

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización clínica y funcional de las inmunodeficiencias
primarias y sus implicaciones terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Ignacio González Granado

Directores

Jesús Ruiz Contreras
Jaime de Inocencio Arocena
Luis M. Allende Martínez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

FACULTAD DE MEDICINA



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LAS
INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS Y SUS IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Ignacio González Granada

Madrid 2023

Directores:

Jesús Ruiz Contreras

Jaime de Inocencio Arocena

Luis M. Allende Martínez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INVESTIGACION EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LAS
INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS Y SUS IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Ignacio González Granado

Madrid 2023

Directores:

Jesús Ruiz Contreras

Jaime de Inocencio Arocena

Luis M. Allende Martínez

AGRADECIMIENTOS

nanos gigantum humeris insidentes

Quiero mostrar mi agradecimiento a la generosidad de todos los compañeros con los que he ido aprendiendo este arte. A los pacientes, que nos enseñan cada día que siempre hay algo por mejorar. A Enrique González Sarmiento, mi maestro, por enseñarme cómo tratar a los pacientes con delicadeza y profesionalidad. A José Luis Pérez Castrillón, de quien aprendí que cualquier pista es buena cuando el olfato clínico está bien entrenado. A Juan Carlos Martín Escudero y su conciliación de Ética y Medicina. A JR Regueiro, en cuyo libro aprendí las primeras nociones y de quien he podido seguir aprendiendo de su extraordinaria inteligencia. Jesús Ruiz Contreras, el clínico a quien he visto diagnosticar pacientes que pensé que era imposible hacerlo. Por la ayuda de referentes en este campo como los Dres Rosenzweig, Seppanen y Notarangelo. A mis directores de tesis, por su ayuda en este último tramo (Gracias Jaime por este último empujón y Jesusluis por preguntar por la tesis en cada reunión familiar). Maite (y su elegancia irreplicable) con quien he trabajado codo con codo estos últimos 15. A mis camaradas de vocación Inés y Silvia, yendo siempre más allá de la fatiga con serenidad e inteligencia. A mis amigos de siempre, por compartir la ilusión de derribar fronteras para ampliar espacios: Gonzalo (e Isa), Diego, Jose, mostrando que la bondad es una forma suprema de la inteligencia y de ser en el mundo.

A mis abuelos y a mi madre, porque la Estrella que se fija en el cielo son los valores que guían el camino. Un camino imposible de recorrer si no hubiera sido por su dedicación abnegada en esos ojos que nos miran y nos miran anhelando/salvarnos de los fríos más futuros.

A Nerea, con su palabra precisa y la mirada constante, compartiendo un mismo modo de mirar el mundo unas veces, complementario otras -poliédrico siempre-. Y siempre generosa, en este fascinante viaje que es el mundo y la vida.

ABREVIATURAS

RESUMEN / SUMMARY

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Concepto

1.2. Epidemiología

1.3. Inmunodeficiencias humorales: Inmunodeficiencia variable común

1.4. Inmunodeficiencia combinada / Inmunodeficiencia combinada grave

1.5. Diagnóstico de laboratorio en los pacientes con errores innatos de la inmunidad

1.6. Diagnóstico molecular

1.7. Complicaciones de los pacientes con errores innatos de la inmunidad

1.7.1. Infecciones

1.7.2. Desregulación

1.7.3. Cáncer

1.8. Tratamiento de soporte

1.8.1. Profilaxis antibiótica

1.8.2. Vacunación en el paciente con errores innatos de la inmunidad

1.8.3. Tratamiento sustitutivo con gammaglobulina inespecífica

1.8.4. Terapias celulares: TPH y terapia génica.

1.9. Novedades descritas desde la publicación de los artículos de este trabajo

2. OBJETIVOS

3. PUBLICACIONES.

Capítulo 1. Acquired and Innate Immunity Impairment and Severe Disseminated

Mycobacterium genavense Infection in a Patient With a *NFKB1* Deficiency.

Capítulo 2. Extreme Phenotypes With Identical Mutations: Two Patients With Same Non-sense

NHEJ1 Homozygous Mutation.

Capítulo 3. Disseminated abscesses due to *Mycoplasma faucium* in a patient with activated

PI3K δ syndrome type 2.

4. DISCUSIÓN

4.1. Manifestaciones clínicas

4.1.1 Fallo de medro

4.1.2 Microcefalia

4.1.3 Citopenias autoinmunes

4.1.4. Infección oportunista

4.2. La importancia del estudio inmunológico

4.2.1. Función tímica: TRECs

4.2.2. Inmunosenescencia y susceptibilidad al cáncer

4.2.3. Mecanismos generales de la inmunidad adaptativa: Recombinación VDJ

4.2.4. Linfocitos T foliculares

4.2.5. Linfocitos T no convencionales. El papel de las células MAIT.

4.2.6. Otros defectos en linfocito T no dependientes del mecanismo de recombinación VDJ

4.2.7. Linfocito B - Cambio de clase de inmunoglobulina e hipermutación somática

4.3. Diagnóstico molecular

4.4. Tratamiento

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ACMG	American College of Medical Genetics
ACMS	Association for Clinical Genomic Science
AD	Autosómico Dominante
ADA	Adenosina Deaminasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
APDS	Activated PI3K-Delta Syndrome
AR	Autosómico Recesivo
ARN (m)	Ácido Ribonucleico (mensajero)
ATM	Protein Kinase ataxia-telangiectasia mutated
BCL10	B-cell lymphoma/leukemia 10
cDNA	ADN complementario
CATCH22q11	Síndrome CATCH22q11
CGH	Comparative Genome Hybridization, (hibridación genómica comparada)
CMMRD	Deficiencia constitucional en la reparación de errores de apareamiento (Constitutional mismatch repair deficiency)
CMV	Citomegalovirus

Ct	Carboxi-terminal
cTFH	Linfocito T folicular cooperador, circulante
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 deficiency (Ag-4 asociado al Linfocito T Citotóxico)
CYBB	Cytochrome B-245 Beta Chain
DADA2	Deficiencia Adenosina Deaminasa isoforma 2
EGC	Enfermedad Granulomatosa Crónica
GOF	Gain Of Function, ganancia de función
HCL	Histiocitosis de células de Langerhans
HLA	Human Leukocyte Antigen, antígeno leucocitario humano
HLHp	Síndrome hemofagocítico primario
H2AX	Histona X de la familia H2A
IDC	Inmunodeficiencia combinada
IDCP	Inmunodeficiencia combinada profunda
IDCG	Inmunodeficiencia combinada grave
IDCG-X	Inmunodeficiencia combinada severa ligada a cromosoma X

IDCV	Inmunodeficiencia común variable
IDP	Inmunodeficiencia Primaria
IDS	Inmunodeficiencia secundaria
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón gamma
IFNGR1	Receptor 2 del interferón gamma
IFNGR2	Receptor 1 del interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina-1 (Insulin growth factor, IGF-1)
IGIV	Inmunoglobulina endovenosa
IGSC	Inmunoglobulina subcutánea
IGSCfh	Inmunoglobulina subcutánea facilitada con hialuronidasa recombinante
I κ B α	Inhibidor de la subunidad alpha del factor nuclear kappa-B
IKK β	Inhibidor de la subunidad β de la quinasa del factor nuclear kappa-B
IKK γ	Inhibidor de la subunidad γ de la quinasa del factor nuclear kappa-B

IL	Interleuquina
IL2RG	Receptor de interleuquina 2 subunidad Gamma
IL-6	Interleuquina 6
IL7RA	Cadena alpha receptor de IL-7
IL-8	Interleuquina 8
IL12B	Interleuquina 12 beta
IL12RB1	Receptor β 1 de la interleuquina 12
IL12RB2	Receptor β 2 de la interleuquina 12
IL17	Interleuquina 17
IL22	Interleuquina 22
IL23R	Receptor de la interleuquina 23
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF7	Interferon regulatory factor 7
IRF8	Interferon regulatory factor 8
IRF9	Interferon regulatory factor 9
ISG15	Interferon-stimulated gene 15

IUIS	International Union of Immunological Societies
JMF	Jeffrey Modell Foundation
JAK1	Janus kinase 1
Kb	Kilobase
LIG4	ADN Ligase 4
LOF	Loss Of Function (pérdida de función)
LPS	Lipopolisacárido
LRBA	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (proteína de anclaje tipo beige que responde a lipopolisacáridos)
MAF	Minor allele frequency
MAIT	Mucosal-associated invariant T-cells (Célula T invariante asociada a mucosas)
ME	Memoria efectora
mNGS	Metagenomic Next Generation Sequencing (secuenciación masiva metagenómica de nueva generación)
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein

MSMD	Mendelian Susceptibility Mycobacterial Disease (Susceptibilidad Mendeliana a Infección por Micobacterias)
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	NEMO, Nuclear Factor kappa B. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ1	Non-Homologous End Joining Factor 1
NK	Natural Killer
Nt	Amino-terminal
P1	Paciente 1
P2	Paciente 2
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica PBS Buffer fosfato salino
Pb	Pares de bases

PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PE	Ficoeritrina
PI(4,5)P2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKC θ	Proteína quinasa C- θ
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Poly I:C	Ácido poli inosínico policitidílico
PTPRC	Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo C
RAG1	Recombination activating gene 1
RAG2	Recombination activating gene 2
RALD	RAS Associated Lymphoproliferative Disease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RPSA	Ribosomal Protein SA
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase chain reaction
RTE	Recent Thymic Emigrants
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

SPPL2A	Signal peptide peptidase-like 2A
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT2	Signal Transducer and Activator of Transcription 2
TBX21	T-box transcription factor TBX21
TCR	T-cell receptor
Th	Linfocito T helper
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Tumor Necrosis Factor, Factor de necrosis tumoral
TREC	T-cell receptor excision circle
Treg	Linfocito T regulador
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
Tyk2	Tyrosine Kinase 2
SV	Supervivencia
UI	Unidades Internacionales
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus Papiloma Humano
WES	Whole Exome Sequencing (exoma)
WGS	Whole Genome Sequencing (genoma)

WT

Wild type

XL

X linked (ligado al cromosoma X)

RESUMEN

Caracterización clínica, molecular y funcional de las inmunodeficiencias primarias e implicaciones terapéuticas

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) o errores innatos de la inmunidad (EII) consisten en el defecto por número o función, exceso o defecto, en las células del sistema inmune, constituyendo 485 entidades diferenciadas en la actualidad. El retraso diagnóstico se puede acortar con la implementación de las técnicas de secuenciación masiva gracias a la disminución de los costes de secuenciación. Mediante este abordaje se identifican 4 familias con 3 defectos monogénicos distintos: *NFKB1*, *NHEJ1* y *PIK3R1*. Se analizan las características clínicas, inmunológicas y genéticas de los pacientes incluidos y se comparan con las cohortes de la literatura y las comorbilidades de los pacientes, tanto con inmunodeficiencia variable común como con deficiencias celulares (con sus complicaciones más habituales: infección oportunista, desregulación y cáncer), así como los defectos inmunológicos intrínsecos subyacentes (cambio de clase, hipermutación somática, recombinación VDJ, inmunosenescencia y el binomio reparación DNA-radiosensibilidad). Los pacientes con EII en general y las familias incluidas en este trabajo en particular muestran fenómenos de penetrancia incompleta y expresividad variable. Se discuten las alternativas terapéuticas a partir de dichos defectos monogénicos y la toma de decisiones a partir de la variabilidad del fenotipo (clínico, inmunológico y genético) para hacer posible el empleo de una medicina personalizada.

De las 4 familias estudiadas, se describen dos casos no relacionados de deficiencia de *Cernunnos/XLF*. Sendos pacientes presentan un defecto similar de reparación e incremento en la

radiosensibilidad celular a la radiación ionizante demostrado en ensayos “*in vitro*”. Sin embargo, el perfil clínico e inmunológico fue extremadamente diverso: el primero de los pacientes mostró un fenotipo de inmunodeficiencia combinada mientras que el segundo de ellos presentó una deficiencia aislada de IgA. Otros dos pacientes fueron identificados a raíz de una infección oportunista. En el primer caso, se identificó un síndrome APDS2 (*Activated Phosphoinositide 3-kinase D Syndrome type 2*, por deficiencia en *PIK3R1*). Este defecto puede provocar infección precoz y de larga duración por *M. faucium* en ausencia de fenotipo hiperIgM. La secuenciación del rRNA 16S de las muestras microbiológicas fue clave para el diagnóstico molecular. El tratamiento antibiótico de combinación con el uso de la radiología intervencionista puede ser útil en la erradicación de abscesos gigantes en pacientes con inmunodeficiencias primarias. En el último paciente descrito desarrolló una infección diseminada por *M. genavense* presentando una variante sinónima en *NFKB1* en el estudio molecular cuya patogenicidad se demostró mediante estudios de mRNA y proteína.

SUMMARY

Clinical, molecular and functional characterization of primary immunodeficiencies and therapeutic implications.

Primary immunodeficiencies (PIDs) or inborn errors of immunity (IEI) consist of defect by number or function, excess or defect, in the cells of the immune system, constituting 485 differentiated entities at present. This approach identifies 4 families with 3 distinct monogenic defects: *NFKB1*, *NHEJ1* and *PIK3R1*. Clinical, immunological and genetic characteristics of the patients included in the present text are analyzed and compared with literature cohorts and the comorbidities of patients with both common variable immunodeficiency and cellular deficiencies (with their most common complications: opportunistic infection, dysregulation and cancer), as well as the underlying intrinsic immunological defects (class switching, somatic hypermutation, VDJ recombination, immunosenescence and the DNA repair-radiosensitivity binomial). IBID patients in general and the families included in this work in particular show phenomena of incomplete penetrance and variable expressivity. Therapeutic alternatives based on these monogenic defects and decision making based on phenotype variability (clinical, immunological and genetic) are discussed in order to make possible the use of personalized medicine.

Of the 4 families studied, 2 unrelated cases of *Cernunnos/XLF* deficiency are described. Both patients present similar repair defect and increased cellular radiosensitivity to ionizing radiation demonstrated by *in-vitro* assays. However, the clinical and immunologic profile was extremely diverse: the first patient showed a combined immunodeficiency phenotype while the second patient had an isolated IgA deficiency. Two other patients were identified as a result of an

opportunistic infection. In the first case, an APDS2 syndrome (*Activated Phosphoinositide 3-kinase D Syndrome* type 2, due to *PIK3R1* deficiency) was identified. This defect can cause early and long-lasting infection by *M. faucium* in the absence of hyperIgM phenotype. Sequencing of 16S rRNA from microbiological samples was key to molecular diagnosis. Combination antibiotic treatment with the use of interventional radiology may be useful in the eradication of giant abscesses in patients with primary immunodeficiencies. In the last patient after disseminated infection by *M. genavense* the molecular assessment showed a synonymous variant in *NFKB1*, with the final demonstration of pathogenicity based on mRNA and protein studies.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

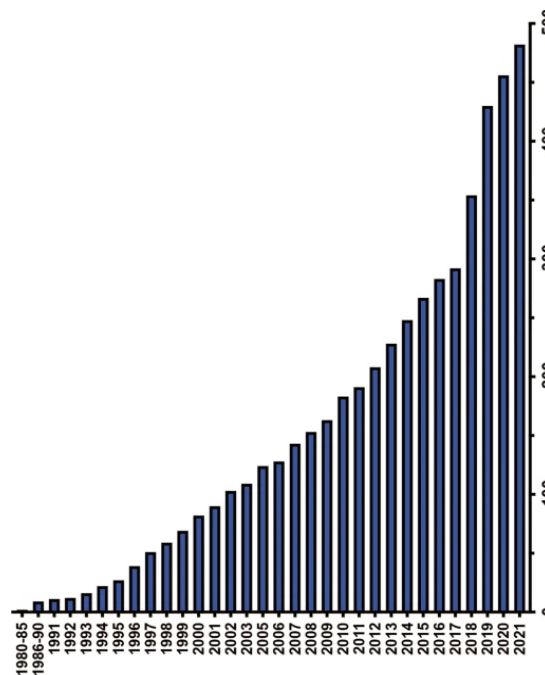
1.1. CONCEPTO.

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) o errores innatos de la inmunidad (EII) consisten en el defecto por número o función, exceso o defecto, en las células del sistema inmune.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA.

La Sociedad Internacional de Inmunodeficiencias (International Union of Immunological Societies Expert Committee, IUIS) reconoce 485 IDP en su última actualización en 2022 (1) (Figura 1), clasificados en 10 grupos (Figura 1AB). Los dos primeros defectos de EII (la deficiencia de adenosin deaminasa y la deficiencia de purina nucleósido fosforilasa) fueron caracterizados molecularmente a partir de 1985.

