including the NFKB1 gene: a case report. *Front Immunol.* *Frontiers*; 1AD;0:3102.

88. Singh A, Joshi V, Jindal AK, Mathew B, Rawat A. An updated review on activated PI3 kinase delta syndrome (APDS). *Genes Dis.* *Genes Dis*; 2019;7:67–74.

89. Lucas CL, Zhang Y, Venida A, Wang Y, Hughes J, McElwee J, et al. Heterozygous splice mutation in PIK3R1 causes human immunodeficiency with lymphoproliferation due to dominant activation of PI3K. *J Exp Med.* 2014;211:2537–47.

90. Merico D, Roifman M, Braunschweig U, Yuen RKC, Alexandrova R, Bates A, et al. Compound heterozygous mutations in the noncoding RNU4ATAC cause Roifman Syndrome by disrupting minor intron splicing. *Nat Commun* 2015 61. *Nature Publishing Group*; 2015;6:1–10.

91. Allenspach EJ, Bellodi C, Jeong D, Kopmar N, Nakamura T, Ochs HD, et al. Common variable immunodeficiency as the initial presentation of dyskeratosis congenita. *J Allergy Clin Immunol.* *J Allergy Clin Immunol*; 2013;132:223–6.

92. Boutboul D, Kuehn HS, Van De Wyngaert Z, Niemela JE, Callebaut I, Stoddard J, et al. Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency. *J Clin Invest.* *American Society for Clinical Investigation*; 2018;128:3071.

93. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* *Genes Immun*; 2006;7:85–94.

94. Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, et al. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* *J Allergy Clin Immunol*; 2017;140:223–31.



BIBLIOGRAFIA

95. Eskandarian Z, Fliegauf M, Bulashevskaya A, Proietti M, Hague R, Smulski CR, et al. Assessing the Functional Relevance of Variants in the IKAROS Family Zinc Finger Protein 1 (IKZF1) in a Cohort of Patients With Primary Immunodeficiency. *Front Immunol*. *Front Immunol*; 2019;10:568.
96. Orange JS, Jain A, Ballas ZK, Schneider LC, Geha RS, Bonilla FA. The presentation and natural history of immunodeficiency caused by nuclear factor kappaB essential modulator mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:725–33.
97. Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, et al. Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood*. American Society of Hematology; 2004;103:185–7.
98. Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinemia and carrier females. *Br J Haematol*. *Br J Haematol*; 2001;114:141–9.
99. Conley ME, Farmer DM, Dobbs AK, Howard V, Aiba Y, Shurtleff SA, et al. A minimally hypomorphic mutation in Btk resulting in reduced B cell numbers but no clinical disease. *Clin Exp Immunol*. *Clin Exp Immunol*; 2008;152:39–44.
100. Abbott JK, Ochs HD, Gelfand EW. Coding-region alterations in BTK do not universally cause X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. Elsevier; 2013;132:1246–8.
101. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. *Nat Genet*; 2005;37:829–34.
102. Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*. *Nat Genet*; 2005;37:820–8.
103. Kakkas I, Tsinti G, Kalala F, Farmaki E, Kourakli A, Kapousouzi A, et al. TACI Mutations in Primary Antibody Deficiencies: A Nationwide Study in Greece. *Medicina (Kaunas)*. *Medicina (Kaunas)*; 2021;57.
104. Fried AJ, Rauter I, Dillon SR, Jabara HH, Geha RS. Functional analysis of transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI) mutations associated with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. *J Allergy Clin Immunol*; 2011;128:226–228.e1.
105. Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest*. *J Clin Invest*; 2007;117:1550–7.
106. van Schouwenburg PA, Davenport EE, Kienzler AK, Marwah I, Wright B,



BIBLIOGRAFIA

- Lucas M, et al. Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. *Clin Immunol.* 2015;160:301–14.
107. Martínez-Pomar N, Detková D, Arostegui JI, Alvarez A, Soler-Palacín P, Vidaller A, et al. Role of TNFRSF13B variants in patients with common variable immunodeficiency. *Blood.* 2009;114:2846–8.
108. Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G, et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:1178–85.
109. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarström Q, Jennings S, Lougaris V, et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood.* 2009;113:1967–76.
110. Li J, Lei W, Te, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Lyu B, et al. Biochemically deleterious human NFKB1 variants underlie an autosomal dominant form of common variable immunodeficiency. *J Exp Med.* 2021;218.
111. Aradhya S, Woffendin H, Jakins T, Bardaro T, Esposito T, Smahi A, et al. A recurrent deletion in the ubiquitously expressed NEMO (IKK-gamma) gene accounts for the vast majority of incontinentia pigmenti mutations. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2171–9.
112. Fusco F, Bardaro T, Fimiani G, Mercadante V, Miano MG, Falco G, et al. Molecular analysis of the genetic defect in a large cohort of IP patients and identification of novel NEMO mutations interfering with NF-kappaB activation. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1763–73.
113. Keller MD, Petersen M, Ong P, Church J, Risma K, Burham J, et al. Hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency with coincident NEMO and EDA mutations. *Front Immunol.* 2011;2:1–8.
114. Gautheron J, Pescatore A, Fusco F, Esposito E, Yamaoka S, Agou F, et al. Identification of a new NEMO/TRAF6 interface affected in incontinentia pigmenti pathology. *Hum Mol Genet.* 2010;19:3138–49.
115. Frans G, van der Werff Ten Bosch J, Moens L, Gijsbers R, Changi-Ashtiani M, Rokni-Zadeh H, et al. Functional Evaluation of an IKBKG Variant Suspected to Cause Immunodeficiency Without Ectodermal Dysplasia. *J Clin Immunol.* 2017;37:801–10.
116. Garcia-Carmona Y, Cols M, Ting AT, Radigan L, Yuk FJ, Zhang L, et al. Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI. *Blood.* 2015;125:1749–58.

117. Garcia-Carmona Y, Ting AT, Radigan L, Divakar SKA, Chavez J, Meffre E, et al. TACI Isoforms Regulate Ligand Binding and Receptor Function. *Front Immunol*; 2018;9.
118. Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. 2016;53:575–90.
119. Bittles AH, Black ML. Consanguineous Marriage and Human Evolution. <http://dx.doi.org/101146/annurev.anthro012809105051>. *Annual Reviews*; 2010;39:193–207.
120. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. American Society of Hematology; 2008;111:77–85.
121. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. American Society of Hematology; 2008;112:277–86.
122. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. American Society of Hematology; 2012;119:1650–7.
123. Abolhassani H, Hammarström L, Cunningham-Rundles C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. *Blood*. The American Society of Hematology; 2020;135:656.
124. Bright P, Grigoriadou S, Kamperidis P, Buckland M, Hickey A, Longhurst HJ. Changes in B cell immunophenotype in common variable immunodeficiency: cause or effect - is bronchiectasis indicative of undiagnosed immunodeficiency? *Clin Exp Immunol*. *Clin Exp Immunol*; 2013;171:195–200.
125. Tofighi Zavareh F, Mirshafiey A, Yazdani R, Keshtkar AA, Abolhassani H, Bagheri Y, et al. Lymphocytes subsets in correlation with clinical profile in CVID patients without monogenic defects. *Expert Rev Clin Immunol*. *Expert Rev Clin Immunol*; 2021;1–11.
126. Unsworth DJ, Wallage MJ, Sarkar E, Lock RJ. Abnormalities of serum-free light chain in patients with primary antibody deficiency in the absence of B lymphocyte clonality. *J Clin Pathol*. *J Clin Pathol*; 2012;65:1128–31.
127. Ameratunga R, Lehnert K, Woon S-T. All Patients With Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) Should Be Routinely Offered Diagnostic Genetic Testing. *Front Immunol*. *Front Immunol*; 2019;10:2678.
128. Maffucci P, Filion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova JL, et al. Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol*. *Front Immunol*; 2016;7.