A)



(B) N° Genes/Tabla

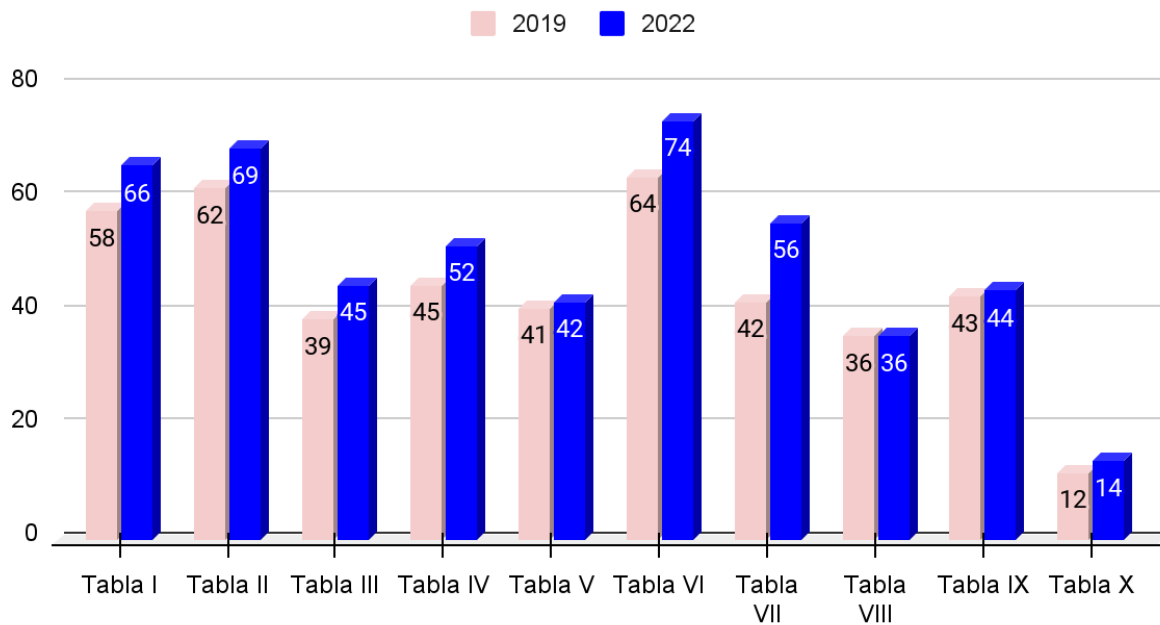


Figura 1. (A) Número de defectos monogénicos de errores innatos de la inmunidad identificados. En la Figura B se especifican los nuevos defectos que actualizan la clasificación IUIS de 2019. Modificado de (1).

Cabe destacar que hasta el año 1996 se habían caracterizado desde el punto de vista genético solamente 6 EII. La caracterización molecular ha avanzado rápidamente en los últimos años y el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido identificar un número creciente de enfermedades, gracias a la disminución de los costes de su implementación (2). De hecho, se considera que de los 19116 genes codificantes, la lista de los potencialmente relacionados con el sistema inmune puede ser de 3110 (3,4). Este grupo heterogéneo de enfermedades genéticas, aunque se presentan fundamentalmente en la infancia, pueden manifestarse en cualquier momento de la vida,

derivando no solo en complicaciones infecciosas graves sino que además predisponen al desarrollo de fenómenos autoinmunes, inflamación, alergia y neoplasias (Figuras 2 y 3). Son consideradas enfermedades raras si bien según datos indirectos hasta 1 de cada 1200 recién nacidos vivos padece un EII (5–7). El retraso diagnóstico en estas entidades es frecuente, lo que contribuye a su morbimortalidad (8). Más del 50% de los pacientes tienen complicaciones no infecciosas que contribuyen a la mortalidad y más del 25% presentan complicaciones autoinmunes (9,10). Sirva de ejemplo el rango de retraso diagnóstico en la inmunodeficiencia común variable (IDCV), independientemente de la edad al diagnóstico (ya sea antes o después de los 10 años de vida) y del año del diagnóstico (antes o después del 2000) que se sitúa entre 4,6 y 9 años (11,12). Es de destacar que hasta el 90% de los sujetos con un EII podrían desconocer su padecimiento (13). El retraso diagnóstico guarda relación con la mortalidad, ya que el citado estudio demuestra mediante análisis multivariante una menor supervivencia asociada a un mayor retraso diagnóstico (11). Esto se debe a que los signos clásicos de alarma de la Fundación Jeffrey Modell (disponibles en <http://jmfworld.com/library/educational-materials/10-warning-signs>) son útiles para identificar algunos subtipos de EII (deficiencias de inmunidad innata y celulares), pero no defectos humorales que, por otra parte, suponen el grupo más prevalente de EII (aproximadamente el 65% de los casos) (14,15).

Los signos de alarma para la sospecha de EII son los siguientes:(16)

a) Para población pediátrica:

1. Cuatro otitis en un año
2. Dos sinusitis graves en un año
3. Necesidad de tratamiento antibiótico durante al menos dos meses con poco efecto
4. Dos neumonías en un año
5. Fallo de medro
6. Infecciones recurrentes profundas o abscesos viscerales
7. Muguet persistente o infección fúngica cutánea persistente
8. Necesidad de tratamiento antibiótico endovenoso para erradicar una infección
9. Dos infecciones profundas, incluyendo sepsis.
10. Historia familiar de IDP

b) Para población adulto:

1. Dos otitis en un año
2. Dos sinusitis en un año, en ausencia de alergia
3. Una neumonía al año durante más de un año.
4. Diarrea crónica con pérdida de peso.
5. Infecciones virales recurrentes (herpes, verrugas, condilomas)
6. Necesidad de tratamiento antibiótico endovenoso para erradicar una infección
7. Abscesos viscerales o cutáneos profundos
8. Muguet persistente o infección fúngica en la piel u otra localización persistente

9. Infección por micobacterias atípicas escasamente patógenas

10. Historia familiar de IDP

Adicionalmente, debemos considerar la evaluación de los signos de alarma clásicos incluyendo la consanguinidad parental, diarrea crónica y la historia familiar de tuberculosis para la identificación de inmunodeficiencias secundarias (IDS) (17).

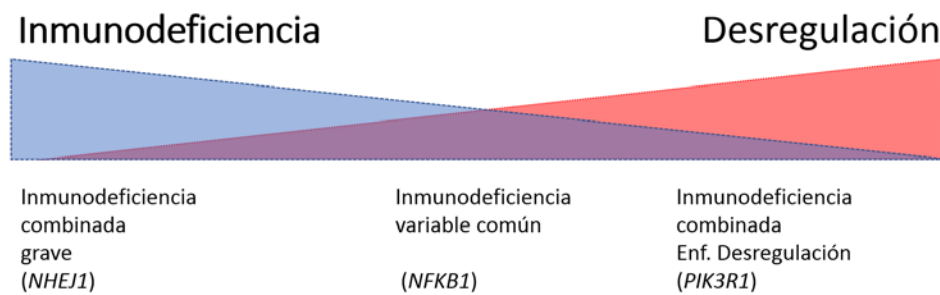


Figura 2. Espectro entre la inmunodeficiencia y la desregulación.

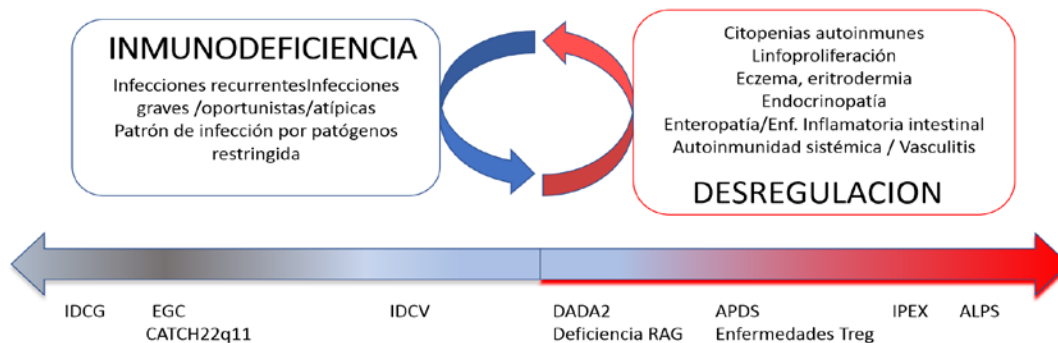


Figura 3. Modificado de (15,18).

El patrón de herencia de estas enfermedades, como cualquier otra enfermedad genética, puede ser autosómico recesivo, dominante o ligado al cromosoma X. Existe una sobrerrepresentación de patrón de herencia mendeliana en familias consanguíneas (hasta el 95 % en algunas series) (19,20). Incluso en áreas de alta consanguinidad (sudeste asiático) todas las familias identificadas tenían antecedente de un hijo fallecido previo a la identificación del caso índice (21). A pesar de todo lo anterior e incluso con las nuevas técnicas de secuenciación masiva, la rentabilidad diagnóstica es aún limitada, con una rentabilidad promedio del 29% (rango 10–79%) que aumenta hasta el 38% cuando se utiliza la secuenciación masiva mediante exoma completo (rango 15–70%)(22,23).

Los pacientes estudiados en la presente tesis comparten el denominador común del defecto combinado de linfocitos T y B. En alguno de los casos se alinea en el espectro de la IDCG (*Cernunnos*), pasando por la IDC (*Cernunnos*, *PIK3RI*) hasta el de IDCV (*NFKBI*) con defectos en ambos compartimentos de la inmunidad adaptativa.

1.3. INMUNODEFICIENCIAS HUMORALES:

INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN (IDCV)

La IDCV constituye un grupo heterogéneo de entidades cuya característica común es la presencia de hipogammaglobulinemia sin defecto profundo en los compartimentos T y B. Su prevalencia se estima en alrededor de 1 de cada 30.000-50.000 individuos (24). Su presentación es más frecuente en el adulto joven y puede afectar a una multitud de órganos, principalmente el aparato respiratorio y gastrointestinal (25). Se reconocen 22 defectos monogénicos que explican alrededor del 10% de casos de IDCV (26). Según la clasificación reciente de la IUIS los genes

asociados a esta entidad son: *ARHGEF1*, *ATP6AP1*, *CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD81*, *IKZF1*, *IRF2BP2*, *MOGS*, *NFKB1*, *NFKB2*, *PIK3CD*, *PIK3R1*, *PTEN*, *RAC2*, *SEC61A1*, *SH3KBP1*, *TNFSF13*, *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C*, *TNFSF12*, y *TRNT1*. La causa monogénica más frecuente, al menos en Europa (4%), son las variantes monoalélicas en *NFKB1*, mediante un mecanismo de pérdida de función (27,28). En la cohorte internacional más amplia, de 157 pacientes, se pone de manifiesto una pléyade de manifestaciones clínicas: infecciones oportunistas, granulomas, autoinflamación, linfoproliferación, cáncer y enteropatía de causa no infecciosa (29). Por contra, la clasificación original de 1999 incluía sólo las infecciones de repetición como criterio clínico para el diagnóstico (30).

La clasificación actual (2014) amplía los criterios clínicos. Consta de los siguientes criterios:(31)

Al menos UNO de los siguientes:

- Susceptibilidad a infecciones
- Manifestaciones autoinmunes
- Enfermedad granulomatosa
- Linfoproliferación policlonal inexplicada
- Familiar afecto de inmunodeficiencia humoral

Y marcada disminución de IgG y de IgA con o sin disminución de IgM (habiendo realizado 2 determinaciones; valor inferior a 2 DE para la edad

Y al menos uno de los siguientes:

- Respuesta vacunal insuficiente (y/o ausencia de isohemaglutininas). Por ejemplo, ausencia de títulos protectores a pesar de la vacunación.

- Disminución de linfocitos B de cambio de clase (por debajo del 70% del valor normal según edad)

Y habiendo descartado causas secundarias de hipogammaglobulinemia (pérdidas y/o fármacos)

Y diagnóstico establecido por encima del cuarto año de vida, aunque los síntomas podrían estar presentes previamente.

Y ausencia de deficiencia de linfocitos T grave, definido como 2 de los siguientes criterios:

- Recuento de linfocitos CD4+: 2–6 años < 300/microL, 6–12 años < 250/microL, >12 años < 200/microL
- % de linfocitos CD4+ Naïve: 2–6 años < 25%, 6–16 años < 20%, >16 años < 10%
- Proliferación linfocitaria T ausente.

La concepción del defecto monogénico dejando atrás la ambigüedad del concepto genérico de IDCV se puede observar gráficamente (Figura 4): en una búsqueda en la base de referencia PubMed (<https://www.pubmed.gov>), con fecha 22/2/2023, el número de publicaciones sobre este concepto se ha estabilizado. Se prefiere identificar el defecto genético particular sobre el término ambiguo de IDCV.

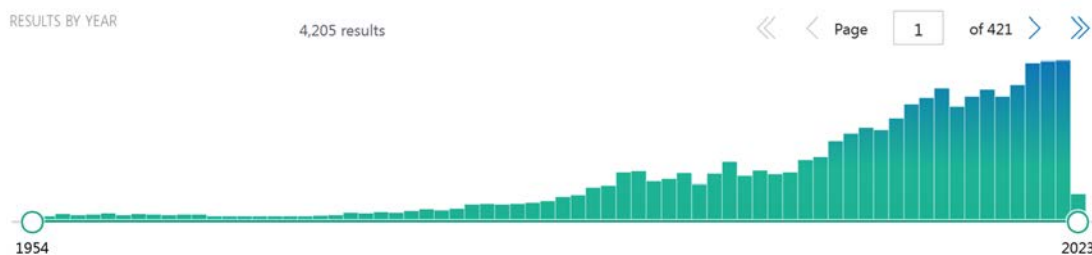


Figura 4. Tendencia de búsquedas en PubMed sobre el término “Common Variable Immunodeficiency” (IDCV).

La necesidad de un diagnóstico molecular preciso viene determinada por dos aspectos, uno diagnóstico-terapéutico y otro de seguimiento-pronóstico:

1. Diagnóstico-Terapéutico: En cuanto a las deficiencias humorales y de desregulación que corresponden a los grupos III y IV de la clasificación IUIS actual, en los últimos años se han descrito defectos monogénicos susceptibles de tratamiento específico como *CTLA4/LRBA* (tratamiento con abatacept) (32,33), *APDS1/2* (sirolimus o inhibidores específicos p110) (34,35) o síndrome *STAT1/2/3* de ganancia de función (inhibidores *JAK*) (36–38) independientemente del tratamiento sustitutivo con gammaglobulina, entre otros (39). En este sentido, como alternativa al tratamiento clásico de reposición con inmunoglobulina endovenosa existen formas novedosas de administración como la vía subcutánea cada 1-4 semanas que mejoran la calidad de vida de estos pacientes manteniendo la misma eficacia (40,41).
2. De seguimiento-pronóstico: Los pacientes con IDCV presentan un riesgo aumentado de infecciones de repetición, fenómenos autoinmunes y cáncer, lo que determina una supervivencia menor (42), particularmente en los pacientes con complicaciones no infecciosas (25). Los pacientes que presentan exclusivamente infecciones de repetición presentan una supervivencia a largo plazo del 95%. Sin embargo, aquellos que presentan otro tipo de complicaciones no infecciosas ven mermada significativamente su supervivencia (42%). Se puede resumir en que las complicaciones infecciosas permiten el diagnóstico. Pero las demás son responsables de gran parte de la morbimortalidad en estos pacientes (Figura 5).

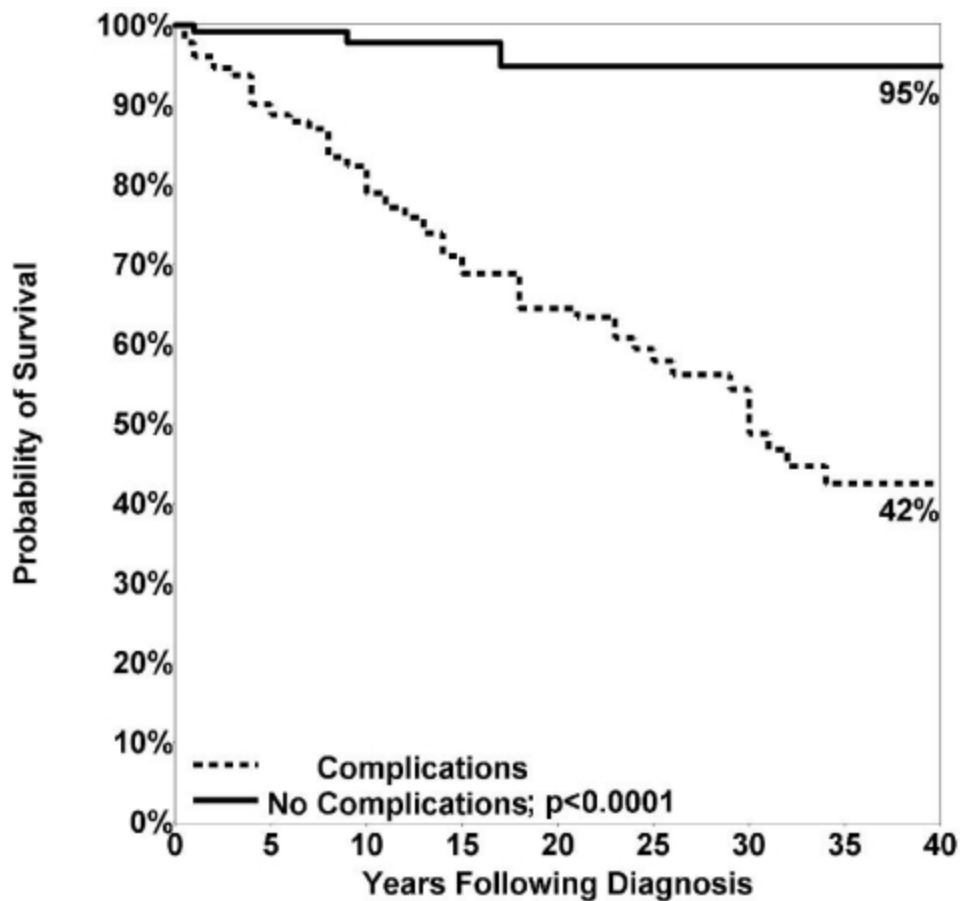


Figura 5. Supervivencia en los pacientes con IDCV (25).

El seguimiento del paciente con IDCV debe incluir la monitorización de las complicaciones respiratorias mediante pruebas de función respiratoria (espirometría, pletismografía, difusión pulmonar, test de la marcha) y pruebas de imagen (TAC torácico, con periodicidad de modo individualizado)(43). La complicación más grave es la enfermedad granulomatosa intersticial pulmonar (granulomatous and lymphocytic interstitial lung disease, GLILD)(44). Requiere inmunosupresión agresiva con depleción CD20+ (rituximab) y una diana T (micofenolato, azatioprina, sirolimus, ciclosporina A), ya que la supervivencia en ausencia de tratamiento es inferior a 14 años desde el diagnóstico(1–3). El mejor parámetro de seguimiento en esta complicación es el estudio de difusión pulmonar (44).

Los pacientes con IDCV tienen un riesgo incrementado de mortalidad por adenocarcinoma gástrico 10,1 veces respecto a la población general(48). Debe evaluarse periódicamente y, en caso de colonización por *H. pylori*, está indicada la realización de una endoscopia basal. En caso de gastritis atrófica o metaplasia se recomienda el seguimiento endoscópico periódico (49).

Los pacientes IDCV con mayor riesgo de malignidad son los que presentan deficiencia de NFKB1 (16,8%) (29), seguidos por los deficientes en CTLA4 (12,9%) (50).

Por último, hoy día constituye un reto el diagnóstico molecular de los pacientes con IDCV, ya que a pesar del avance de las técnicas de secuenciación masiva, el rendimiento diagnóstico es muy bajo. Por tanto, hay que considerar otros factores digénicos o poligénicos, epigenéticos e incluso la aparición de variantes patogénicas somáticas que resulten en un fenotipo clínico concreto.

1.4. INMUNODEFICIENCIAS COMBINADA / INMUNODEFICIENCIA COMBINADA GRAVE

Dentro de la clasificación de los EII se encuentra el grupo de las IDC de linfocito T y B (1). En este apartado destaca por su gravedad la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), una emergencia pediátrica por el compromiso vital que supone la ausencia de linfocitos T, B y NK en algunos pacientes. La IDCG presenta heterogeneidad genética, dado que se han descrito más de 25 defectos monogénicos (Tabla 1).

Tabla 1. Causas genéticas de IDCG. Adaptado de (1,51)

FENOTIPO	PROTEÍNA	GEN
T-B+NK-	Cadena gamma común Janus associated kinase 3 deficiency Deficiencia de CD45 CD3 delta, epsilon, zeta Linker for activation of T cells (LAT)	<i>IL2RG</i> <i>JAK3</i> <i>PTPRC</i> <i>CD3D,CD3E,CD3Z</i> <i>LAT</i>
T-B+NK+	Cadena alfa del receptor de la IL7 Deficiencia Coronina 1a	<i>IL7Ra</i> <i>CORO1A</i>
T-B-NK-	Deficiencia de ADA Deficiencia de PNP Hipoplasia pelo-cartílago (T-B-/+NK+/-) Deficiencia adenilato kinasa 2	<i>ADA</i> <i>PNP</i> <i>RMRP</i> <i>AK2</i>
T-B-NK+ sin microcefalia	Genes activadores de las recombinasas 1/2 Artemis Deficiencia RAC2 (Ras-related C3 botulinum toxin)	<i>RAG1, RAG2</i> <i>DCLRE1C</i> <i>RAC2</i>
T-B-NK+ con microcefalia	Deficiencia de Cernunnos/XLF Deficiencia de DNA Ligasa 4 Deficiencia de protein kinasa C delta	<i>NHEJ1</i> <i>DNALig4</i> <i>PRKDC</i>

1.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN LOS PACIENTES CON ERRORES INNATOS DE LA INMUNIDAD.

El abordaje diagnóstico en los pacientes con EII depende del tipo que se esté considerando (1,52). En los EII humorales el primer nivel consta de una cuantificación de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE). En caso de un resultado repetido anormal el segundo nivel está formado por la respuesta vacunal y el estudio del compartimento B (linfocitos B de memoria de cambio de clase, transicionales y CD21low). Adicionalmente deben excluirse las causas secundarias por pérdidas (en contexto de enteropatía pierde-proteínas -mediante la cuantificación de α 1-antitripsina fecal- u orina -proteinuria-) y las farmacológicas (fundamentalmente fármacos antiepilépticos y esteroides) (53).

En los EII celulares el primer nivel consta del estudio de poblaciones linfocitarias T, B y NK. El paso siguiente es el estudio funcional mediante proliferación linfocitaria, tras exposición a mitógenos (PHA, anti CD3/28, PMA+ionomicina). Los ensayos de fosforilación o citometría de flujo para la determinación de la presencia de ciertas proteínas tanto de membrana como intracelulares, deben realizarse cuando existe una sospecha diagnóstica concreta basada en los estudios previos.

El tercer escalón diagnóstico ha sido, tradicionalmente, el estudio molecular, si bien es difícil diferenciarlo del segundo. Su objetivo es identificar cambios en la secuencia del DNA genómico que produzcan cambios en el RNA mensajero y/o un defecto o ganancia de la función de la proteína.

El defecto funcional y/o la ausencia de linfocitos T y B conducen a la ausencia de producción de anticuerpos y al riesgo de infecciones graves por virus, bacterias y hongos (54,55).

A pesar de la diversidad genética, la presentación clínica desde el punto de vista de la susceptibilidad a infecciones de los pacientes con IDCG puede ser similar y las infecciones más frecuentes en estos pacientes se deben a microorganismos oportunistas: neumonía por *Pneumocystis jiroveci* o CMV, aunque también por otros virus (adenovirus y/o herpesvirus) (29,56,57). La presencia de infección activa en el momento de identificar el paciente como afecto de IDCG o el diagnóstico tardío disminuyen significativamente la supervivencia (58). Sin tratamiento definitivo del defecto monogénico, como el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) o la terapia génica para un espectro reducido de enfermedades dentro de este grupo, la enfermedad es mortal (59). Por tanto, la IDCG supone un problema grave de salud pública. Los estudios de coste-efectividad muestran un balance favorable al programa de cribado neonatal para la IDCG (60). La experiencia en Reino Unido muestra resultados similares desde otra perspectiva: en el periodo 1979-2008 se analizó la supervivencia (SV) de pacientes pre-sintomáticos hermanos de niños previamente diagnosticados de IDCG. La SV de la cohorte de pacientes sintomáticos fue del 39,9% (mortalidad pre vs postrasplante del 35% y 39%, respectivamente), mientras que la de los hermanos identificados en fase presintomática fue del 90% (mortalidad pre vs postrasplante 1,7% y 8,4%, respectivamente) (61). Los datos de SV de pacientes con IDCG trasplantados en periodo neonatal muestran una SV superior al 90% (62). Dentro del grupo de las IDC de linfocitos T y B, destacan las inmunodeficiencias combinadas profundas (IDCP), generalmente menos graves que la IDCG (63). Las IDCP pueden deberse a mutaciones hipomórficas o reversiones somáticas en los genes cuyas mutaciones típicamente provocan IDCG y se diagnostican en la infancia temprana, en la adolescencia e incluso en la edad adulta. Cuando se manifiestan en la infancia, las IDCP deben diferenciarse de la IDCG. El tratamiento de elección para la IDCG es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Sin embargo, el tratamiento de los pacientes con IDCP es controvertido, ya que la presentación de la inmunodeficiencia puede ser mucho menos grave. Estas variantes genéticas se suelen asociar más a desregulación inmune que a susceptibilidad a infecciones y por eso se han denominado también IDCG “atípica”(64–66). Además, dentro de la IDCP también se incluyen un grupo heterogéneo de inmunodeficiencias no definidas genéticamente en algunos pacientes, por lo que las decisiones terapéuticas son mucho más difíciles de tomar. Un porcentaje importante de estos pacientes tienen un riesgo elevado de infección grave y de padecer desregulación inmune severa. Es en estos pacientes donde el TPH debe considerarse de modo individualizado. Tanto en el caso de IDCG como de IDCP es deseable el conocimiento de la alteración molecular subyacente para mejorar el pronóstico y la elección del tratamiento más adecuado puesto que aproximadamente el 50% de los pacientes con IDC, tanto pediátricos como adultos, se trasplantan sin conocer el defecto genético (67,68).

En ocasiones, el desconocimiento del gen responsable de la inmunodeficiencia desestima el TPH.(69) La implementación del cribado neonatal mediante la detección de círculos de escisión del receptor del linfocito T (*T-cell receptor excision circles*, TRECs) en la prueba del talón realizada conjuntamente con el resto de pruebas endocrino-metabólicas a las 48 horas de vida permite de un modo coste-efectivo el diagnóstico y tratamiento precoz de este grupo de EII (70).

1.6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

El diagnóstico de confirmación de un EII se basa en el diagnóstico molecular. Existen criterios estandarizados ACMG implementados en Europa y Reino Unido para evaluar la patogenicidad de las variantes encontradas (71–73).

El diagnóstico molecular de una enfermedad rara requiere hallar una variante que causa la enfermedad (o variantes bialélicas en enfermedades autosómico recesivas). Un diagnóstico rápido y preciso es esencial para ofrecer un mejor cuidado para el paciente y su familia, pudiendo potencialmente ofrecer un tratamiento dirigido o, en el peor de los escenarios, cuidados paliativos en ausencia de enfermedad tratable. El diagnóstico con las nuevas técnicas rápidas de secuenciación masiva de genoma completo se puede conseguir en 2 días para más de 5430 enfermedades monogénicas (74). Esto conlleva inherentes retos, como la correcta información pronóstica y la predicción del riesgo de familiares, más allá de las consecuencias terapéuticas inmediatas para el paciente. Históricamente, el fenotipo clínico del paciente ha guiado los estudios moleculares mediante secuenciación directa o Sanger. Sin embargo, este abordaje presenta 3 graves limitaciones:

- 1) El coste de secuenciación (en tiempo de análisis y consumo de reactivos)
- 2) La sensibilidad para la detección de mutaciones somáticas, especialmente cuando el porcentaje de alelo mutado es inferior al 15-20%
- 3) La incapacidad para detectar mosaicismos, con implicaciones de cara al consejo genético, ya que están presentes hasta en el 6% de casos de EII (75).

Por contra, la secuenciación masiva permite evaluar múltiples genes en la misma prueba. En la actualidad, se dispone de rutina de paneles de genes extensos (superiores a los 100 genes) y el diagnóstico mediante secuenciación de exoma completo para llegar al diagnóstico. En relación a la secuenciación mediante genoma completo, la dificultad consiste en descifrar si alguna de las variantes identificadas en un genoma concreto que puede contener hasta 4 millones de ellas, es patogénica, ya que la mayoría son variantes normales cuya contribución a un mayor o menor riesgo a desarrollar una enfermedad multifactorial no se puede descartar por completo. Es

frecuente la identificación de variantes de significado incierto donde en algunos casos la validación inmunológica funcional es clave para realizar un diagnóstico definitivo. El reanálisis de las muestras obtenidas es útil para el diagnóstico a medida que se identifican nuevas variantes o genes involucrados además de variantes estructurales (76). En la Tabla 2 podemos ver una comparativa de las diversas técnicas de diagnóstico molecular, con sus ventajas e inconvenientes (22,23,77–79).

Tabla 2. Comparativa de las técnicas de diagnóstico molecular mediante secuenciación masiva en comparación con la secuenciación clásica (secuenciación directa o método de Sanger)

TÉCNICA	SANGER	PANELES GENES	WES	WGS
FENOTIPO	Claro	Restringido (si < 100 genes)	Complejo	Complejo
REGIÓN	Codificante y no codificante	Codificante y splicing restringida	Codificante y splicing amplia	Codificante y no codificante
PROFUNDIDAD	-	> 500x	> 50-100x	> 30x
VARIANTES	No detecta baja frecuencia	Puede no detectar variantes estructurales (del/dup)	Subóptimo para análisis de variación número copias	Cualquier tipo variante
COMPLEJIDAD ANÁLISIS	+/-	+	++	++++
COSTE	++	+	++	++++

En este sentido, se describen diversos tipos de variantes patogénicas no silenciosas: cambio de nucleótido que provoca un cambio de aminoácido, cambio de nucleótido que codifica para codón STOP, inserciones, deleciones, duplicaciones, cambio del marco de lectura, expansiones de repetición. Las variantes silenciosas (sinónimas) pueden no ser tan silenciosas y generar nuevos sitios crípticos de splicing que trunquen una proteína (80–82), tal y como se muestra en uno de los pacientes descritos en este trabajo con una mutación sinónima en *NFKB1*(82).

La rentabilidad diagnóstica es mayor en los defectos de inmunidad innata en comparación con los de la inmunidad adaptativa. Dentro de estos últimos, los que presentan menor tasa de diagnóstico son los defectos predominantemente de anticuerpos. Si comparamos el grupo de pacientes que presentan autoinmunidad o linfoproliferación benigna con los que manifiestan exclusivamente infecciones de repetición, la rentabilidad diagnóstica es mayor en el primero de dichos grupos(23). Los pacientes con inmunodeficiencias humorales constituyen el grupo en el que con más frecuencia el diagnóstico queda sin cerrar. A diferencia de esto, las enfermedades por desregulación o que afectan a los neutrófilos son las que más rentabilidad tienen (83). La tasa diagnóstica en pacientes tanto pediátricos como adultos mejora con el abordaje mediante secuenciación de genoma completo (84). El cribado neonatal de los EII puede suponer el paso inmediatamente anterior al uso rutinario de la secuenciación por genoma completo. Esta idea, a pesar de ser intuitivamente interesante, plantea retos técnicos (tiempo de análisis, recursos limitados) y éticos (cuestiones que se plantean los padres tales como ¿qué se diagnostica?, ¿cuándo se informa?, ¿quiero y/o debo ser informados de las enfermedades potenciales de mi hijo/a? ¿y de las futuras?, entre otras cuestiones) (85).

1.7. COMPLICACIONES DE LOS PACIENTES CON ERRORES INNATOS DE LA INMUNIDAD:

En todas estas enfermedades debemos destacar características comunes como la penetrancia incompleta y la expresividad variable, que explican la heterogeneidad genotípica (diversos genotipos causan un mismo fenotipo) y fenotípica (diversos fenotipos son causados por el mismo defecto monogénico).