129. Guevara-Hoyer K, Jiménez-Huete A, Vasconcelos J, Neves E, Sánchez-Ramón S. Variable immunodeficiency score upfront analytical link (VISUAL), a proposal for combined prognostic score at diagnosis of common variable immunodeficiency. *Sci Rep*. *Sci Rep*; 2021;11.
130. Abolhassani H, Hammarström L, Cunningham-Rundles C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. *Blood*. *Blood*; 2020;135:656–67.
131. Chinn IK, Orange JS. A 2020 update on the use of genetic testing for patients with primary immunodeficiency. <https://doi.org/101080/1744666X20201814145>. *Taylor & Francis*; 2020;16:897–909.
132. Kiykim A, Ogulur I, Dursun E, Charbonnier LM, Nain E, Cekic S, et al. Abatacept as a Long-Term Targeted Therapy for LRBA Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract*. *J Allergy Clin Immunol Pract*; 2019;7:2790-2800.e15.
133. Seidel MG, Hirschmugl T, Gamez-Diaz L, Schwinger W, Serwas N, Deutschmann A, et al. Long-term remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. *Elsevier*; 2015;135:1384.
134. Seidel MG, Böhm K, Dogu F, Worth A, Thrasher A, Florkin B, et al. Treatment of severe forms of LPS-responsive beige-like anchor protein deficiency with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*. *J Allergy Clin Immunol*; 2018;141:770-775.e1.
135. Slatter MA, Engelhardt KR, Burroughs LM, Arkwright PD, Nademi Z, Skoda-Smith S, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for CTLA4 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. *J Allergy Clin Immunol*; 2016;138:615-619.e1.
136. Saettini F, Pelagatti MA, Sala D, Moratto D, Giliani S, Badolato R, et al. Early diagnosis of PI3K δ syndrome in a 2 years old girl with recurrent otitis and enlarged spleen. *Immunol Lett*. *Elsevier B.V.*; 2017;190:279–81.
137. Rao VK, Webster S, Dalm VASH, Šedivá A, Van Hagen PM, Holland S, et al. Effective “activated PI3K δ syndrome”-targeted therapy with the PI3K δ inhibitor leniolisib. *Blood*. *American Society of Hematology*; 2017;130:2307–16.
138. Hoegenauer K, Soldermann N, Zécri F, Strang RS, Graveleau N, Wolf RM, et al. Discovery of CDZ173 (Leniolisib), Representing a Structurally Novel Class of PI3K Delta-Selective Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. *ACS Med Chem Lett*; 2017;8:975–80.
139. Dimitrova D, Nademi Z, Maccari ME, Ehl S, Uzel G, Tomoda T, et al. International retrospective study of allogeneic hematopoietic cell transplantation for activated PI3K-delta syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. *J Allergy Clin Immunol*; 2022;149:410-421.e7.
140. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans.

Nature [Internet]. Nature; 2020 [cited 2022 Sep 19];581:434–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32461654/>

141. Edwards ESJ, Bosco JJ, Ojaimi S, O’Hehir RE, van Zelm MC. Beyond monogenetic rare variants: tackling the low rate of genetic diagnoses in predominantly antibody deficiency. *Cell Mol Immunol*. Nature Publishing Group; 2021;18:588.

142. Goldman FD, Gurel Z, Al-Zubeidi D, Fried AJ, Icardi M, Song C, et al. Congenital pancytopenia and absence of B lymphocytes in a neonate with a mutation in the Ikaros gene. *Pediatr Blood Cancer*. *Pediatr Blood Cancer*; 2012;58:591–7.

143. Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW, et al. Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med*. *N Engl J Med*; 2016;374:1032–43.

144. Poodt AEJ, Driessen GJA, De Klein A, Van Dongen JJM, Van Der Burg M, De Vries E. TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. *Clin Exp Immunol*; 2009;156:35–9.

145. Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA. TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. *Curr Allergy Asthma Rep*; 2006;6:357–62.

146. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJA, Runyon S, Yan M, Yin JP, et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem*. *J Biol Chem*; 2005;280:7218–27.

147. Aghamohammadi A, Foroughi F, Rezaei N, Dianat S, Solgi G, Amirzargar AA. Mannose-binding lectin polymorphisms in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Med*. *Clin Exp Med*; 2009;9:285–90.

148. Torres-Salido M, Cortés-Hernández J, Balada E, Tarrés MV, Ordi-Ros J. Systemic lupus erythematosus as a first presentation of common variable immunodeficiency associated with infrequent mannose-binding lectin gene polymorphisms. *Rheumatol Int*. *Rheumatol Int*; 2011;31:537–41.

149. Litzman J, Freiberger T, Grimbacher B, Gathmann B, Salzer U, Pavlík T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. *Clin Exp Immunol*; 2008;153:324–30.

150. Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol*. 2000;51:111–22.

151. Aggarwal V, Banday AZ, Jindal AK, Das J, Rawat A. Recent advances in elucidating the genetics of common variable immunodeficiency. *Genes Dis*. *Genes*



BIBLIOGRAFIA

Dis; 2019;7:26–37.

152. Labrador-Horrillo M, Franco-Jarava C, Garcia-Prat M, Parra-Martínez A, Antolín M, Salgado-Perandrés S, et al. Case Report: X-Linked SASH3 Deficiency Presenting as a Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol. Front Immunol*; 2022;13.

XIII. ARTICLES PUBLICATS EN RELACIÓ AMB LA TESI DOCTORAL

VALORS DE NORMALITAT

- 1) **Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population.** Garcia-Prat M, Álvarez-Sierra D, Aguiló-Cucurull A, Salgado-Perandrés S, Briongos-Sebastian S, Franco-Jarava C, Martín-Nalda A, Colobran R, Montserrat I, Hernández-González M, Pujol-Borrell R, Soler-Palacin P, Martínez-Gallo M. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019 May;96(3):223-233. doi: 10.1002/cyto.b.21728. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30334372.
- 2) **Age-specific pediatric reference ranges for immunoglobulins and complement proteins on the Optilite™ automated turbidimetric analyzer.** Garcia-Prat M, Vila-Pijoan G, Martos Gutierrez S, Gala Yerga G, García Guantes E, Martínez-Gallo M, Martín-Nalda A, Soler-Palacín P, Hernández-González M. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jul;32(6):e22420. doi: 10.1002/jcla.22420. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29603375.

DESCRIPCIÓ DE CASOS INCLOSOS A LA COHORT

- 3) **LRBA Deficiency in a Patient With a Novel Homozygous Mutation Due to Chromosome 4 Segmental Uniparental Isodisomy.** Soler-Palacín P, Garcia-Prat M, Martín-Nalda A, Franco-Jarava C, Rivière JG, Plaja A, Bezdán D, Bosio M, Martínez-Gallo M, Ossowski S, Colobran R. *Front Immunol.* 2018 Oct 16;9:2397. doi: 10.3389/fimmu.2018.02397. PMID: 30386343.
- 4) **Common variable immunodeficiency and neurodevelopmental delay due to a 13Mb deletion on chromosome 4 including the NFKB1 gene: a case report.** Clara Franco-Jarava, Irene Valenzuela, Jacques G. Rivière, Marina Garcia-Prat, Mónica Martínez-Gallo, Romina Dieli-Crimi, Neus Castells, Laura Batlle-Masó, Pere Soler-Palacín, Roger Colobran. *Front Immunol.* 2022. doi:10.3389/fimmu.2022.897975. PMID: 35784294.