1.7.1. ERRORES INNATOS DE LA INMUNIDAD E INFECCIONES

Los pacientes con EII presentan susceptibilidad a las infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos. La edad a la que estas infecciones ocurren pueden permitir una sospecha precoz: en IDC o IDCG la susceptibilidad es precoz a cualquier microorganismo, fundamentalmente virus (citomegalovirus, herpesvirus o enterovirus) pero también bacterias (a través de vías periféricas o tras la pérdida de la barrera cutánea como en el síndrome de Omenn) y la infección por *Pneumocystis jiroveci* (86,87).

Los pacientes con inmunodeficiencias humorales presentan susceptibilidad a bacterias encapsuladas, entre otras. Los pacientes con IDCV tienen aumento del riesgo de colonización persistente por *Helicobacter pylori* unido a mayores tasas de reinfección (88,89). Dicha susceptibilidad se expande a los parásitos (ej. *Giardia lamblia*) (90).

Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) presentan infecciones graves y precoces (edad media de 2 años al inicio de los síntomas, media de edad al diagnóstico de 3 años) (91).

Los pacientes con defectos de la inmunidad innata padecen infecciones que se caracterizan por alguno de los siguientes elementos:

- Susceptibilidad a un microorganismo particular:

Las infecciones por bacterias encapsuladas son características en pacientes con defectos del sistema de complemento, siendo el más frecuente la deficiencia del C2, aunque proporcionalmente sea el grupo de EII menos frecuente (el 2%).

En lo que se refiere a infecciones invasivas por *S. pneumoniae* se puede afirmar que hasta el 50% de los sujetos no infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pueden presentar algún tipo de deficiencia humoral (92). Los pacientes con defectos cuantitativos o cualitativos de neutrófilos exhiben particular susceptibilidad frente a bacterias (ej: neutropenia severa congénita)(93) u hongos (enfermedad granulomatosa crónica) (94). Las deficiencias en la inmunidad innata en el reconocimiento de virus (*TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, IRF7, IRF9, TRAF1, TRAF6, MDA5*) tienen una susceptibilidad especial frente a virus, ya sea gripe (*MDA5*) y/o herpesvirus (vía de reconocimiento endosomal *TLR3*)(95), de modo que todo paciente con encefalitis herpética fuera del periodo neonatal debe considerarse sospechoso de padecer un defecto monogénico en esta vía hasta que se demuestre lo contrario (96). Desde el año 1996 hasta la actualidad, se han demostrado 19 genes de susceptibilidad a la denominada susceptibilidad mendeliana a la infección por micobacterias (*Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease, MSMD*): *CYBB, IFNGR1, IFNGR2, IFNG, IL12RB1, IL12B, IL23R, IL12RB2, ISG15, IRF8, JAK1, NEMO, RORC, SPPL2A, STAT1, TBX21, TYK2, USP18, ZNFX1* correspondiente al grupo VI de la IUIS, siendo los más frecuentes los que involucran a la IL12 y su receptor seguidos por el receptor del IFN- γ (97–100). Dentro

del grupo X de la IUIS, las fenocopias remedan defectos monogénicos: susceptibilidad a micobacterias en el adulto (Ac frente a IFN- γ), infecciones cutáneas recurrentes (Ac antiIL6), candidiasis mucocutánea crónica (Ac anti IL17 y/o IL22) (101), SARS-COV2(102) o el virus de la gripe(103). La respuesta antiestafilocócica puede estar disminuida por una incapacidad del huésped del reconocimiento de la alfa toxina dentro de la deficiencia de otulina (104).

- Particularidad en la presentación clínica: Los pacientes con defectos en el reconocimiento inespecífico de bacterias extracelulares (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) como sucede en los defectos de la vía IRAK4/MyD88 se caracterizan por mostrar un retraso o ausencia en la respuesta inflamatoria (reactantes de fase aguda, producción de IL6 y fiebre) (105).
- La correlación germen/huésped susceptible se puede resumir en la Tabla 3

Tabla 3. Correlación germen con EII

TIPO EII	GÉRMENES SUSCEPTIBLES
1. Combinadas	Virus, bacterias, parásitos y hongos
2. Humorales	Bacterias (encapsuladas o no), <i>Mycoplasma</i> , <i>Enterovirus</i> , <i>Aichivirus</i> , <i>Norovirus</i> , parásitos (<i>G. lamblia</i>)
3. Complemento	Bacterias encapsuladas, particularmente <i>S. pneumoniae</i> y <i>Neisseria spp</i>
4. Neutrófilos	Bacterias intra y extracelulares. Hongos
5. Inmunidad innata <ul style="list-style-type: none"> a. IRAK4/MyD88 b. STAT1 LOF c. STAT2 LOF d. Eje IL12/ IFN-γ 	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> Virus, hongos Virus <i>Salmonella spp.</i> <i>Mycobacterium spp</i>

1.7.2. ERRORES INNATOS DE LA INMUNIDAD Y DESREGULACIÓN

Los signos de alarma para sospechar EII en condiciones de autoinmunidad múltiple o precoz no son tan conocidos. Particularmente, el riesgo de presentar un EII es elevado en presencia de anemia hemolítica autoinmune o de enfermedad inflamatoria intestinal de inicio precoz (riesgo relativo de 830 y 40 respecto a la población general, respectivamente)(106). Adicionalmente, las citopenias en el contexto de las inmunodeficiencias son característicamente más refractarias al tratamiento y condicionan mayor mortalidad (106). En relación con lo anterior, se han descrito patrones de desregulación asociados a las inmunodeficiencias primarias (12).

Por tanto, es necesaria la formación específica para todos aquellos profesionales sanitarios que pueden atender a un paciente con un EII y así permitir un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado.

Varios mecanismos justifican las citopenias en los pacientes con EII:

1) Autoinmunidad:

Celular: IDC (WAS y variantes) (107,108), *ZAP70* (109), *RASGRP* (110), *TPP2* (111), STAT1 GOF, STAT3 GOF, *STAT5b*(112).

Humoral: IDCV-like (deficiencia LRBA,CTLA4 y APDS1/2) (34,113), síndrome de Good.

2) Desregulación inmune: IPEX (114), HLH primario (115), *NLRC4* (116), Albinismo oculocutáneo con inmunodeficiencia (Síndrome de Chediak Higashi, Síndrome de Griscelli tipo 2, Síndrome de Hermansky Pudlak) (117).

3) Fallo medular:(118) *GATA2*, *IKZF1*, *TLR8*, Neutropenia severa congénita, Disqueratosis congénita, Disgenesia reticular, *SAMD9/L*, Displasias óseas con inmunodeficiencia

(Hipoplasia pelo-cartílago, Schimke, *EXTL3*, Síndrome otocervical tipo 2), Síndrome de Shwachman-Diamond.

- 4) Mielosupresión (Secundaria a infección viral, Nutricional, Farmacológica o Mielokatexis -WHIM-)(119,120).

Desde el punto de vista práctico, existen alteraciones de laboratorio a modo de patrones (Linfopenia/Linfocitosis, Neutropenia/Neutrofilia, Monocitosis/Monocitopenia, Trombopenia), que obligan a considerar diversos EII:

- 1) Linfopenia. Cabe destacar, respecto a lo anteriormente referido, que en todo lactante el hallazgo de un recuento < 2500 linfocitos/microL obliga a descartar una IDC(G) (121).
- 2) Linfocitosis. Se asocia de modo infrecuente a IDP, excepto en el caso de síndrome de Omenn (122). Puede presentarse en el contexto de una leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL) (123), típicamente en el adulto (ocasionalmente presente en pacientes con fallo medular) y que produce una IDS (124). Dentro de las IDPs, los defectos del complejo CARD11-BCL10-MALT1 producen IDC con linfocitosis (125). Ocasionalmente en I κ B α GOF puede producirse (126).
- 3) Neutropenia. Se clasifica en Leve: 1000-1500 /microL, Moderada 500-999 /microL o Grave < 500 /microL. Las causas pueden ser:
 - a) Fallo medular: Neutropenia severa congénita (127), *GATA2* (128), disgenesia reticular (129).
 - b) Inmunodeficiencias celulares
 - c) Neutropenia asociada al cromosoma X: N-WASP (WAS) (130).
 - d) Deficiencia de CD40 ligando (131).

- e) Deficiencia de Moesina (132).
 - f) Deficiencia de CARD11 (133).
 - g) IDP humorales: Deficiencia de BTK (enfermedad de Bruton).(134) Puede presentarse en IDCV (y en general leve-moderada) (135).
 - h) Mixta: WHIM (120) DADA2 (136).
- 4) Neutrofilia. Es típica de la deficiencia de adhesión leucocitaria, por defecto en la beta-2 integrina (CD18), necesaria para la transcitosis al foco inflamatorio desde el torrente circulatorio. Los pacientes asplénicos (primaria -deficiencia de RPSA- (137) o secundaria) pueden presentarla.
- 5) Monocitosis. Está presente ocasionalmente en pacientes con IDCV del tipo de desregulación (*LRBA,CTLA4*) y en *NFKB1*. Es muy característica de los síndromes leucoproliferativos asociados a RAS (RALD)(138).
- 6) Monocitopenia. Se presenta en deficiencias de *GATA2* (139), Moesina (140), *SAMD9/L* (141), *IRF8* (142).
- 7) Trombopenia. Puede ser mediada por diferentes mecanismos, incluyendo:
- a) Autoinmunidad:
 - i) Celulares /Combinadas:
 - (1) WAS y variantes (107,143–145).
 - (2) *RASGRP* (110), *TPP2* (111), *CATCH22q11* (146), *ZAP70* (109), *STAT1 GOF*, *STAT3 GOF* (147), *STAT5b*, *TET2* (148).
 - ii) Humoral (113): *LRBA*,(149) *CTLA4*, *APDS1/2*, *NFKB1*
 - b) Desregulación (150): *IPEX* (114), *ALPS/ALPS-like* (151,152), *ITK* (153), *CD27* (154),*CD70* (155), *HLH primario* (116), *NLR4* (156).

- c) Fallo medular: *GATA2*, *IKZF1*, Disqueratosis congénita, Disgenesia reticular, Displasias óseas con inmunodeficiencia (Hipoplasia cartílago-pelo, *SAMD9/L*, Schimke) (157).
- d) Otras: WHIM (120).

Las citopenias refractarias pueden requerir tratamientos farmacológicos que conlleven el desarrollo de una IDS (particularmente en la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes) por depleción CD20+ (rituximab), donde el carácter primario o secundario del defecto es difícil de determinar (158). Así, un porcentaje variable de pacientes presenta disminución de IgM post-tratamiento (además de riesgo de disminución de IgG). Tras el tratamiento con rituximab, los linfocitos B desaparecen (no así las células plasmáticas, CD138+, sensibles a la depleción con bortezomib) (159). Es esencial la cuantificación de inmunoglobulinas previa a la depleción CD20+ (160). La clínica puede reaparecer coincidiendo con la repoblación B, 6-12 meses tras la finalización del tratamiento. La decisión de tratamiento sustitutivo debe valorarse individualmente, en base a la presencia de infecciones, hipogammaglobulinemia (IgG inferior a 400mg/dL) y ausencia de respuestas vacunales (161).

Tras las citopenias autoinmunes, el mayor riesgo de EII aparece en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal de inicio precoz (*Early Onset Inflammatory Bowel Disease*, EO-IBD) (106). La asociación entre diarrea crónica y EII es múltiple, ya que muchos EII predisponen a infecciones (con más frecuencia los déficits humorales), problemas malabsortivos (por atrofia intestinal, coexistencia de enfermedad celíaca, sobrecrecimiento bacteriano) o inflamatorios

(como parte de un cuadro de enfermedad inflamatoria intestinal de la que se conocen en la actualidad alrededor de 80 defectos monogénicos) (162,163).

La EO-IBD o de curso anormalmente tórpido (fundamentalmente, aunque no de modo exclusivo, en la edad pediátrica)(164) presenta un riesgo de asociación con EII en grado variable (mayor a menor edad de presentación, siendo cercano al 100% si el debut es neonatal). El algoritmo diagnóstico se muestra en la Figura 6. Conceptualmente existen dos grupos de EO-IBD, ya sea por defectos en la barrera epitelial o por EII (165). El reto diagnóstico incluye la habitual elevación de los niveles de calprotectina (el marcador de inflamación intestinal) en lactantes sanos en comparación con el escolar o adolescente (166). La identificación precoz es obligada, ya que muchos de estos EII requieren inmunosupresión (con el riesgo de infecciones graves derivadas del propio EII)(167) o un trasplante de progenitores hematopoyéticos (168).

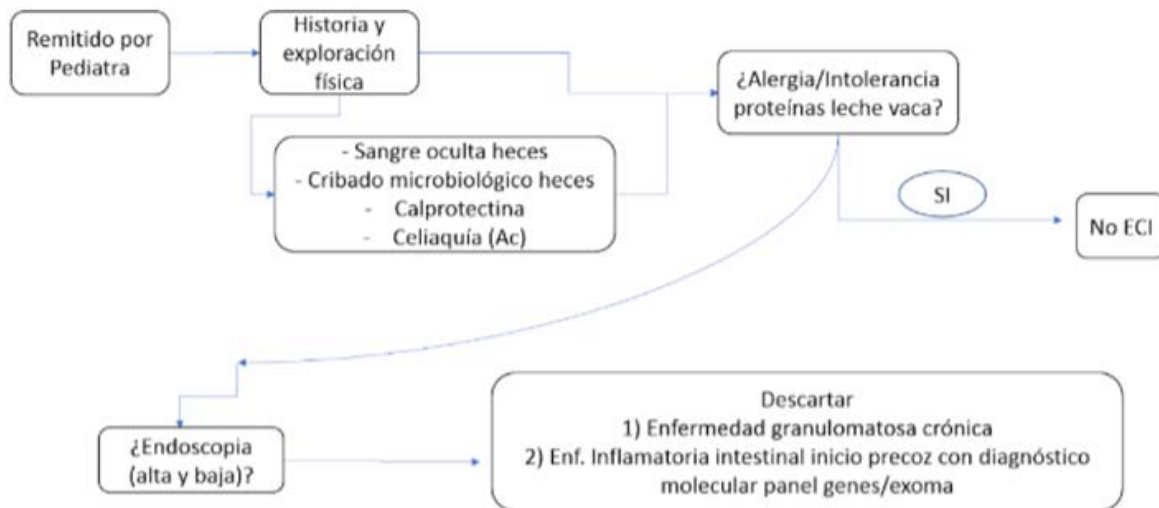


Figura 6. Algoritmo diagnóstico del abordaje del paciente con enfermedad inflamatoria intestinal de inicio precoz o evolución tórpida.

1.7.3. ERRORES INNATOS DE LA INMUNIDAD Y CÁNCER

Si bien los EII se deben a variantes patogénicas de línea germinal en los genes anteriormente referidos, recientemente se han descrito dichos EII por variantes somáticas (169–171). Por contra y aunque existen genes de predisposición familiar al cáncer, el resultado de la acumulación de variantes patogénicas somáticas conlleva el desarrollo de neoplasias tanto hematológicas como de órgano sólido. La diferenciación es difícil, ya que la interrelación entre los genes que predisponen a EII y cáncer es frecuente. (Figura 7).

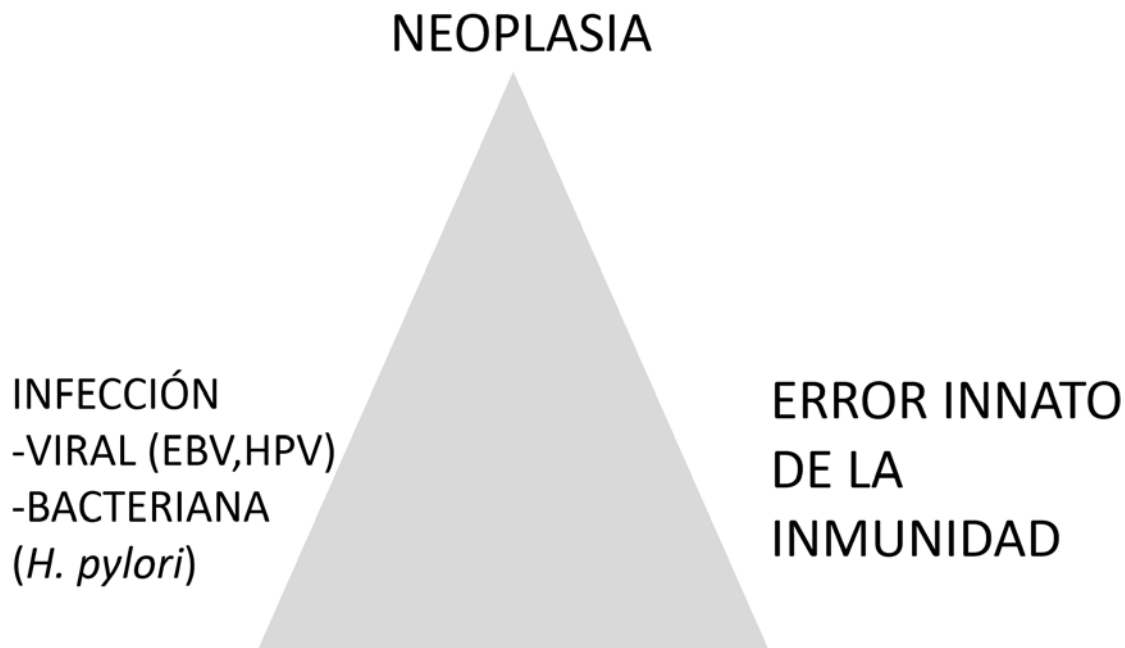


Figura 7. La contribución necesaria del EII y la infección viral persistente condicionan la aparición del cáncer.