PARTICIPACIÓ EN ESTUDIS COLLABORATIUS INTERNACIONALS A PARTIR DELS PACIENTS DE LA COHORT

- 5) **International retrospective study of allogeneic hematopoietic cell transplantation for activated PI3K-delta syndrome.** Dimitrova D, Nademi Z, Maccari ME, Ehl S, Uzel G, Tomoda T, Okano T, Imai K, Carpenter B, Ip W, Rao K, Worth AJJ, Laberko A, Mukhina A, Néven B, Moshous D, Speckmann C, Warnatz K, Wehr C, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Bleesing JJ, Dara J, Dvorak CC, Ghosh S, Kang HJ, Markelj G, Modi A, Bayer DK, Notarangelo LD, Schulz A, Garcia-Prat M, Soler-Palacín P, Karakükcü M, Yilmaz E, Gambineri E, Menconi M, Masmás TN, Holm M, Bonfim C, Prando C, Hughes S, Jolles S, Morris EC, Kapoor N, Koltan S, Paneesha S, Steward C, Wynn R, Duffner U, Gennery AR, Lankester AC, Slatter M, Kanakry JA. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Jan;149(1):410-421.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2021.04.036. Epub 2021 May 24. PMID: 34033842.
- 6) **Seletalisib for Activated PI3K δ Syndromes: Open-Label Phase 1b and Extension Studies.** Diaz N, Juarez M, Cancrini C, Heeg M, Soler-Palacín P, Payne A, Johnston GI, Helmer E, Cain D, Mann J, Yuill D, Conti F, Di Cesare S, Ehl S, Garcia-Prat M, Maccari ME, Martín-Nalda A, Martínez-Gallo M, Moshous D, Santilli V, Semeraro M, Simonetti A, Suarez F, Cavazzana M, Kracker S. *J Immunol.* 2020 Dec 1;205(11):2979-2987. doi: 10.4049/jimmunol.2000326. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33115853.
- 7) **CD57 identifies T cells with functional senescence before terminal differentiation and relative telomere shortening in patients with activated PI3 kinase delta syndrome.** Cura Daball P, Ventura Ferreira MS, Ammann S, Klemann C, Lorenz MR, Warthorst U, Leahy TR, Conlon N, Roche J, Soler-Palacín P, Garcia-Prat M, Fuchs I, Fuchs S, Beier F, Brümmendorf TH, Speckmann C, Olbrich P, Neth O, Schwarz K, Ehl S, Rensing-Ehl A. *Immunol Cell Biol.* 2018 Nov;96(10):1060-1071. doi: 10.1111/imcb.12169. Epub 2018 Jun 14. PMID: 29790605.
- 8) **Disease Evolution and Response to Rapamycin in Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome: The European Society for Immunodeficiencies-Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome Registry.** Maccari ME, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Aiuti A, Aleinikova O, Bangs C, Baris S,

Barzaghi F, Baxendale H, Buckland M, Burns SO, Cancrini C, Cant A, Cathébras P, Cavazzana M, Chandra A, Conti F, Coulter T, Devlin LA, Edgar JDM, Faust S, Fischer A, Garcia-Prat M, Hammarström L, Heeg M, Jolles S, Karakoc-Aydiner E, Kindle G, Kiykim A, Kumararatne D, Grimbacher B, Longhurst H, Mahlaoui N, Milota T, Moreira F, Moshous D, Mukhina A, Neth O, Neven B, Nieters A, Olbrich P, Ozen A, Pachlopnik Schmid J, Picard C, Prader S, Rae W, Reichenbach J, Rusch S, Savic S, Scarselli A, Scheible R, Sediva A, Sharapova SO, Shcherbina A, Slatter M, Soler-Palacin P, Stanislas A, Suarez F, Tucci F, Uhlmann A, van Montfrans J, Warnatz K, Williams AP, Wood P, Kracker S, Condliffe AM, Ehl S. *Front Immunol.* 2018 Mar 16;9:543. doi: 10.3389/fimmu.2018.00543. eCollection 2018. PMID: 29599784.

- 9) **Long-term outcome of LRBA deficiency in 76 patients after various treatment modalities as evaluated by the immune deficiency and dysregulation activity (IDDA) score.** Tesch VK, Abolhassani H, Shadur B, Zobel J, Mareika Y, Sharapova S, Karakoc-Aydiner E, Rivière JG, Garcia-Prat M, Moes N, Haerynck F, Gonzales-Granado LI, Santos Pérez JL, Mukhina A, Shcherbina A, Aghamohammadi A, Hammarström L, Dogu F, Haskologlu S, İkinçioğulları AI, Köstel Bal S, Baris S, Kilic SS, Karaca NE, Kutukculer N, Girschick H, Kolios A, Keles S, Uygun V, Stepensky P, Worth A, van Montfrans JM, Peters AMJ, Meyts I, Adeli M, Marzollo A, Padem N, Khojah AM, Chavoshzadeh Z, Avbelj Stefanija M, Bakhtiar S, Florkin B, Meeths M, Gamez L, Grimbacher B, Seppänen MRJ, Lankester A, Gennery AR, Seidel MG; Inborn Errors, Clinical, and Registry Working Parties of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the European Society for Immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2020 May;145(5):1452-1463. doi: 10.1016/j.jaci.2019.12.896. Epub 2019 Dec 27. PMID: 31887391.
- 10) **Initial presenting manifestations in 16,486 patients with inborn errors of immunity include infections and noninfectious manifestations.** Thalhammer J, Kindle G, Nieters A, Rusch S, Seppänen MRJ, Fischer A, Grimbacher B, Edgar D, Buckland M, Mahlaoui N, Ehl S; European Society for Immunodeficiencies Registry Working Party. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Nov;148(5):1332-1341.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2021.04.015. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33895260.

- 11) **Expanding the Clinical and Genetic Spectra of Primary Immunodeficiency-Related Disorders With Clinical Exome Sequencing: Expected and Unexpected Findings.** Rudilla F, Franco-Jarava C, Martínez-Gallo M, García-Prat M, Martín-Nalda A, Rivière J, Aguiló-Cucurull A, Mongay L, Vidal F, Solanich X, Irastorza I, Santos-Pérez JL, Tercedor Sánchez J, Cuscó I, Serra C, Baz-Redón N, Fernández-Cancio M, Carreras C, Vagace JM, Garcia-Patos V, Pujol-Borrell R, Soler-Palacín P, Colobran R. *Front Immunol.* 2019 Oct 1;10:2325. doi: 10.3389/fimmu.2019.02325. PMID: 31681265.
- 12) **Evaluating the Genetics of Common Variable Immunodeficiency: Monogenetic Model and Beyond.** de Valles-Ibáñez G, Esteve-Solé A, Piquer M, González-Navarro EA, Hernandez-Rodriguez J, Laayouni H, González-Roca E, Plaza-Martin AM, Deyà-Martínez Á, Martín-Nalda A, Martínez-Gallo M, García-Prat M, Del Pino-Molina L, Cuscó I, Codina-Solà M, Batlle-Masó L, Solís-Moruno M, Marquès-Bonet T, Bosch E, López-Granados E, Aróstegui JI, Soler-Palacín P, Colobran R, Yagüe J, Alsina L, Juan M, Casals F. *Front Immunol.* 2018 May 14;9:636. doi: 10.3389/fimmu.2018.00636. PMID: 29867916.