En el caso de las infecciones crónicas por virus, los dos principales agentes involucrados son el VEB y el VPH. La infección crónica se asocia a diversas neoplasias, como se resume en la Tabla

4a, pero no siempre la asociación neoplasia-EII está determinado por la presencia de infección.

La asociación neoplasia-EII se muestra en la Tabla 4b.

Tabla 4a. Neoplasias asociadas a infecciones

	NEOPLASIA ASOCIADA A INFECCIONES EN EII		
GERMEN	<i>HPV</i> (Cérvix, piel) (172) (173)	<i>VEB</i> (174) (175) (Tumor músculo liso*, linfoma)	<i>H. pylori</i> (176) (Adenocarcinoma gástrico, VIPoma)
ERROR INNATO INMUNIDAD	WHIM Epidermodisplasia verruciformis <i>GATA2</i> <i>STK4</i> <i>DOCK8</i> LAD-I <i>IL2RG/JAK3</i> Ataxia telangiectasia Deficiencia de CD28 Síndrome Netherton NEMO IDCG Síndrome de Wiskott–Aldrich Inmunodeficiencias secundarias	APDS <i>TNFRSF9</i> , <i>CD27</i> , <i>CD70</i> , <i>CORO1A</i> , <i>CTPS1</i> , <i>ITK</i> , <i>MAGT1</i> , <i>RASGRP1</i> , <i>STK4</i> , <i>SH2D1A/XIAP</i> , <i>GATA2</i> * <i>CARMIL2</i> *	IDCV

Tabla 4b. Asociación infección, inmunodeficiencia y cáncer

NEOPLASIA	EII (177)
Leucemia Mieloide Aguda	<i>GATA2</i> ,(170,178) <i>SAMD9/L</i> ,(179) Defectos reparación DNA, telomeropatías (180)
Leucemia Linfoblástica Aguda	CMMRD, telomeropatías, <i>TCF3</i> (181)
Linfoma Hodgkin	<i>ADA2</i> (182)
Linfoma No Hodgkin	IDCV,(183) APDS,(184) ALPS, <i>STAT3</i> (185), <i>TET2</i> ,(148) Defectos reparación DNA (186)
Tumores del espectro CMMRD: Glioma de alto grado, adenocarcinoma de colon, hepatocarcinoma, rabdomiosarcoma, Tumor Wilms, neuroblastoma	CMMRD (187): <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>POLE</i>
Colangiocarcinoma	<i>CD40LG</i> (188)
Carcinoma papilar tiroides	<i>STAT3</i> (185)
Dermatofibrosarcoma protuberans	<i>ADA</i> , (189) <i>ERCC2</i> (190)

Existen diversos mecanismos involucrados en la reparación del DNA. La radiosensibilidad y el defecto en la reparación del DNA no es una característica restringida a los defectos de reparación del NHEJ (191) (192). Dentro de las IDC, la radiosensibilidad está presente en otros defectos monogénicos además de los defectos de reparación del DNA, como la deficiencia de *ARPC1B* (193). Incluso los pacientes con IDCV muestran radiosensibilidad cromosómica en los ensayos de reparación en ciclo celular (G2 y G0) comparado con sujetos sanos (194,195). Por tanto, ya sea por un defecto humoral o celular debe limitarse la exposición radiológica a las pruebas estrictamente necesarias y sustituirlas por técnicas libres de irradiación siempre que sea posible (196).

1.8. TRATAMIENTO DE SOPORTE.

1.8.1. Profilaxis antibiótica

Los pacientes con EII humorales deben recibir en las agudizaciones respiratorias tratamiento antimicrobiano sin demora. El retraso en la administración de antibioterapia se asocia a daño estructural (bronquiectasias) (197). El empleo de profilaxis antibiótica en las deficiencias humorales es controvertido, por el riesgo de desarrollar resistencias antimicrobianas. Sin embargo, algunos grupos han mostrado resultados positivos con su uso. En las formas menores de deficiencia de anticuerpos, la deficiencia específica de anticuerpos, un ensayo aleatorizado reciente muestra que no hay mejora significativa al añadir tratamiento sustitutivo a la profilaxis habitual (198). En cualquier caso, cuando la producción de IgG residual es menor (agammaglobulinemia o IDCV) el consenso sobre el empleo de profilaxis antibiótica reside en su empleo individualizado y restringido a pacientes con infecciones de repetición (habitualmente más de 3 al año), a pesar de un tratamiento sustitutivo correcto (199). En los pacientes con deficiencias combinadas, en presencia de linfopenia CD4 grave o diagnóstico molecular de IDC(G) debe instaurarse profilaxis frente a *Pneumocystis jiroveci* con trimetoprim/sulfametoxazol 1-3 días en semana a 5-10mg/kg/día, en diferentes pautas con similar eficacia (200).

1.8.2. Vacunación en el paciente con EII

Los pacientes con EII deben ser vacunados según su susceptibilidad individual teniendo en cuenta que ciertas inmunizaciones pueden estar contraindicadas o directamente no ser eficaces (201). Se recomienda evitar la exposición a los potenciales patógenos en la medida de lo posible. Los pacientes con agammaglobulinemia o con defectos celulares graves (IDCG) no deben recibir vacunas de virus vivos atenuados. La administración de vacunas basadas en tecnología de mRNA

es controvertida en los pacientes con interferonopatías por el riesgo teórico de desencadenar brotes (202). El resto de vacunas se pueden administrar, aunque es controvertido porque la eficacia puede estar disminuida o muy disminuida. En los pacientes con inmunodeficiencias celulares moderadas (ej. Síndrome de Wiskott-Aldrich) una alternativa para la vacunación con virus vivos atenuados es administrar en primer lugar la vacuna antivariola, donde se puede administrar aciclovir (endovenoso si fuera necesario con la aparición de clínica relevante) y, en ausencia de eventos adversos, administrar la vacuna de la triple vírica (sarampión, rubeola, parotiditis) en un segundo tiempo. Esto es particularmente relevante para inmunodeficiencias combinadas o de desregulación que pueden requerir tratamiento inmunosupresor (ej. JAKinibs en pacientes con STAT3 GOF o sirolimus en ALPS)(203,204) donde la suspensión transitoria del tratamiento inmunosupresor puede permitir la vacunación y conseguir una adecuada producción de anticuerpos protectores (205). Todos los pacientes deben recibir vacunación antigripal anual (en IDCV se consigue producción de anticuerpos entre el 29 y el 86% de los pacientes), recomendación extensible a sus convivientes (206).

1.8.3. Tratamiento sustitutivo con gammaglobulina inespecífica

Los pacientes con un defecto de producción de anticuerpos ya sea por un defecto humoral o un defecto combinado deben recibir tratamiento sustitutivo con gammaglobulina inespecífica. La administración exógena de gammaglobulina disminuye el riesgo de infecciones de repetición (207). Este tratamiento se empleó por primera vez por Ogden Bruton, pediatra del Walter Reed Hospital (Maryland, Bethesda, EEUU) en 1952 en un varón de 8 años; este niño había presentado, en los 4 años previos, 19 sepsis por enfermedad neumocócica invasiva en ausencia de capacidad de producción de anticuerpos frente a *S. pneumoniae*. Desde la instauración del tratamiento sustitutivo con 3,2 gramos de gammaglobulina al mes vía subcutánea no volvió a presentar

infecciones durante los siguientes 14 meses (208). Durante varias décadas se empleó el tratamiento sustitutivo por vía intramuscular (IM) hasta principios de los años 90; el motivo de ello fue que el profesor Janeway recibió una infusión intravenosa en los años 70. Al experimentar anafilaxia con la primera infusión no se volvió a emplear esta vía hasta 2 décadas después) (209). La vía IM tiene desventajas como el dolor durante la administración, el riesgo de infecciones profundas y el escaso volumen infundido. En la primera década de los años 2000 se generaliza el uso de la vía subcutánea, permitiendo una administración semanal. Hasta mediados de la segunda década del siglo XX la vía de administración preferencial fue la endovenosa, con efectos adversos como cefalea, pérdida de eficacia a partir de la tercera semana (efecto “wear off”) (210), reacciones infusionales y, en ocasiones, meningitis aséptica (211). Sin embargo, no es hasta 2014 que se aprueba por los organismos reguladores la inmunoglobulina subcutánea facilitada con hialuronidasa recombinante, que permite la administración de grandes volúmenes de medicación (700ml) por cada punto de infusión a altas velocidades (300ml/h) en un solo punto de infusión. Con esta vía los pacientes presentan efectos adversos locales leves pero no presentan -excepto una minoría de ellos- los efectos adversos sistémicos anteriormente referidos. Los estudios sobre la preferencia del paciente, sobrecarga por el tratamiento y calidad de vida muestran que, como norma general (y a igualdad de eficacia), los pacientes prefieren la administración en su domicilio, en un solo punto de infusión y con una periodicidad mensual (212). El objetivo del tratamiento es mantener al paciente libre de infecciones respiratorias recurrentes, con una dosis orientativa entre 400 y 600 mg/kg y mes (213). Si bien cada paciente presenta un nivel por debajo del cual puede presentar infecciones recurrentes se considera que, en ausencia de patología pulmonar crónica, unos niveles de IgG valle alrededor de 700 mg/dL son adecuados (214).

1.8.4. Terapias celulares: TPH y Terapia génica.

Durante décadas, el tratamiento definitivo para los EII más graves ha sido el TPH, cuyas indicaciones se resumen en la Tabla 5. Los avances en el campo de la terapia génica permiten ofrecen alternativas al TPH para ciertos pacientes con EII, con vectores lentivirales seguros y eficaces (cuyo uso está ampliamente extendido para la deficiencia de cadena gamma común, deficiencia de ADA y síndrome de Wiskott Aldrich dentro del grupo de inmunodeficiencias combinadas) (215).

Tabla 5. Resumen de las indicaciones de TPH. Adaptado de (216)

OBJETIVO DEL TPH	ERROR CONGÉNITO INMUNIDAD
Curativo	IDC, IDCG, EGC, DOCK2, DOCK8, IPEX, WIP, ARPC1B, CD40L, XLP1, XLP2, APDS, HLA clase II, STAT3 LOF, CTLA4, LRBA, HLHp, GATA2, RAB27A, LAD1, Disgenesia reticular.
Parcialmente curativo	Hipoplasia pelo-cartílago, PGM3, STAT1 y STAT3 GOF, Neutropenia severa congénita, ADA2, C1Q, CD25, IL10/IL10R, defectos reparación DNA doble cadena.
Controvertido	IDCV, agammaglobulinemia, otras deficiencias complemento, síndrome CATCH22 completo, Deficiencia IKBA, NEMO.

1.9. Novedades descritas desde la publicación de los artículos de este trabajo

Desde la publicación de los artículos contenidos en este trabajo ha habido algunos avances en los EII considerados: Desde el punto de vista diagnóstico las técnicas de secuenciación masiva se han impuesto de un modo definitivo a la secuenciación clásica independientemente de un fenotipo clínico o inmunológico.

1. APDS: El fenotipo se expande con la contribución de cohortes, como la iraní que incluye 6 pacientes con APDS1 y 9 pacientes con APDS2, donde se observa mayor mortalidad en

este último grupo (66,7%) (217). Es necesario considerar este EII incluso en el adulto joven (218). Se encuentran en fase temprana de ensayo clínico (fase 1) otros inhibidores específicos, como seletalisib o leniolisib en fase II/III(219). En el síndrome APDS2 se ha empleado con éxito el uso de JAKinibs (Tofacitinib) para la artritis (220). Como tratamiento definitivo el TPH en un estudio retrospectivo de 57 pacientes demuestra una supervivencia a 2 años del 86% con reversión del fenotipo en el 96% de los pacientes (221). La generación de iPSCs son una estrategia preliminar de cara a la aproximación mediante terapia génica para este síndrome (222).

2. *NFKB1*: La deficiencia de NFKB1 presenta gran variabilidad fenotípica (29). Se ha descrito aisladamente un paciente con variantes patogénicas confirmadas funcionalmente tanto en *NFKB1* como en *PIK3R1* (223). En un trabajo reciente se muestra que para un gran número de variantes previamente descritas como patogénicas no se ha podido demostrar la deficiencia de NFKB1 desde el punto de vista bioquímico (224). No ha habido avances terapéuticos en este EII.
3. *Cernunnos/XLF*: En una revisión reciente de la literatura se ha identificado el fallo de medro y la microcefalia en el 81,6% y el 77,6% de los pacientes, respectivamente (225). Se ha evidenciado que los pacientes pueden presentar diversidad normal del repertorio TCR y BCR (226). Ocasionalmente se ha descrito la reversión de la monosomía del 7 como dato de síndrome mielodisplásico en un paciente no trasplantado tras 20 años de seguimiento (227). Desde el punto de vista diagnóstico una aproximación es el ensayo PROMIDIS α que consiste en la evaluación por NGS del reordenamiento del TCR α , alterado en los defectos de reparación del NHEJ (191). La citometría de flujo es útil para el diagnóstico de todos los defectos de reparación del NHEJ conocidos excepto para

algunos casos de deficiencia de Artemis (228). El desarrollo de inhibidores de las quinasas relacionadas con la 3 quinasa no fosfatidilinositol (no PIKK) de otros miembros del NHEJ puede permitir un abordaje farmacológico de los defectos en NHEJ (229). La sociedad europea de inmunodeficiencias (ESID) junto con el grupo de trasplante ha publicado guías específicas de TPH en EII, incluyendo los defectos de reparación del DNA (230).

En este trabajo se han estudiado pacientes sin diagnóstico molecular. Este tipo de estudios fortalecen el conocimiento sobre enfermedades de baja frecuencia en la población (raras) como son los EII. Lo anterior permite conocer las moléculas y vías de activación del sistema inmune cuya integridad es necesaria para su correcto funcionamiento, permitiendo un tratamiento personalizado en estos pacientes con medicina de precisión.(231)

2. OBJETIVOS

La identificación precoz del diagnóstico molecular en IDP permite un tratamiento dirigido en pacientes afectos, tanto de deficiencias celulares como humorales o de desregulación. Dicho tratamiento disminuirá la morbilidad y la mortalidad de estos pacientes mediante el tratamiento general y dirigido a disminuir la morbilidad. Concretamente, la secuenciación masiva de ADN (Next generation sequencing, NGS) permitiría identificar pacientes con el mismo defecto molecular e incluso con la misma mutación y fenotipos clínicos diversos.

El objetivo principal de esta tesis es el estudio clínico, inmunológico y molecular de IDP/EII del grupo de IDC o IDCG.

Los objetivos secundarios son:

- 1.- Caracterizar clínica, inmunofenotípica y genéticamente pacientes con infecciones oportunistas y evaluar si los pacientes presentan un fenotipo clínico novedoso de inmunodeficiencia combinada.
- 2.- Profundizar en las bases moleculares de las IDP descritas y entender cómo afecta la alteración molecular a la actividad/funcionalidad de la proteína para mejorar el conocimiento de la relación genotipo-fenotipo y la historia natural de estas enfermedades.
- 3.- Identificar las causas de la variabilidad fenotípica de los pacientes con defectos de reparación del DNA e idénticas mutaciones
- 4.- Evaluar la contribución del abordaje multidisciplinar realizado mediante estudios de citometría de flujo, y la decisión de realizar o no un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Evaluar el impacto de dichas medidas.