A watercolor splash graphic in shades of green and yellow, with a textured, ink-like appearance. The word "ANNEXOS" is centered within this splash.

ANNEXOS

XIV. ANNEXOS

Taula A1. Classificació de les IEI en 10 grups segons la IUIS 2022 [3]

Grup d'IEI	IEI (Gen)
1. Immunodeficiències combinades, que afecten la immunitat cel·lular (T) i humoral (B)	
T-B+ IDCG	Deficiència γ c (<i>IL2RG</i>), deficiència JAK3 (<i>JAK3</i>), deficiència IL-7Ra (<i>IL7R</i>), deficiència CD45 (<i>PTPRC</i>), deficiència CD3d (<i>CD3D</i>), deficiència CD3e (<i>CD3E</i>), deficiència CD3z (<i>CD3Z</i>), deficiència Coronin-1A (<i>CORO1A</i>), deficiència LAT (<i>LAT</i>), deficiència en SLP76 (<i>LCP2</i>)
T-B- IDCG	Deficiència RAG1 (<i>RAG1</i>), deficiència RAG2 (<i>RAG2</i>), deficiència DCLRE1C (Artemis) (<i>DCLRE1C</i>), deficiència DNA PKcs (<i>PRKDC</i>), deficiència Cernunnos (<i>NHEJ1</i>), deficiència lligasa IV ADN (<i>LIG4</i>), Disgenèsia reticular (<i>AK2</i>), deficiència, defecte RAC2 activat (<i>RAC2</i>), Adenosina desaminasa (<i>ADA</i>)
Immunodeficiències combinades generalment menys greus que la IDCG	Deficiència CD40L (<i>CD40LG</i>), deficiència CD40 (<i>CD40</i>), deficiència ICOS (<i>ICOS</i>), deficiència ICOSL (<i>ICOSL</i>), deficiència CD3g (<i>CD3G</i>), deficiència CD8 (<i>CD8A</i>), deficiència ZAP-70 (<i>ZAP70</i>), deficiència MHC classe I (<i>TAP1</i> , <i>TAP2</i> , <i>TAPBP</i> , <i>B2M</i>), deficiència MHC classe II (<i>CIITA</i> , <i>RFX5</i> , <i>RFXANK</i> , <i>RFXAP</i>), deficiència IKAROS (<i>IKZF1</i>), deficiència DOCK8 (<i>DOCK8</i>), deficiència DOCK2 (<i>DOCK2</i>), deficiència RhoH (<i>RHOH</i>), deficiència POLD1 (<i>POLD1</i>), deficiència POLD2 (<i>POLD2</i>), deficiència MST1 (<i>STK4</i>), deficiència TCR α (<i>TRAC</i>), deficiència LCK (<i>LCK</i>), deficiència en ITK (<i>ITK</i>), deficiència MALT1 (<i>MALT1</i>), deficiència CARD11 (<i>CARD11</i>), deficiència BCL10 (<i>BCL10</i>), deficiència IL-21 (<i>IL21</i>), deficiència IL-21R (<i>IL21R</i>), deficiència OX40 (<i>TNFRSF4</i>), deficiència IKBKB (<i>IKBKB</i>), deficiència NIK (<i>MAP3K14</i>), deficiència RelB (<i>RELB</i>), haploinsuficiència RelA (<i>RELA</i>), deficiència Moesin (<i>MSN</i>), deficiència TFRC (<i>TFRC</i>), deficiència c-Rel (<i>REL</i>), deficiència FCHO1 (<i>FCHO1</i>), deficiència PAX1 (<i>PAX1</i>), deficiència ITPKB (<i>ITPKB</i>), deficiència SASH3 (<i>SASH3</i>), deficiència MAN2B2 (<i>MAN2B2</i>), deficiència COPG1 (<i>COPG1</i>), deficiència HELIOS (<i>IKZF2</i>), deficiència IKK α (<i>CHUK</i>)
2. Immunodeficiències combinades amb característiques sindròmiques associades	
Immunodeficiència amb trombocitopènia congènita	Síndrome Wiskott-Aldrich (<i>WAS</i>), deficiència WIP (<i>WIPF1</i>), deficiència ARPC1B (<i>ARPC1B</i>)

Defectes de reparació de l'ADN	Atàxia - telangièctasi (<i>ATM</i>), Síndrome de trencament Nijmegen (<i>NBS1</i>), síndrome Bloom (<i>BLM</i>), immunodeficiència amb inestabilitat centromèrica i anomalies facials (<i>DNMT3B</i> , <i>ZBTB24</i> , <i>CDCA7</i> , <i>HELLS</i>), deficiència PMS2 (<i>PMS2</i>), deficiència RNF168 (<i>RNF168</i>), deficiència MCM4 (<i>MCM4</i>), deficiència POLE1 (<i>POLE1</i>), deficiència POLE2 (<i>POLE2</i>), deficiència lligasa I (<i>LIG1</i>), deficiència NSMCE3 (<i>NSMCE3</i>), deficiència Hebo (<i>ERCC6L2</i>), deficiència GINS1 (<i>GINS1</i>), deficiència MCM10 (<i>MCM10</i>)
Defectes tímics amb altres anomalies congènites	Síndrome DiGeorge (<i>22q11</i> , <i>TBX1</i>), síndrome CHARGE (<i>CHD7</i> , <i>SEMA3E</i>), deficiència FOXN1 "winged helix nude" (<i>FOXN1</i>), haploinsuficiència FOXN1 (<i>FOXN1</i>), síndrome deleció cromosoma 10p13-p14 (<i>Del10p13-p14</i>), síndrome de Jacobsen (<i>11q23del</i>)
Displàsies immuno-òssies	Hipoplàsia capil·lar del cartílag (<i>RMRP</i>), Displàsia immuno-òssia de Schimke (<i>SMARCAL1</i>), deficiència MYSM1 (<i>MYSM1</i>), deficiència MOPD1 (síndrome Roifman) (<i>RNU4ATAC</i>), EXTL3 deficiència (<i>EXTL3</i>)
Síndromes d'Hiper IgE	Síndrome Hiper IgE (<i>STAT3</i>), deficiència receptor IL6 (<i>IL6R</i>), Deficiència del transductor de senyal IL6 (<i>IL6ST – AD o AR –</i>), deficiència ZNF341 (<i>ZNF341</i>), deficiència ERBIN (<i>ERBB2IP</i>), síndrome Loey-Dietz (<i>TGFBR1</i> , <i>TGFBR2</i>), síndrome Comel-Netherton (<i>SPINK5</i>), deficiència PGM3 (<i>PGM3</i>), deficiència CARD11 (<i>CARD11</i>)
Defectes de Vitamina B12 i metabolisme del folat	Deficiència Transcobalamina 2 (<i>TCN2</i>), deficiència SLC46A1 (<i>SLC46A1</i>), deficiència Metilnetetrahidrofolat deshidrogenasa 1 (<i>MTHFD1</i>)
Ectodermodisplàsia anhidròtica amb immunodeficiència (EDA-ID)	NEMO deficiència EDA-ID (<i>IKBK</i>), IKBA GOF (<i>NFKBIA</i>), IKKB GOF (<i>IKKB</i>)
Defectes en els canals de Calci	Deficiència ORAI-1 (<i>ORAI1</i>), deficiència STIM1 (<i>STIM1</i>), deficiència CRACR2A (<i>CRACR2A</i>)
Altres defectes	Deficiència de purina nucleosídica fosforilasa (<i>PNP</i>), immunodeficiència amb múltiples atresies intestinals (<i>TTC7A</i>), síndrome trico-hepato-entèric (<i>TTC37</i> , <i>SKIV2L</i>), Malaltia venooclusiva hepàtica amb immunodeficiència (<i>VOD1</i>) (<i>SP110</i>), deficiència BCL11B (<i>BCL11B</i>), síndrome Vici (<i>EPG5</i>), deficiència HOIL1 (<i>RBCK1</i>), deficiència HOIP (<i>RNF31</i>), Síndrome de Hennekam-limfangiectàsia-limfedema (<i>CCBE1</i> , <i>FAT4</i>), Activació de variants genètiques de novo en factor nuclear semblant a l'eritroide 2 (<i>NFE2L2</i>), STAT5b deficiència (<i>STAT5B</i>), síndrome Kabuki 1 (<i>KMT2D</i>), síndrome Kabuki 2 (<i>KDM6A</i>), deficiència KMT2A (<i>KMT2A</i>), deficiència DIAPH (<i>DIAPH</i>), deficiència AIOLOS (<i>IKZF3</i>), deficiència CD28 (<i>CD28</i>)

3. Defectes predominantment d'anticossos	
Reducció de tots els isotips d'immunoglobulines amb disminució greu o absència de Limfòcits B, agammaglobulinèmia	Deficiència BTK (<i>BTK</i>), deficiència de la cadena pesada μ (<i>IGHM</i>), deficiència $\lambda 5$ (<i>IGLL1</i>), deficiència $Ig\alpha$ (CD79A), $Ig\beta$ deficiència (CD79B), deficiència BLNK (BLNK), deficiència p110 δ (PIK3R1), deficiència p85 (PIK3R1), deficiència factor transcripció E47 (<i>TCF3</i>), deficiència SLC39A7 (<i>SLC39A7</i>), síndrome Hoffman (<i>TOP2B</i>), deficiència FNIP1 (<i>FNIP1</i>), deficiència PU1 (<i>SPI1</i>)
Reducció d'almenys 2 isotips d'immunoglobulines amb nombres normals o disminuïts de Limfòcits B, fenotip IDCV	Immunodeficiència comuna variable, Síndrome p110 δ activada (APDS) (<i>PIK3CD</i> , <i>PIK3R1</i>), deficiència PTEN (<i>PTEN</i>), deficiència CD19 (<i>CD19</i>), deficiència CD81 (<i>CD81</i>), deficiència CD20 (<i>CD20</i>), CD21 deficiència (<i>CD21</i>), deficiència TAC1 (<i>TNFRSF13B</i>), deficiència receptor BAFF (<i>TNFRSF13C</i>), deficiència TWEAK (<i>TNFSF12</i>), deficiència TRNT1 (<i>TRNT1</i>), deficiència NFKB1 (<i>NFKB1</i>), deficiència NFKB2 (<i>NFKB2</i>), deficiència IKAROS (<i>IKZF1</i>), deficiència IRF2BP2 (<i>IRF2BP2</i>), deficiència ATP6AP1 (<i>ATP6AP1</i>), deficiència ARHGEF1 (<i>ARHGEF1</i>), deficiència SH3KBP1 (<i>SH3KBP1</i>), deficiència SEC61A1 (<i>SEC61A1</i>), deficiència RAC2 (<i>RAC2</i>), deficiència de manosil-oligosacàrid glucosidasa (<i>MOGS</i>), deficiència PIK3CG (<i>PIK3CG</i>), deficiència BOB1 (<i>POU2AF1</i>)
Reducció greu d'IgG i d'IgA amb valors d'IgM normals o elevats, i nombres normals de Limfòcits B, Hiper IgM	Deficiència AID (<i>AICDA</i>), deficiència UNG (<i>UNG</i>), deficiència INO80 (<i>INO80</i>), deficiència MSH6 (<i>MSH6</i>), deficiència CTNNBL1 (<i>CTNNBL1</i>), deficiència APRIL (<i>TNFSF13</i>)
Isotips, cadenes lleugeres o deficiències funcionals amb un nombre generalment normal de cèl·lules B	Variants genètiques o delecions a la cadena pesada de les immunoglobulines, deficiència cadena κ (<i>IGKC</i>), deficiència d'IgA i subclases d'IgG, dèficit selectiu d'IgA, deficiència específica d'anticossos amb concentracions normals d'Ig i un nombre normal de cèl·lules B, hipogammaglobulinèmia transitòria de la infància, guany de funció CARD11 (<i>CARD11</i>), dèficit selectiu d'IgM
4. Malalties de disregulació immunològica	
Linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL)	Deficiència perforina (FHL2) (<i>PRF1</i>), deficiència UNC13D/Munc13-4 (FHL3) (<i>UNC13D</i>), deficiència Sintaxina 11 (FHL4) (<i>STX11</i>), deficiència STXBP2 / Munc18-2 (FHL5) (<i>STXBP2</i>), deficiència FAAP24 (<i>FAAP24</i>), deficiència SLC7A7 (<i>SLC7A7</i>), deficiència RHOG (<i>RHOG</i>)
Síndromes FHL amb hipopigmentació	Síndrome Chediak-Higashi (<i>LYST</i>), Síndrome Griscelli tipus 2 (<i>RAB27A</i>), Síndrome Hermansky-Pudlak tipus 2 (<i>AP3B1</i>), Síndrome Hermansky-Pudlak tipus 10 (<i>AP3D1</i>), neofunció CEBPE (<i>CEBPE</i>)
Defectes en Limfòcits T Reguladors	IPEX (<i>FOXP3</i>), deficiència CD25 (<i>IL2RA</i>), deficiència CD122 (<i>IL2RB</i>), haploinsuficiència CTLA4 (<i>CTLA4</i>), deficiència LRBA (<i>LRBA</i>),