3. PUBLICACIONES

- Capítulo 1. Acquired and Innate Immunity Impairment and Severe Disseminated Mycobacterium genavense Infection in a Patient With a NF- κ B1 Deficiency.
Gonzalez-Granado LI, Ruiz-García R, Blas-Espada J, Moreno-Villares JM, Germán-Díaz M, López-Nevado M, Paz-Artal E, Toldos O, Rodríguez-Gil Y, de Inocencio J, Domínguez-Pinilla N, Allende LM. Front Immunol. 2019 Jan 29; 9:3148. doi: 10.3389/fimmu.2018.03148.

- Capítulo 2. Extreme Phenotypes With Identical Mutations: Two Patients With Same Non-sense NHEJ1 Homozygous Mutation. Recio MJ, Dominguez-Pinilla N, Perrig MS, Rodríguez Vigil-Iturrate C, Salmón-Rodríguez N, Martínez Faci C, Castro-Panete MJ, Blas-Espada J, López-Nevado M, Ruiz-García R, Chaparro-García R, Allende LM, **Gonzalez-Granado LI**. Front Immunol. 2019 Jan 7;9:2959. doi: 10.3389/fimmu.2018.02959.

- Capítulo 3. Disseminated abscesses due to Mycoplasma faucium in a patient with activated PI3K δ syndrome type 2 (APDS2). Domínguez-Pinilla N, Allende LM, Rosain J, Gallego María Del C, Chaves F, Deswarte C, Viedma E, de Inocencio Arocena J, Ruiz-Contreras J, Bustamante J, **Gonzalez-Granado LI**. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018 Feb 24. pii: S2213-2198(18)30106-5. doi: 10.1016/j.jaip.2018.02.014.



Acquired and Innate Immunity Impairment and Severe Disseminated *Mycobacterium genavense* Infection in a Patient With a NF- κ B1 Deficiency

Luis Ignacio Gonzalez-Granado^{1,2*}, Raquel Ruiz-García^{2,3†}, Javier Blas-Espada^{2,3}, José Manuel Moreno-Villares⁴, Marta Germán-Díaz⁴, Marta López-Nevado^{2,3}, Estela Paz-Artal^{2,3,5,6}, Oscar Toldos⁷, Yolanda Rodríguez-Gil⁷, Jaime de Inocencio⁸, Nerea Domínguez-Pinilla^{2,9} and Luis M. Allende^{2,3}

OPEN ACCESS

Edited by:

Stuart G. Tangye,
Garvan Institute of Medical Research,
Australia

Reviewed by:

Bertrand Boisson,
Rockefeller University, United States
Vanessa L. Bryant,
Walter and Eliza Hall Institute of
Medical Research, Australia
Rohan Ameratunga,
Auckland City Hospital, New Zealand

*Correspondence:

Luis Ignacio Gonzalez-Granado
luisignacio.gonzalez@salud.madrid.org

[†]These authors have contributed
equally to this work and are first
authors

Specialty section:

This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 31 July 2018

Accepted: 20 December 2018

Published: 29 January 2019

Citation:

Gonzalez-Granado LI, Ruiz-García R,
Blas-Espada J, Moreno-Villares JM,
Germán-Díaz M, López-Nevado M,
Paz-Artal E, Toldos O, Rodríguez-Gil Y,
de Inocencio J, Domínguez-Pinilla N
and Allende LM (2019) Acquired and
Innate Immunity Impairment and
Severe Disseminated *Mycobacterium*
genavense Infection in a Patient With
a NF- κ B1 Deficiency.
Front. Immunol. 9:3148.
doi: 10.3389/fimmu.2018.03148

¹ Primary Immunodeficiencies Unit, Department of Pediatrics, School of Medicine, University Hospital 12 de Octubre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ² Research Institute Hospital 12 Octubre (I+12), Madrid, Spain, ³ Immunology Department, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, ⁴ Pediatric Nutrition, Pediatrics, University Hospital 12 de Octubre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ⁵ School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ⁶ Immunology Department, University San Pablo CEU, Madrid, Spain, ⁷ Pathology Department, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, ⁸ Pediatric Rheumatology Unit, Department of Pediatrics, University Hospital 12 de Octubre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ⁹ Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

Background: NF- κ B1 is a master regulator of both acquired and innate responses. *NFKB1* loss-of-function mutations elicit a wide clinical phenotype with asymptomatic individuals at one end of the spectrum and patients with common variable immunodeficiency, combined immunodeficiency or autoinflammation at the other. Impairment of acquired and innate immunity and disseminated *Mycobacterium genavense* infection expands the clinical and immunological phenotype of NF- κ B1 deficiency.

Objective: Functional and molecular characterization of a patient with a novel phenotype of NF- κ B1 deficiency.

Methods: Circulating T, B, dendritic cell subsets and innate or unconventional T-cells were quantified. The cytokine production in stimulated whole blood samples was assessed and molecular characterization by next generation sequencing and gene expression assays were also performed.

Results: We report a patient presenting with features of combined immunodeficiency (CID) and disseminated *Mycobacterium genavense* infection. Sequencing of genomic DNA identified a novel synonymous mutation (c.705G > A) in *NFKB1* gene which resulted in exon 8 skipping and haploinsufficiency of the NF- κ B1 subunit p50. The susceptibility to atypical mycobacterial infection has not been previously reported and may be the result of a dendritic cell deficiency. A selective deficiency of circulating follicular helper T (cTFH) cells responsible for mediating the differentiation of naive B cells into memory and plasma cells was also present in the patient. It could affect the maturation of innate or unconventional T cells where NF- κ B1 could also be involved.

Conclusion: These findings showed that the role of NF- κ B1 in humans could be critical for the development of acquired and innate immunity and further highlights the role of human T cells in anti-mycobacterial immunity.

Keywords: factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, *NFKB1* gene, primary immunodeficiency, common variable immunodeficiency, mendelian susceptibility to mycobacterial disease, *Mycobacterium genavense*, submucosal lymphocytic pleuritis, Langerhans cell histiocytosis

KEY POINTS

- The clinical spectrum of NF- κ B1 deficiency in humans is expanding and includes increased susceptibility to atypical mycobacterial infection.
- Pleiotropic immune defects can be identified in conventional and unconventional T compartment and dendritic cells, recapitulating the phenotype of NF- κ B1 deficiency.

INTRODUCTION

The nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B-cells (NF- κ B) is a pleiotropic transcription factor present in almost all cell types and represents the endpoint of a series of signal transduction events initiated by a vast array of stimuli related to many biological processes such as inflammation, apoptosis, differentiation, cell growth, tumorigenesis, and immunity (1). Mutations in several genes encoding molecules of the NF- κ B pathway have been associated with primary immunodeficiencies (2) including new combined and antibody defects such as CARD-BCL10-MALT1 (3) and NF- κ B2 (4), respectively.

Heterozygous mutations of *NFKB1* gene lead to haploinsufficiency of NF- κ B1. It was initially described in patients with common variable immunodeficiency (CVID) (5). The presentation of NF- κ B1 deficiency has since expanded to include more diverse immunologic phenotypes ranging from combined immunodeficiency (CID) (6, 7) to autoinflammatory disease (8, 9), broadening the clinical phenotype.

In this report, we present the clinical and immunological phenotype of a family with a novel synonymous mutation in *NFKB1* gene that affected the canonical splicing of the gene resulting in skipping of exon 8 and reduced expression of the NF- κ B1 p105 and p50.

The patient suffered from disseminated *Mycobacterium genavense* infection, due to a CID that affected his acquired and innate immunity. *Mycobacterium genavense* is a relatively new species of non-tuberculous mycobacterium reported to cause disseminated infections in primary and secondary immunodeficiencies (i.e., AIDS). We also studied two asymptomatic mutation-carrying relatives without the clinical phenotype.

Abbreviations: CID, Combined immunodeficiency; NF- κ B1, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1; MSMD, Mendelian susceptibility to mycobacterial disease; IgG, immunoglobulin G; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgE, immunoglobulin E; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PID, primary immunodeficiency; TRECs, T-cell receptor rearrangement excision circles; KRECs, K-deleting recombination excision circles; MAIT cells, Mucosal associated invariant T cells.

METHODS

Immunophenotyping and Functional Assays

Immunophenotyping was performed on peripheral blood for the identification of T, B, NK, and dendritic cells (DCs). Conjugated anti-human monoclonal antibodies are listed in **Supplementary Table 1**. Flow cytometry data were collected using a Beckman Coulter Navios cytometer and analyzed with Kaluza 1.5a software (Beckman Coulter, Indianapolis IN, US).

Cytokines in stimulated whole blood were measured with ProcartaPlex™ 25-plex Immunoassay (Thermo Fisher) using Luminex®. Standard curves were constructed to interpolate analytes using ProcartaPlex Analyst version 1.0. The mean of technical duplicates was recorded.

NGS and Sanger Sequencing

Genomic DNA was extracted from EDTA blood samples using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). NGS were done by targeted gene sequencing with an in-house designed panel of 192 genes involved in primary immunodeficiency (PID) (Ampliseq, Life Technologies) (**Supplementary Table 2**) and by whole exome sequencing (WES) in the trio family. WES was based on an Illumina HiSeq2000 sequencing platform and an Agilent's SureSelect Target Enrichment System for 51 Mb. The reads were aligned against the human reference genome hg38 using the Burrows-Wheeler Alignment tool (BWA) (10). After reads mapping, low-quality reads and PCR duplicates were removed and with Picard Tools. For the variant calling process, different algorithms were applied, including VarScan (11) and the Genome Analysis Toolkit (GATK) (12). Python scripts were developed to combine variants. Variants annotation was based on Ensembl and NCBI databases.

Variants were filtered according to an autosomal dominant inheritance model. It is shown a schematic overview of the strategy used to filter variants through WES in order to identify potentially causative mutations (see **Supplementary Figure 1**).

NFKB1 synonymous variant was confirmed by Sanger sequencing. For DNA amplification, reactions were carried out in 100 μ L containing 5 U Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer), 200 μ M dNTPs, 0.5 μ M of each primer and 1 μ g of genomic DNA. Primers used for amplification of exon 8 of *NFKB1* gene were: gNFKB1 intron7 Forward 5': TTGGGCTTTATAAAA GCATGG, and gNFKB1 intron8 Reverse 5': GGCAGGGCTGGA AGTCTATT. PCR conditions were as follows: one cycle of 5 min at 95°C and 35 cycles of PCR (15 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 40 s at 72°C), followed by 10 min at 72°C for the final elongation.

RNA was extracted from peripheral blood lymphocytes from the patient and their family members by using RNeasy plus mini kit (Qiagen, Madrid, Spain). Reverse transcription was done on 0.5 μ g of cytoplasmatic RNA, using a one-step RT-PCR method (Invitrogen), by using specific primers for the reaction that cover from exon 7 to exon 9 of *NFKB1* gene. The primers used were: *NFKB1*_mRNA_ex7Forward 5'-TTGAAACACTGGAAG CACGA and *NFKB1*_mRNA_ex9Reverse 5'-ATTTCCTCCCCT CCAGTCAC. RT-PCR conditions were as follows: one cycle of RT (20 min at 50°C followed by 5 min at 95°C) and 35 cycles of PCR (15 s at 95°C, 30 s at 57°C, and 50 s at 72°C), followed by 10 min at 72°C for the final elongation. PCR products were screened by direct cycle sequencing. Double-strand DNA templates were sequenced using the dideoxy chain-terminator method of Sanger, with Applied Biosystems DyeDeoxy terminators.

Gene Expression Assays

Gene expression was analyzed by real-time PCR using a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and Taqman probes (*NFKB1*: Hs00765730-m1) (Thermo Fisher) in accordance with the manufacturer's instruction. GADPH was used as the endogenous control, and the level of expression of *NFKB1* of the patient, father and sibling were quantitatively measured in duplicates relative to that in two different healthy

donors. Western blotting was done according to methods described (5).

All experimental work was performed after written informed consent for publication of clinical and immunological information of the patient was provided from his parents and all adult participants. All human subject samples were consented under protocols approved by the Institutional Review Board (IRB) of our Institution. The study was approved by the IRB at Hospital 12 de Octubre. The study fulfilled the IRB standards for ethical conduct of research with human subjects.

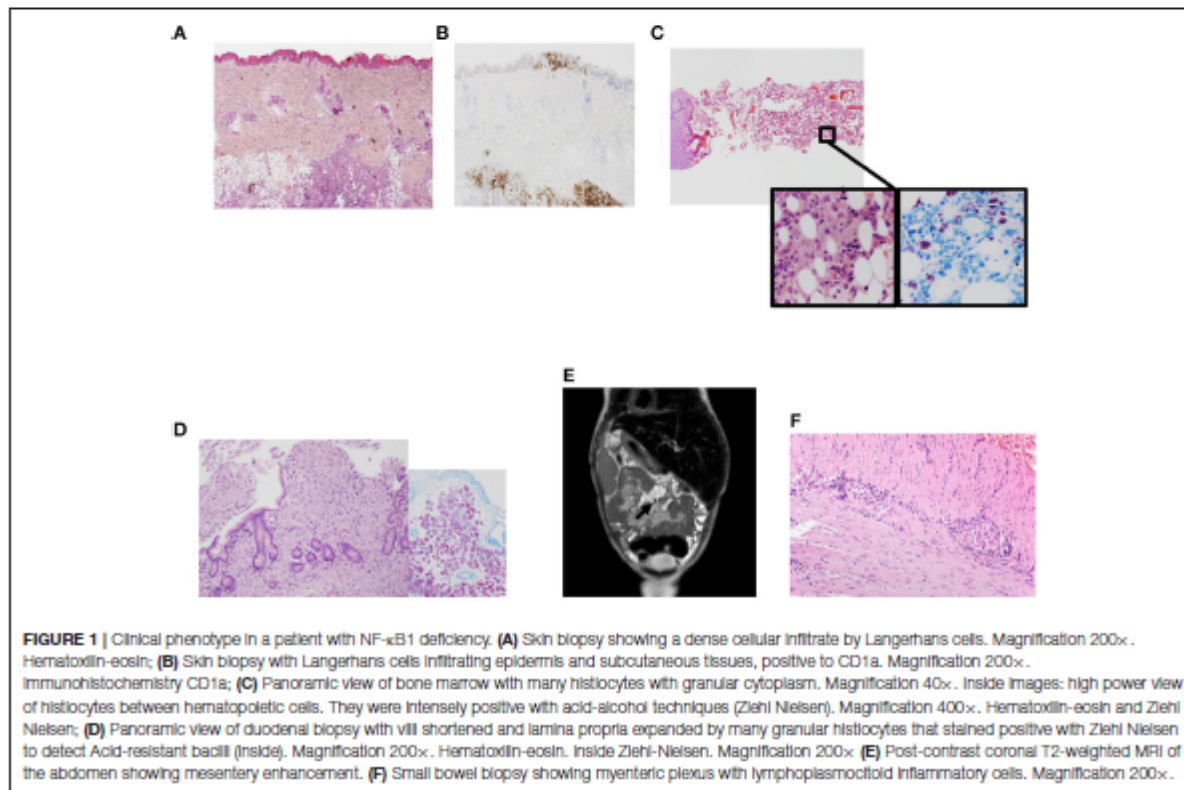
Statistical Analysis

The phenotypic studies were performed on the patient, brother and healthy donors at the age of 6.8 ± 0.4 , 10.75 ± 0.35 , and 4.8 ± 1.6 years (mean \pm SD), respectively. Significant differences were determined by using non-paired Student *t*-test (Prism; GraphPad software, La Jolla, Calif). A *p*-value of $< *0.05$, $**0.01$, and $***0.001$ were considered significant.

RESULTS

Case Presentation

A 7-years-old male born to non-consanguineous Caucasian parents presented to our center at the age of 8 months with cutaneous lesions on his trunk. Skin biopsy revealed



Langerhans cell histiocytosis (LCH) (Figures 1A,B). As the disease progressed (cutaneous and mucosal disease), systemic steroids were added achieving partial remission 3 months later. Shortly thereafter he developed worsening anemia, fever, marked hepatosplenomegaly, and oral ulcers. Radiographic skeletal survey imaging revealed lytic lesions in skull and tibia indicating disease progression. Bone marrow aspirate and trephine biopsy did not show infiltration. At this time, he was 18-months-old

and was treated according to protocol LCH-IV. During the continuation phase he received clofarabine due to refractory disease (13).

At the age of 3 years LCH was in remission and methotrexate and mercaptopurine were started as maintenance therapy. One month after starting treatment, he developed febrile neutropenia, abdominal pain and night sweats. Biopsies were obtained from bone marrow and gut detecting acid-alcohol

TABLE 1 | Immunologic features of the family.