	deficiència DEF6 (<i>DEF6</i>), STAT3 GOF (<i>STAT3</i>), deficiència BACH2 (<i>BACH2</i>), deficiència FERMT1 (<i>FERMT1</i>), GOF IKAROS (<i>IKZF1</i>)
Autoimmunitat amb o sense limfoproliferació	APECED (APS-1) poliandocrinopatia autoimmune amb candidiasi i distròfia ectodèrmica (<i>AIRE</i>), deficiència ITCH (<i>ITCH</i>), Deficiència de tripeptidil-peptidasa II (<i>TPP2</i>), JAK1 GOF (<i>JAK1</i>), deficiència prolidasa (<i>PEPD</i>), haploinsuficiència SOCS1 (<i>SOCS1</i>), deficiència PD-1 (<i>PDCD1</i>)
Immunedesregulació amb colitis	Deficiència IL-10 (<i>IL10</i>), deficiència IL-10R (<i>IL10RA, IL10RB</i>), haploinsuficiència NFAT5 (<i>NFAT5</i>), deficiència TGFB1 (<i>TGFB1</i>), deficiència RIPK1 (<i>RIPK1</i>), deficiència ELF4 (<i>ELF4</i>)
Síndrome limfoproliferatiu autoimmune	ALPS-FAS (<i>TNFRSF6</i>), ALPS-FASLG (<i>TNFSF6</i>), ALPS-Caspasa10 (<i>CASP10</i>), ALPS-Caspasa 8 (<i>CASP8</i>), deficiència FADD (<i>FADD</i>)
Susceptibilitat a VEB i condicions limfoproliferatives	deficiència SAP (XLP1) (<i>SH2D1A</i>), deficiència XIAP (XLP2) (<i>XIAP</i>), deficiència CD27 (<i>CD27</i>), deficiència CD70 (<i>CD70</i>), deficiència CTPS1 (<i>CTPS1</i>), deficiència CD137 (<i>TNFRSF9</i>), deficiència RASGRP1 (<i>RASGRP1</i>), deficiència RLTPR (<i>CARMIL2</i>), MAGT1 deficiency, XMEN (<i>MAGT1</i>), deficiència PRKCD (<i>PRKCD</i>), deficiència TET2 (<i>TET2</i>)
5. Defectes congènits de nombre i/o funció dels fagòcits	
Neutropènies congènites	Neutropènia cíclica (<i>ELANE</i>), deficiència GFI 1 (<i>GFI1</i>), deficiència HAX1 (<i>HAX1</i>), deficiència G6PC3 (<i>G6PC3</i>), deficiència VPS45 (<i>VPS45</i>), Malaltia per emmagatzematge del glicogen tipus Ib (<i>G6PT1</i>), neutropenia/ mielodisplàsia lligada al cromosoma X (<i>WAS</i>), deficiència P14/LAMTOR2 (<i>LAMTOR2</i>), Síndrome Barth (<i>TAZ</i>), síndrome Cohen (<i>VPS13B</i>), síndrome Clericuzio (Poikiloderma amb neutropènia) (<i>USBI</i>), deficiència JAGN1 (<i>JAGN1</i>), Acidúria 3-metilglutacònica (<i>CLPB</i>), deficiència G-CSF receptor (<i>CSF3R</i>), deficiència SMARCD2 (<i>SMARCD2</i>), deficiència específica de grànuls (<i>CEBPE</i>), síndrome Shwachman-Diamond (<i>SBDS</i>), deficiència HYOU1 (<i>HYOU1</i>), deficiència SRP54 (<i>SRP54</i>), deficiència CXCR2 (<i>CXCR2</i>)
Defectes de motilitat	Deficiència d'adhesió de leucòcits tipus 1 (LAD1) (<i>ITGB2</i>), Deficiència d'adhesió de leucòcits tipus 2 (LAD2) (<i>SLC35C1</i>), Deficiència d'adhesió de leucòcits tipus 3 (LAD3) (<i>FERMT3</i>), deficiència Rac2 (<i>RAC2</i>), deficiència b-actina (<i>ACTB</i>), Periodontitis juvenil localitzada (<i>FPR1</i>), síndrome Papillon-Lefèvre (<i>CTSC</i>), WDR1 deficiència (<i>WDR1</i>), Fibrosi quística (<i>CFTR</i>), Neutropènia amb immunodeficiència combinada per deficiència de MKL1 (<i>MKL1</i>)

Defectes en l'esclat respiratori	Malaltia granulomatosa crònica lligada al cromosoma X per deficiència gp91 phox (<i>CYBB</i>), Malaltia granulomatosa crònica autosòmica recessiva (<i>CYBA</i> , <i>CYBC1</i> , <i>NCF1</i> , <i>NCF2</i> , <i>NCF4</i>), deficiència G6PD classe I (<i>G6PD</i>)
Altres defectes no limfoides	deficiència GATA2 (<i>GATA2</i>), Proteïnosi alveolar pulmonar (<i>CSF2RA</i> , <i>CSF2RB</i>)
6. Defectes en la immunitat innata	
Susceptibilitat mendeliana a la malaltia micobacteriana	Deficiència a la cadena β 1 dels receptors IL-12 i IL-23 (<i>IL12RB1</i>), deficiència IL-12p40 (<i>IL12B</i>), deficiència IL-12R β 2 (<i>IL12RB2</i>), deficiència IL-23R (<i>IL23R</i>) deficiència receptor 1 IFN- γ (<i>IFNGR1</i>), deficiència receptor 2 IFN- γ (<i>IFNGR2</i>), deficiència STAT1 (<i>STAT1</i>), deficiència Macròfag gp91 phox (<i>CYBB</i>), deficiència IRF8 (<i>IRF8</i>), deficiència SPPL2a (<i>SPPL2A</i>), deficiència Tyk2 (<i>TYK2</i>), homozigotitat P1104A TYK2 (<i>TYK2</i>), deficiència ISG15 (<i>ISG15</i>), deficiència ROR γ t (<i>RORC</i>), deficiència JAK1 (<i>JAK1</i>), deficiència T-bet (<i>TBX21</i>), deficiència IFN γ (<i>IFNG</i>)
Epidermodysplasia verruciformis (VPH)	Deficiència EVER1 (<i>TMC6</i>), EVER2 deficiència (<i>TMC8</i>), deficiència CIB1 WHIM (Berrugues, hipogammaglobulinèmia, infeccions, mielocatèxia) (<i>CXCR4</i>)
Predisposició a infeccions víriques greus	deficiència STAT1 (<i>STAT1</i>), deficiència STAT2 (<i>STAT2</i>), deficiència IRF9 (<i>IRF9</i>), IRF7 deficiència (<i>IRF7</i>), deficiència IFNAR1 (<i>IFNAR1</i>), deficiència IFNAR2 (<i>IFNAR2</i>), deficiència CD16 (<i>FCGR3A</i>), MDA5 deficiència (<i>IFIH1</i>), deficiència NOS2 (<i>NOS2</i>), deficiència ZNFX1 (<i>ZNFX1</i>), deficiència RNA polimerasa III (<i>POLR3A</i> , <i>POLR3C</i> , <i>POLR3F</i>)
Encefalitis herpètiques	deficiència TLR3 (<i>TLR3</i>), deficiència UNC93B1 (<i>UNC93B1</i>), deficiència TRAF3 (<i>TRAF3</i>), deficiència TRIF (<i>TICAM1</i>), deficiència TBK1 (<i>TBK1</i>), deficiència IRF3 (<i>IRF3</i>), deficiència DBR1 (<i>DBR1</i>), deficiència SNORA31 (<i>SNORA31</i>), deficiència ATG4A (<i>ATG4A</i>), deficiència MAP1LC3B2 (<i>MAP1LC3B2</i>)
Predisposició a infeccions fúngiques invasives	deficiència CARD9 (<i>CARD9</i>)
Predisposició a candidiàsis mucocutànies	Deficiència IL-17RA (<i>IL17RA</i>), deficiència IL-17RC (<i>IL17RC</i>), deficiència IL-17F (<i>IL17F</i>), STAT1 GOF (<i>STAT1</i>), deficiència ACT1 (<i>TRAF3IP2</i>), haploinsuficiència JNK1 (<i>MAPK8</i>)
Deficiència en la senyalització a través de TLR amb susceptibilitat bacteriana	Deficiència IRAK-4 (<i>IRAK4</i>), deficiència MyD88 (<i>MYD88</i>), deficiència IRAK1 (<i>IRAK1</i>), deficiència TIRAP (<i>TIRAP</i>), deficiència TLR7 (<i>TLR7</i>), GOF TLR8 (<i>TLR8</i>)

<p>Altres defectes innats d'immunitat relacionats amb teixits no hematopoètics</p>	<p>Asplènia congènita aïllada (<i>RPSA</i>, <i>HMOX</i>), Trypanosomiasis (<i>APOLI</i>), deficiència NBAS (<i>NBAS</i>), Encefalopatia aguda necrotitzant (<i>RANBP2</i>), osteopetrosi (<i>CLCN7</i>, <i>SNX10</i>, <i>OSTM1</i>, <i>PLEKHM1</i>, <i>TCIRG1</i>, <i>TNFRSF11A</i>, <i>TNFSF11</i>), hidradenitis suppurativa (<i>NCSTN</i>, <i>PSEN</i>, <i>PSENE1</i>)</p>
<p>Altres errors innats d'immunitat relacionats amb els leucòcits</p>	<p>Haploinsuficiència IRF4 (<i>IRF4</i>), deficiència IL-18BP (<i>IL18BP</i>)</p>
<p>7. Desordres autoinflamatoris</p>	
<p>Interferonopaties de tipus I</p>	<p>Vasculopatia associada a STING, d'inici infantil (<i>TMEM173 –AD o AR</i>), deficiència ADA2 (<i>ADA2</i>), deficiència TREX1 (<i>TREX1</i>), Aicardi-Goutieres syndrome 1 (AGS1) (<i>TREX1</i>), deficiència RNASEH2A AGS4 (<i>RNASEH2A</i>), deficiència RNASEH2B AGS2 (<i>RNASEH2B</i>), deficiència RNASEH2C AGS3 (<i>RNASEH2C</i>), deficiència SAMHD1 (<i>SAMHD1</i>), deficiència ADAR1, AGS6 (<i>ADAR1</i>), síndrome Aicardi-Goutieres 7 (AGS7) (<i>IFIH1</i>), deficiència DNase II (<i>DNASE2</i>), Lupus eritematos sistèmic pediàtric per deficiència de DNASE1L3 (<i>DNASE1L3</i>), deficiència LSM11 (<i>LSM11</i>), deficiència RNU7-1 (<i>RNU7-1</i>), Espondiloenchondrodisplàsia amb desregulació immune (<i>SPENCD</i>) (<i>ACP5</i>), Trastorn pigmentari reticulat lligat al cromosoma X (<i>POLA1</i>), deficiència USP18 (<i>USP18</i>), deficiència OAS1 (<i>OAS1</i>), deficiència CDC42 (<i>CDC42</i>), LOF/regulació STAT2 R148 (<i>STAT2</i>), deficiència ATAD3A (<i>ATAD3A</i>)</p>
<p>Defectes que afecten a l'inflamasoma</p>	<p>Febre Mediterrània familiar (<i>MEFV</i>), deficiència Mevalonat quinasa (Hyper IgD syndrome) (<i>MVK</i>), síndrome Muckle-Wells (<i>NLRP3</i>), Malaltia inflamàtoria multisistema d'aparició neonatal (NOMID) o síndrome cutània i articular neurològica infantil crònica (CINCA), Síndrome autoinflamàtoria del fred familiar (<i>NLRP12</i>), NLRC4-MAS (síndrome d'activació de macròfags) (<i>NLRC4</i>), PLAID (PLCγ2 associada a deficiència d'anticossos i desregulació immune) (<i>PLCG2</i>), Autoinflamatori del fred familiar síndrome 3 o APLAID (c2120A> C), deficiència NLRP1 (<i>NLRP1</i>), deficiència RIPK1 (<i>RIPK1</i>)</p>
<p>Condicions no relacionades amb l'inflamasoma</p>	<p>Síndrome periòdica associada al receptor de TNF (TRAPS) (<i>TNFRSF1A</i>), Síndrome amb artritis estèril piogènica, pioderma gangrenosa i acne (PAPA) (<i>PSTPIP1</i>), síndrome Blau (<i>NOD2</i>), deficiència ADAM17 (<i>ADAM17</i>), Osteomielitis multifocal crònica recurrent i anèmia diseritropoètica congènita (síndrome Majeed)* (<i>LPIN2</i>), DIRA (Deficiència receptor d'interleucina 1 Antagonista) (<i>IL1RN</i>), DITRA – Deficiència receptor IL-36 antagonista (<i>IL36RN</i>), variant a SLC29A3 (<i>SLC29A3</i>), CAMPS (<i>CARD14</i>), Querubisme</p>

	(<i>SH3BP2</i>), <i>CANDLE</i> (<i>PSMB8</i> , <i>PSMG2</i>), defecte <i>COPA</i> (<i>COPA</i>), Otulipenia/ORAS (<i>OTULIN</i>), deficiència <i>A20</i> (<i>TNFAIP3</i>), deficiència <i>AP1S3</i> (<i>AP1S3</i>), deficiència <i>ALPI</i> (<i>ALPI</i>), <i>TRIM22</i> (<i>TRIM22</i>), Limfoma de cèl·lules T subcutani semblant a paniculitis (deficiència de <i>TIM3</i>) (<i>HAVCR2</i>), deficiència <i>C2orf69</i> (<i>C2orf69</i>), deficiència <i>NCKAP1L</i> (<i>NCKAP1L</i>), <i>GOF SYK</i> (<i>SYK</i>), <i>GOF HCK</i> (<i>HCK</i>), <i>GOF</i> <i>PSMB9</i> (<i>PSMB9</i>), deleció exó 5 <i>NEMO</i> (<i>IKBKG</i>), deficiència <i>TBK1</i> (<i>TBK1</i>)
8. Deficiències del complement	
Deficiències en components de la cascada del complement	Deficiència <i>C1q</i> (<i>C1QA</i> , <i>C1QB</i> , <i>C1QC</i>), deficiència <i>C1r</i> (<i>C1R</i>), deficiència <i>C1s</i> (<i>C1S</i>), deficiència <i>C4</i> (<i>C4A</i> , <i>C4B</i>), deficiència <i>C2</i> (<i>C2</i>), deficiència <i>C3</i> (<i>C3</i>), <i>C3 GOF</i> (<i>C3</i>), deficiència <i>C5</i> (<i>C5</i>), deficiència <i>C6</i> (<i>C6</i>), deficiència <i>C7</i> (<i>C7</i>), deficiència <i>C8a</i> (<i>C8A</i>), deficiència <i>C8γ</i> (<i>C8G</i>), deficiència <i>C8β</i> (<i>C8B</i>), deficiència <i>C9</i> (<i>C9</i>), deficiència <i>MASP2</i> (<i>MASP2</i>), deficiència <i>Ficolin 3</i> (<i>FCN3</i>)
Deficiències en reguladors de la cascada del complement	Deficiència <i>C1</i> inhibidor (<i>SERPING1</i>), factor <i>B GOF</i> (<i>CFB</i>), deficiència factor (<i>CFB</i>), deficiència factor <i>D</i> (<i>CFD</i>), deficiència properdina (<i>CFP</i>), deficiència factor <i>I</i> (<i>CFI</i>), deficiència factor <i>H</i> (<i>CFH</i>), Deficiències de proteïnes relacionades amb el factor <i>H</i> (<i>CFHR1</i> , <i>CFHR2</i> , <i>CFHR3</i> , <i>CFHR4</i> , <i>CFHR5</i>), deficiència <i>Trombomodulina</i> (<i>THBD</i>), deficiència proteïna de cofactor de membrana (<i>CD46</i>), deficiència inhibidor del complex d'atac de membranes (<i>CD59</i>), deficiència <i>CD55</i> (<i>CHAPEL</i>) (<i>CD55</i>)
9. Insuficiència de medul·la òssia	
Anèmia de Fanconi	Anèmia de Fanconi tipus <i>A</i> (<i>FANCA</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>B</i> (<i>FANCB</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>C</i> (<i>FANCC</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>D1</i> (<i>BRCA2</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>D2</i> (<i>FANCD2</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>E</i> (<i>FANCE</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>F</i> (<i>FANCF</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>G</i> (<i>XRCC9</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>I</i> (<i>FANCI</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>J</i> (<i>BRIP1</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>L</i> (<i>FANCL</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>M</i> (<i>FANCM</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>N</i> (<i>PALB2</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>O</i> (<i>RAD51C</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>P</i> (<i>SLX4</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>Q</i> (<i>ERCC4</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>R</i> (<i>RAD51</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>S</i> (<i>BRCA1</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>T</i> (<i>UBE2T</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>U</i> (<i>XRCC2</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>V</i> (<i>MAD2L2</i>), Anèmia de Fanconi tipus <i>W</i> (<i>RFWD3</i>).
MIRAGE (mielodisplàsia, infecció, restricció del creixement, hipoplàsia)	Deficiència en <i>SAMD9</i> (<i>SAMD9</i>)