Parameter	Ref values (3–10 y.o.)	Ref values (adults)	Patient 3 y.o.	Sibling 9 y.o.	Father adult
Lymphocyte ($10^9/\mu\text{L}$)	2,500–6,000	1,200–3,000	1,737	3,406	1,993
T CELLS					
CD3 ⁺ n ^o /mL (%)	1,400–4,300(52–88)	850–2,250(62–81)	1,541(89)	2,398(70)	1,321 (66)
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	0–10	NA	31	14	NA
CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ (%)	85–99	NA	98	94	NA
CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ + DNT (%)	0–2.5	NA	0.2	1.1	NA
CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$ (%)	2–15	NA	1	5	NA
CD4 ⁺ n ^o / μL (%)	800–2,500(33–55)	500–1,450(32–59)	293(17)	1,124(33)	817(41)
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ (Naive) (%)	42–82	20–82	18.8	60.9	30.8
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ (CM) (%)	15–30	15–35	6.2	20.5	31.9
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ (EM) (%)	8–30	20–40	74.3	17.6	35.5
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ (E) (%)	0.4–4	0.4–5	0.7	0.99	1.9
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ (%)	44–60	NA	10	45	NA
CD8 ⁺ n ^o / μL (%)	400–1,400(17–34)	160–950(15–36)	1,282(74)	1,192(35)	478(24)
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ (Naive) (%)	30–80	10–50	2.3	53.1	23.5
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ (CM) (%)	3–28	5–20	1.3	4.9	7.9
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ (EM) (%)	17–35	10–40	91.1	29.5	37.4
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ (TEMRA) (%)	2–15	5–35	5.3	12.5	31.1
TRECs (n ^o Copies/ μg DNA)	>10	NA	5.3	32	NA
T CELL PROLIFERATION					
Unstimulated	0–1,000	NA	878	356	NA
PHA (c.p.m.)	>30,000	NA	940	31,187	NA
Anti-CD3 (c.p.m.)	>10,000	NA	1,098	10,494	NA
Anti-CD3 ⁺ Anti-CD28 (c.p.m.)	>30,000	NA	3,146	32,235	NA
PMA + Ionomycin (c.p.m.)	>35,000	NA	7,662	39,576	NA
NK CELLS					
CD56 ⁺ CD3 ⁻ n ^o / μL (%)	100–650(2–20)	60–450(4–22)	87(5)	770(22.6)	419(21)
B CELLS					
CD19 ⁺ n ^o / μL (%)	400–1,500(9–28)	100–500(8–20)	52(3)	225(6.6)	239(12)
CD19 ⁺ CD27 ⁺ (%)	7–19	8–60	4.5	35.7	24
CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻ (%Naive)	75–89	59–88	95	59.4	75.3
CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ (%MZ)	2.6–7.1	3–12	0.9	18.3	13.8
CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺ (%SW)	4.5–20	10–40	2.3	17.4	10.2
CD19 ⁺ CD38 ^{hi} IgM ⁺ (%Transitional)	3–10	3–10	50.3	8.8	6.6
Plasmablasts	0.5–5	0.6–6	0.4	4.2	1.3
KRECs (n ^o Copies/ μg DNA)	>10	NA	5.9	14	NA
SERUM IMMUNOGLOBULINS (MG/DL)					
IgG (mg/dL)	600–1,230	700–1,600	958	967	1,310
IgA (mg/dL)	30–200	70–400	74	219	404
IgM (mg/dL)	50–200	40–230	49	102	198
SPECIFIC ANTIBODIES					
IgG vs. Pneumococcus (mg/dL)	>5.4	NA	0.6	NA	NA
IgG2 vs. Pneumococcus (mg/dL)	>2.4	NA	0.1	NA	NA
IgG vs. Tetanus toxoid (IU/mL)	>0.1	NA	0.86	1.9	NA
IgG a-HBsAg	>10	NA	Negative	NA	NA

DNT: CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻ Double negative T-cell. HBsAg, Hepatitis B surface antigen.

resistant bacilli identified as *Mycobacterium genavense* by PCR techniques (Figures 1C,D). The patient required four intravenous antimycobacterial drugs (rifampin, ethambutol, clarithromycin, and levofloxacin) at standard doses and improved clinically. Follow-up biopsies taken from both gut and bone marrow 1 year after starting specific therapy demonstrated clearing of non-tuberculous mycobacterial bacilli. The patient continued complaining of chronic abdominal pain which was attributed to post-chemotherapy enteritis. Due to the persistence of the pain an MRI was obtained (Figure 1E)

revealing sclerosing mesenteritis. Systemic corticosteroids were then added. The patient developed severe protein-losing enteropathy with malabsorption, becoming steroid-dependent and requiring long-term parenteral nutrition. A new gut biopsy revealed chronic lymphocytic pleinitis (Figure 1F). He had prolonged shedding after viral infections (RSV and norovirus, both requiring specific treatment with ribavirin in both cases).

During the last 2 years the patient has been asymptomatic and free of infections. Anti-mycobacterial treatment was withdrawn

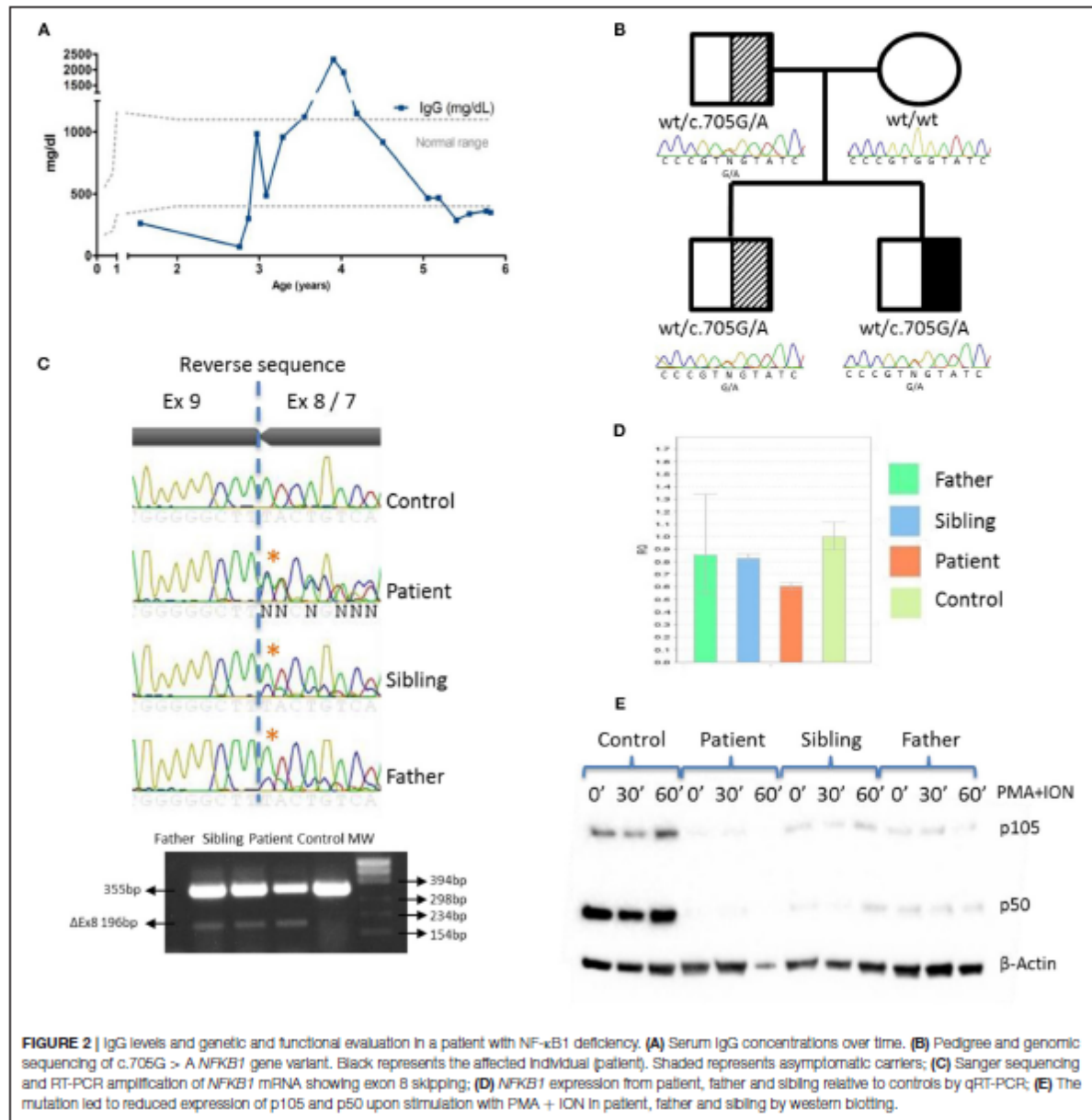


FIGURE 2 | IgG levels and genetic and functional evaluation in a patient with NF-κB1 deficiency. **(A)** Serum IgG concentrations over time. **(B)** Pedigree and genomic sequencing of *c.705G > A NFKB1* gene variant. Black represents the affected individual (patient). Shaded represents asymptomatic carriers; **(C)** Sanger sequencing and RT-PCR amplification of *NFKB1* mRNA showing exon B skipping; **(D)** *NFKB1* expression from patient, father and sibling relative to controls by qRT-PCR; **(E)** The mutation led to reduced expression of p105 and p50 upon stimulation with PMA + ION in patient, father and sibling by western blotting.

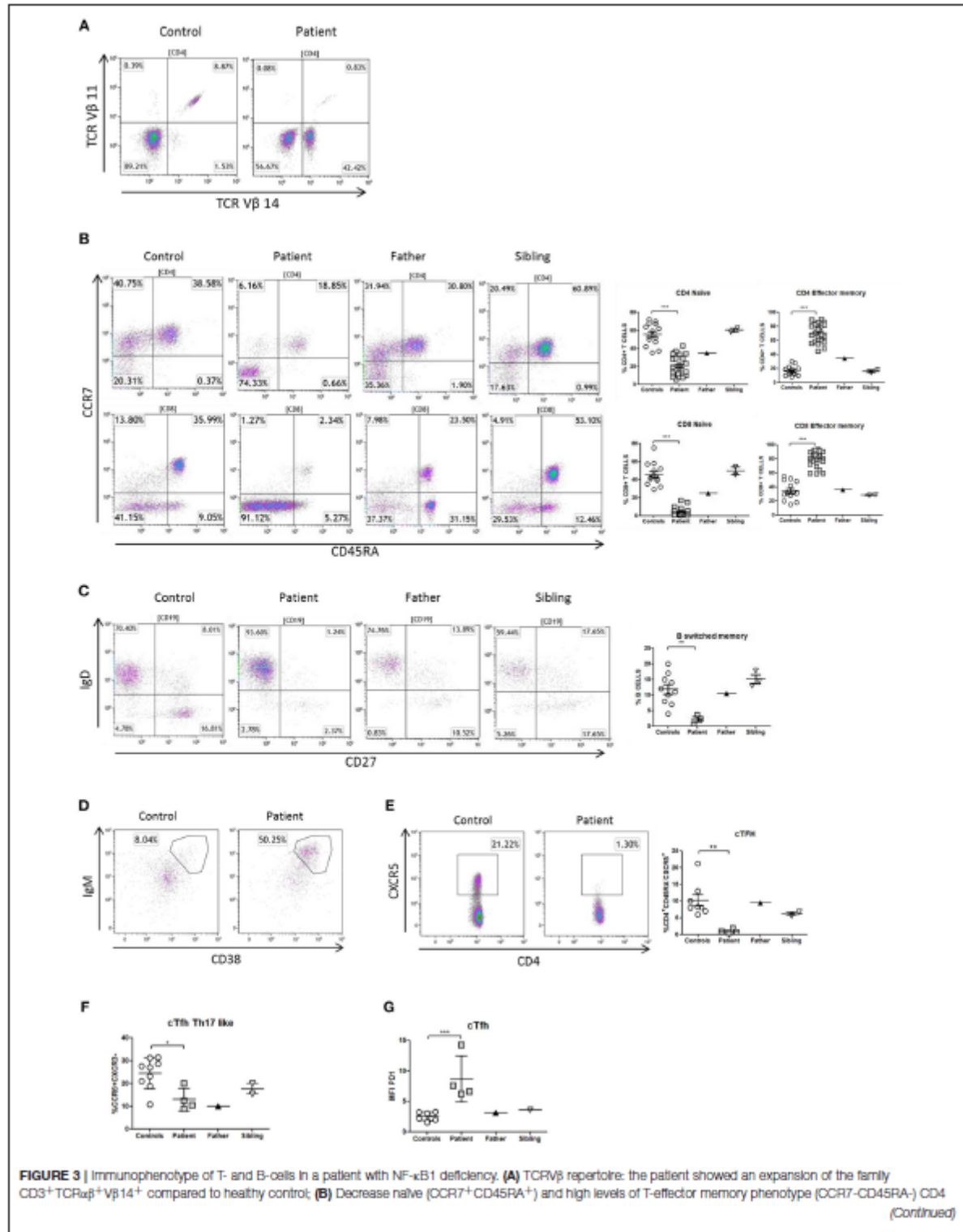


FIGURE 3 | and CD8 T-cells in the patient; it is also shown the dot plot of the father and sibling **(C)** The patient showed reduced switched memory B-cells (CD19⁺CD27⁺IgD⁻) compared to father, sibling and healthy controls; **(D)** The patient showed expansion of Immature transitional B cells (CD19⁺CD38⁺⁺IgM⁺⁺) and **(E)** deficiency of circulating follicular helper T (cTFH) cells (CD4⁺CXCR5⁺) compared to healthy control. **(F)** The patient showed reduced Th17-like, and **(G)** increased expression (MF) of PD1⁺⁺ in TFH-cells. The comparison in this figure was done with age matched healthy donors. Lines represent mean and bars represent the standard error of the mean. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

1 year ago without relapse. Currently, he is receiving oral clarithromycin as secondary prophylaxis.

Immunologic and Genetic Profile of a Family With NF- κ B1 Deficiency

The clinical and immunological phenotype of a family with a novel variant leading to splicing defect in *NFKB1* gene were studied. The index patient suffered disseminated *Mycobacterium genavense* infection due to a CID. The profile of the relatives and proband are described in **Table 1**. None of them had been vaccinated with BCG.

Immunophenotyping of the patient showed CD4, B, and NK cell lymphopenia at the age of 3 years. Serum immunoglobulins were normal until he was five and a-half-years-old, when decreasing IgG levels led to suspicion of a primary immunodeficiency (**Table 1**; **Figure 2A**).

A targeted-NGS panel of 192 PID related genes (**Supplementary Table 2**) revealed a heterozygous nucleotide substitution in exon 8 of *NFKB1* (c.705G > A) gene, not found in gnomAD or 1,000 genomes databases, that was predicted to be silent (p.Val235Val). No additional putative disease-causing mutations were identified by whole exome sequencing (WES) (**Supplemental Figure 1**). Sanger sequencing confirmed that the patient inherited the variant in an autosomal dominant fashion with variable penetrance from his father who is healthy. The patient has an older healthy sibling, which also carries the *NFKB1* mutation (**Figure 2B**). We also evaluated the potential functional impact of this mutation by assessing its influence on gene splicing with several computational tools (data not shown) (14), indicating that a cryptic donor splice site just upstream of this mutation could be activated, which would result in exon 8 skipping and assigned this variant as pathogenic. To verify this prediction, we sequenced a *NFKB1* cDNA fragment from exons 7 to 9, confirming an additional shorter product (Δ 159bp) that corresponded to exon 8 skipping (**Figure 2C**). However, we cannot rule out that a deep intronic mutation provokes exon 8 skipping. The skipping of exon 8 resulting in an in-frame 53aa deletion (p.Asp191_Lys244delinsGlu) and p50 haploinsufficiency (5) has been previously reported.

NFKB1 gene expression assays showed that the symptomatic patient presented less WT transcripts than the other mutation positive relatives (**Figure 2D**). The mutated protein p105 Δ Ex8 led to rapid degradation and to haploinsufficiency of the p50 protein (**Figure 2E**). These data confirmed that a heterozygous germline synonymous mutation (g.Chr4:103,500,171G > A; p.Asp191_Lys244delinsGlu) in *NFKB1* may be responsible for the novel form of CID in this patient. Similar to other gene defects with an impact on immune system control, *NFKB1* mutations lack complete penetrance (15).