suprarenal, fenotips genitals, enteropatia)	
Síndrome d'atàxia pancitopènia	Deficiència en SAMD9L (<i>SAMD9L</i>)
Disqueratosis congènita	DKCX1 (<i>DKC1</i>), DKCA1 (<i>TERC</i>), DKCA2 (<i>TERT</i>), DKCA3 (<i>TINF2</i>), DKCA4 (<i>RTEL1</i>), DKCA5 (<i>TINF2</i>), DKCA6 (<i>ACD</i>), DKCB1 (<i>NOLA3</i>), DKCB2 (<i>NOLA2</i>), DKCB3 (<i>WRAP53</i>), DKCB4 (<i>TERT</i>), DKCB5 (<i>RTEL1</i>), DKCB6 (<i>PARN</i>), DKCB7 (<i>ACD</i>)
Síndromes de fracàs de medul·la òssia (BMF)	BMFS1 Deficiència en SRP72 (<i>SRP72</i>), BMFS2 (<i>ERCC6L2</i>), BMFS5 (<i>TP53</i>)
Microangiopatia cerebroretinal amb calcificacions i quists (Coats plus syndrome)	Deficiència en STN1 (<i>STN1</i>), Deficiència en CTC1 (<i>CTC1</i>), deficiència MECOM (<i>MECOM</i>)
10. Fenocòpies d'IEI	
Associat a variants genètiques somàtiques	Síndrome limfoproliferatiu autoimmune (ALPS) (<i>TNFRSF6</i>), Malaltia limfoproliferativa autoimmune associada a RAS (RALD) (<i>KRAS</i> , <i>NRAS</i>), Criopirinopatia (<i>NLRP3</i>), síndrome hipereosinofílica (<i>STAT5b</i>), síndrome VEXAS (vacúols, enzim E1, lligat a X, autoinflamatori, somàtica), GOF TLR8.
Associat amb autoanticossos	Chronic mucocutaneous candidiasis (isolated or with APECED syndrome), Adult-onset immunodeficiency with susceptibility to mycobacteria, Recurrent skin infection, Pulmonary alveolar proteinosis, Acquired angioedema, Atypical hemolytic-uremic syndrome, Thymoma with hypogammaglobulinemia (Good syndrome), COVID-19 greu (Autoanticossos a IFNs tipus I (INF α , INF ω))

Taula A2. 323 gens inclosos al panell genètic d'IEI (2018-2021)

ACP5	CD3Z	FASLG	IRAK4	NFKB2	SH2D1A	TRAF3IP2
ACTB	CD40	FCGR1A	IRF7	NFKBIA	SH3BP2	TREX1
ADA	CD40LG	FCGR2A	IRF8	NHEJ1	SKIV2L	TRNT1
ADAM17	CD46	FCGR2B	ISG15	NHP2	SLC11A1	TTC37
ADAMTS13	CD55	FCGR3A	ITCH	NLRC4	SLC29A3	TTC7A
ADAR	CD59	FCGR3B	ITGB2	NLRP12	SLC35C1	TYK2
AICDA	CD70	FCGRT	ITK	NLRP3	SLC37A4	UNC119
AIRE	CD79A	FCN3	JAGN1	NOD2	SLC46A1	UNC13D
AK2	CD79B	FERMT3	JAK2	NOP10	SMARCAL1	UNC93B1
AKT1	CD81	FOXN1	JAK3	NRAS	SP110	UNG
AP3B1	CD8A	FOXP3	KRAS	ORAI1	SPINK5	USB1
AP3D1	CEBPE	FPR1	LAMTOR2	PARN	STAT1	VPREB1
AP4E1	CECR1	G6PC	LAT	PAX5	STAT2	VPS13B
APOL1	CFB	G6PC3	LCK	PGM3	STAT3	VPS45
ARPC1B	CFD	G6PD	LIG1	PIGA	STAT5B	WAS
ATM	CFH	G6PT1	LIG4	PIK3CD	STIM1	WASF2
BLM	CFI	GATA2	LMNA	PIK3R1	STK4	WIPF1
BLNK	CFP	GFI1	LPIN2	PLCG2	STN1	WRAP53
BLOC1S6	CHD7	GIMAP5	LRBA	PMS2	STX11	XIAP
BTK	CIITA	GP1BA	LRR8A	PNP	STXBP2	XRCC4
C1QA	CLEC7A	HAX1	LYST	POLE1	TAP1	ZAP70
C1QB	CLPB	ICOS	MAGT1	PRF1	TAP2	ZBTB24
C1QC	COH1	IFIH1	MALT1	PRKCD	TAPBP	ZNF345
C1R	COLEC11	IFNGR1	MAP3K14	PRKDC	TAZ	
C1S	COPA	IFNGR2	MASP1	PSMB8	TBK1	
C2	CORO1A	IGHA1	MASP2	PSTPIP1	TBX1	
C3	CR2	IGHG2	MBL2	PTPRC	TCF3	
C4A	CSF2RA	IGHM	MCM10	RAB27A	TCIRG1	
C4B	CSF3R	IGLL1	MCM4	RAC2	TCN2	
C4BPA	CTLA4	IKBA	MEFV	RAG1	TERC	
C4BPB	CTPS1	IKBKB	MKL1	RAG2	TERT	
C5	CTSC	IKBKG	MLPH	RASGRP1	TFRC	
C6	CXCR4	IKZF1	MMACHC	RASGRP2	THBD	
C7	CYBA	IL10	MPO	RBCK1	TICAM1	
C8A	CYBB	IL10RA	MRE11A	RECQL4	TINF2	
C8B	DCLRE1B	IL10RB	MS4A1	RFX5	TLR3	
C8G	DCLRE1C	IL12B	MSH6	RFXANK	TMC6	
C9	DEPTOR	IL12RB1	MSN	RFXAP	TMC8	
CARD11	DGKE	IL17F	MTHFD1	RMRP	TMEM173	
CARD14	DKC1	IL17RA	MVK	RNASEH2A	TNFAIP3	
CARD9	DNMT3B	IL17RC	MYD88	RNASEH2B	TNFRSF11A	
CARMIL2	DOCK2	IL18	MYO5A	RNASEH2C	TNFRSF13B	
CASP10	DOCK8	IL1RN	NBN	RNF168	TNFRSF13C	
CASP8	ELANE	IL21	NBS1	RNF31	TNFRSF1A	
CD19	ELF4	IL21R	NCF1	RORC	TNFRSF4	
CD247	EPG5	IL2RA	NCF2	RPSA	TNFRSF6	
CD27	F12	IL2RG	NCF4	RTEL1	TNFSF12	
CD3D	FADD	IL36RN	NEIL3	SAMHD1	TNFSF6	
CD3E	FAM105B	IL7R	NFAT5	SBDS	TRAC	
CD3G	FAS	INO80	NFKB1	SERPING1	TRAF3	