Impact of NFKB1 Mutation in Acquired Immunity

The immunophenotype of the patient showed defective thymopoiesis with reduced recent thymic emigrants and T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECS), restricted T-cell repertoire, decreased naïve and increased effector phenotype in CD4 and CD8 T-cells, as well as an impaired lymphoproliferative response to mitogens (**Table 1**; **Figures 3A,B**). These findings could be related to a senescent T-cell phenotype. Absolute counts and proportion of B-cells were low, with decreased immunoglobulin serum concentrations and absent vaccine responses to pneumococcal polysaccharide as well as to hepatitis A and B antigens prior to immunoglobulin replacement therapy (**Table 1** and **Figure 2A**). The patient had reduced switched memory B-cells and KRECS and expansion of transitional B cells (**Figures 3C,D**; **Table 1**). These findings were consistent with a CID phenotype where NF- κ B1 haploinsufficiency could also be involved.

Differentiation of naïve CD4 T-cells into a specialized memory CD4 T-cells named circulating follicular helper T (cTFH) cells is essential to produce a subset with the most efficient helpers for B-cell differentiation. In this context and expanding the immunological phenotype of NF- κ B1 deficiency, we have identified in this patient a cTFH deficiency with lacking CD4⁺CXCR5⁺ T-cells (**Figure 3E**). At the same time cTFH can be divided into different subpopulations according to CCR6 and CXCR3 expression of CD4 T-cells and cytokine production. The patient showed a low distribution of Th17-like memory subset (CD4⁺CXCR5⁺CD45RA⁻CCR6⁺CXCR3⁻) cells, which are key promoters of immunoglobulin secretion (**Figure 3F**). Moreover, cTFH from the patient had an increased PD1 expression in comparison to healthy donors (**Figure 3G**).

Whole blood assays showed that Th1 production (IFN γ), Th17 (IL-17A, IL-22) and B-cell helper/TFH (IL-10) cytokines were decreased in response to phytohemagglutinin (PHA) in comparison with healthy donors and healthy brother, according to the immunophenotype of the patient (**Figures 4A–D**).

Impact of NFKB1 Mutation in Innate Immunity

Analysis of patient's PBMCs confirmed a severe deficiency of the non-lymphoid (CD3-CD19-CD56-) HLA-DR⁺ DCs (**Figure 4E**) with normal pDCs and mDCs distribution. However, IL-12p70 and IL-12p40 production in response to LPS was preserved (data not shown), probably due to the secretion of those cytokines by monocytes.

TCR $\gamma\delta$ and MALT cells are innate or "unconventional" T cells that recognize lipids, small-molecule metabolites,

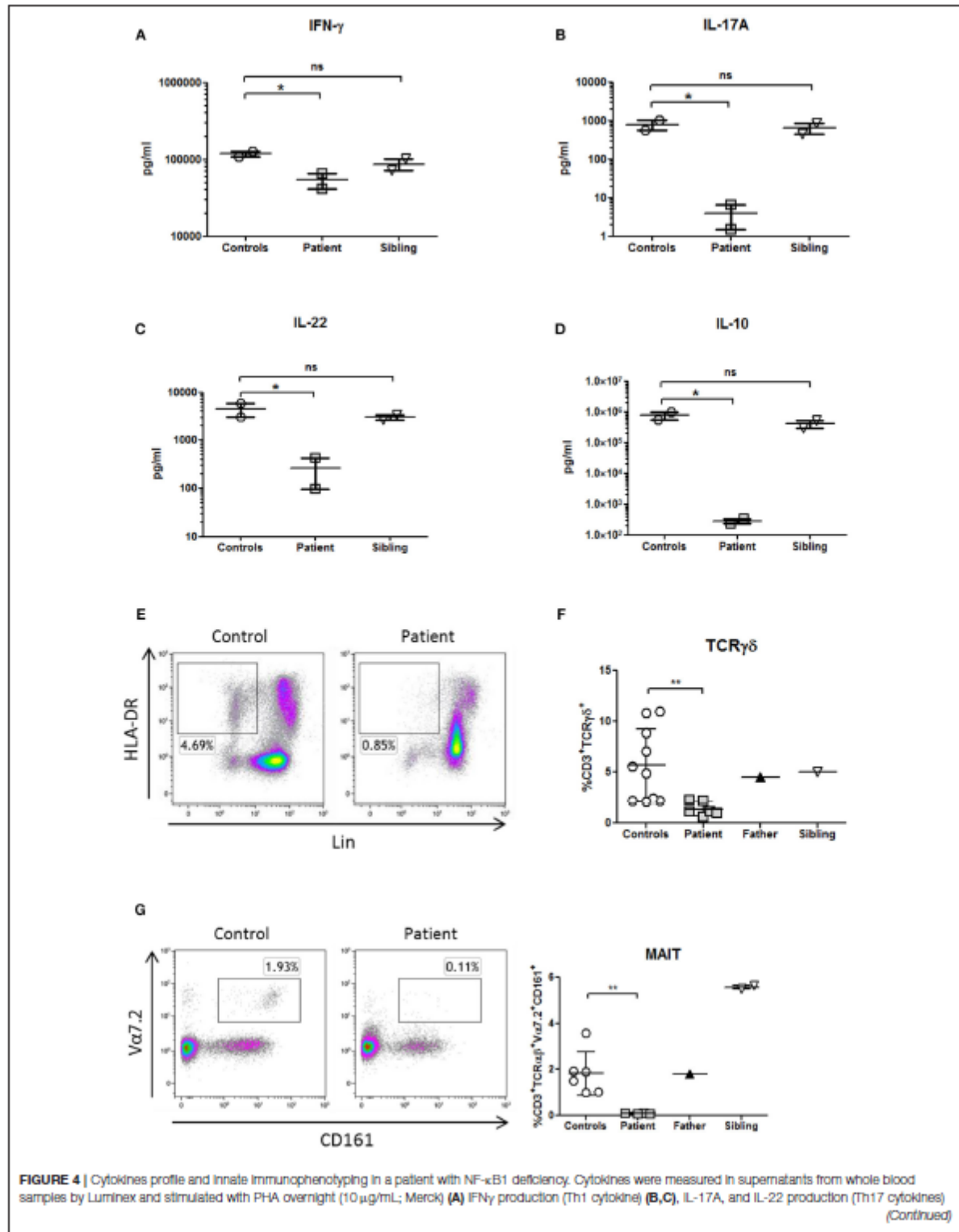


FIGURE 4 | and **(D)** IL-10 production (β -cell helper/TFH cytokine). All samples were assayed in duplicate in two different experiments. **(E)** Deficiency of dendritic cells (DCs) (HLA-DR⁺Lin⁻), **(F)** CD3⁺TcR $\gamma\delta$ ⁺, and **(G)** mucosal-associated Invariant T (MAIT) T-cells (CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺V α 7.2⁺CD161⁺) is shown in the patient. The comparison in this figure was done with age matched healthy donors. Lines represent mean and bars represent the standard error of the mean. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Statistical comparisons were performed with unpaired Student *t*-tests, with significance defined as *P*-values * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

and specially modified peptides and respond killing target cells, releasing cytokines (IL-17, IL-22 and others) and activating and regulating other cells of the immune system (16). In this context, TCR $\gamma\delta$ and MAIT cells from the patient were decreased in comparison to healthy controls (Figures 4E,G; Table 1). As previously shown, the production of IL-17A and IL-22 cytokines were also reduced in the patient in the context of a Th17 deficiency (Figures 4B,C).

DISCUSSION

Mycobacterium genavense is a ubiquitous non-tuberculous mycobacterium, first described as a human infection in the 1990s as a primary cause of fatal disseminated infection in patients with AIDS (17). *M. genavense* is also recognized as an opportunistic pathogen in patients without HIV who have secondary immunodeficiencies, including solid-organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation or immunosuppressive therapy (18). In this report, we describe a novel severe disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a patient with NF- κ B1 deficiency. LCH and the immunosuppressive treatments received by the patient initially led us to suspect a secondary immunodeficiency. However, the long-term CID finally made us consider a primary immunodeficiency. The two greatest decreases in naïve CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁺ lymphocytes were secondary to chemotherapy at 3 years of age and due to protein-losing enteropathy at age 5 years, respectively (Supplementary Figure 2 and Supplementary Table 3). Previous reports of patients with the same molecular defect only showed a mild to moderate clinical and immunological impairment (19). The condition could partially resemble mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD), but mutations in MSMD genes and congenital defects of phagocyte number or function (20) were ruled out. It is well-known that a number of PIDs as well as the MSMD group share the susceptibility to mycobacterial disease due to lack of IFN γ production. Not surprisingly, our patient has decreased IFN γ production (21). Finally, NGS confirmed a NF- κ B1 deficiency. It is likely that this immunophenotype was due to NF- κ B1 deficiency in a patient with LCH and its sequelae. During the last 2 years the patient has been asymptomatic and free of infections. Anti-mycobacterial treatment was withdrawn 1 year ago without relapse. Despite these facts, the immunological phenotype of the patient was maintained over time (for full correlation between clinical and immunological phenotype, see Supplementary Table 3).

Several findings highlight that interactions between dendritic cells (DCs), CD4⁺ T-cells and B-cells are required for TFH formation (22). As in this case, the deficiency of DCs and

the impairment of T- and B-compartment could produce a severe decrease of cTFH cells. These cells are responsible for mediating the differentiation of naïve B cells into memory cells and plasma cells, thereby providing effective humoral immunity against T-dependent antigens. For this reason, cTFH cells are used as a biomarker for dysfunctional humoral immunity (both immunodeficiency and autoimmunity). A wide spectrum of primary immunodeficiencies due to mutations in *CD40LG*, *ICOS*, *BTK*, and *STAT3* associate with TFH deficiency (23). A full comparison across PIDs with a putative TFH defect is summarized in Supplementary Table 4, where *STAT3* LOF recapitulates the findings also found in our patient with NF- κ B1 deficiency. NF- κ B1 deficiency in humans could also have a critical role in TFH pathophysiology as it has been demonstrated in murine models (24).

It is well-known that patients with DC deficiencies are prone to mycobacterial infections due to pDCs (GATA2) or mDCs (IRF8) depletion, related to its ability to present mycobacterial lipid or viral antigens, respectively (25). DCs are specialized antigen-presenting cells (APCs), positioned within the immune system to bridge innate and adaptive immunity. In this case, it would be difficult to know whether DC deficiency had any role in the dissemination of *M. genavense* infection because IL-12 production was conserved in the patient; it could be hypothesized, however, that DC deficiency precluded the interplay with other immune cells, including B and NK lymphocytes and innate immunity (26). In this context, circulating MAIT cells correlate significantly with the number of switched memory B cells in CVID patients and require B cells for their development. In addition, MAIT cells are involved in antimycobacterial immunity although it is not known whether they possess B cell helper functions (27, 28). While the source of the defect in innate-like T cells in this case is unclear, it is possible that the markedly reduced numbers of antigen presenting cells (DCs and B cells) could produce an impaired development of MAIT and TCR $\gamma\delta$ T-cells.

To summarize, NF- κ B1 deficiency has a wide phenotypic variation ranging from asymptomatic individuals to severe autoinflammatory symptoms mimicking Behçet's disease and inflammatory gastrointestinal diseases (9). Thus, this synonymous *NFKB1* LOF heterozygous mutation produces a non-fully penetrant CID phenotype showing predisposition to non-tuberculous mycobacterial infections. This report illustrates the first case of a synonymous nucleotide substitution in the coding region of *NFKB1* gene that results in abnormal splicing. Next generation sequencing is an important part of the immunologist's toolbox and the need to evaluate the biologic relevance of synonymous variants will continue to increase (14, 29). Taken together, these data

demonstrate a non-redundant role for NF- κ B1 in regulating acquired and innate immunity in human immune cells. Development of non-tuberculous mycobacterial infection deserves proper immune assessment consisting of T- and B-cell compartments as well as DCs, MAIT and TCR γ δ cells. The clinical phenotype of the patient to date has been dominated by non-tuberculous mycobacterial infection instead of CVID, as has been described in most cases of NF- κ B1 deficiency.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RR-G performed the laboratory work for this study, computational predictions, and drafted the manuscript. ML-N and JB-E performed some of the laboratory work for this study. MG-D, JM-V, ND-P, JdI, and LG-G were responsible for the clinical management of the patients. OT and YR-G provided histopathological assessment and drafted the manuscript as EP-A did. LG-G and LA designed the research, collaborated in computational predictions, and drafted the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

REFERENCES

- Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* (2011) 21:223–44. doi: 10.1038/cr.2011.13
- Paciolla M, Pescatore A, Conte MI, Esposito E, Incoronato M, Lioi MB, et al. Rare mendelian primary immunodeficiency diseases associated with impaired nf- κ b signaling. *Genes Immun.* (2015) 16:239–46. doi: 10.1038/gene.2015.3
- Pérez de Diego R, Sánchez-Ramón S, López-Collazo E, Martínez-Barricarte R, Cubillos-Zapata C, Ferreira Cerdán A, et al. Genetic errors of the human CARD-BCL10-MALT1 (CBM) complex: molecular, immunological, and clinical heterogeneity. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 136:1139–49. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.031
- Chen K, Coonrod EM, Kumánovics A, Franks ZF, Durtschi JD, Margraf RL, et al. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF- κ B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* (2013) 93:812–24. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.09.009
- Fliegau M, Bryant VL, 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.* (2015) 97:389–403. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.07.008
- Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, Lakatos K, Kager I, Trapin D, et al. NF- κ B1 haploinsufficiency causing immunodeficiency and EBV-driven lymphoproliferation. *J Clin Immunol.* (2016) 36:533–40. doi: 10.1007/s10875-016-0306-1
- Ameratunga R, Ahn Y, Jordan A, Lehnert K, Brothers S, Woon ST. Keeping it in the family: the case for considering late-onset combined immunodeficiency a subset of common variable immunodeficiency disorders. *Expert Rev Clin Immunol.* (2018) 14:549–56. doi: 10.1080/1744666X.2018.1481750
- Schipp C, Nabhani S, Bienemann K, Simanovsky N, Kfir-Erenfeld S, Assayag-Asherie N, et al. Specific antibody deficiency and autoinflammatory disease extend the clinical and immunological spectrum of heterozygous NFKB1 loss-of-function mutations in humans. *Haematologica* (2016) 101:e392–6. doi: 10.3324/haematol.2016.145136
- Kaustio M, Haapaniemi E, Göös H, Hautala T, Park G, Syrjänen J, et al. Damaging heterozygous mutations in NFKB1 lead to diverse immunologic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* (2016) 140:782–96. doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.054
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics* (2009) 25:1754–60. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* (2009) 25:2283–5. doi: 10.1093/bioinformatics/btp373
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* (2010) 20:1297–303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- Rodríguez-Galindo C, Jeng M, Khuu P, McCarville MB, Jeha S. Clofarabine in refractory Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* (2008) 51:703–6. doi: 10.1002/pbc.21668
- Gallejo-Bustos F, Gotea V, Ramos-Amador JT, Rodríguez-Pena R, Gil-Herrera J, Sastre A, et al. A case of IL-7R deficiency caused by a novel synonymous mutation and implications for mutation screening in SCID diagnosis. *Front Immunol.* (2016) 7:443. doi: 10.3389/fimmu.2016.00443
- Rieux-Laucat F, Casanova JL. Autoimmunity by haploinsufficiency. *Science* (2014) 345:1560–1. doi: 10.1126/science.1260791
- Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol.* (2015) 16:1114–23. doi: 10.1038/ni.3298
- Bessesen MT, Shlay J, Stone-Venohr B, Cohn DL, Reeves RR. Disseminated *Mycobacterium genavense* infection: clinical and microbiological features and response to therapy. *AIDS* (1993) 7:1357–61. doi: 10.1097/00002030.199310000.00009
- Hoefaloort W, van Ingen J, Peters EJ, Magis-Escorra C, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, et al. *Mycobacterium genavense* in the Netherlands: an opportunistic pathogen in HIV and non-HIV immunocompromised patients. An observational study in 14 cases. *Clin Microbiol Infect.* (2013) 19:432–7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03817.x
- Nijenhuis T, Klasen I, Weemaes CM, Preijers F, de Vries E, van der Meer JW. Common variable immunodeficiency (CVID) in a family: an autosomal dominant mode of inheritance. *Neth J Med.* (2001) 59:134–9. doi: 10.1016/S0300-2977(01)00151-6

FUNDING

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-PI16/2053) to LA and LG-G and PI2016/0044 to LG-G. The project has been co-financed with FEDER funds.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank María José Díaz-Madroñero, Isabel Castro and Ana Marín for their technical assistance and Maite Fernández and Marta Martín Cabezudo for their care of the patient. We thank Miguel Ángel Martínez for providing electron microscopy images. Rebeca Pérez de Diego and Jesus Ruiz Contreras for critical review of the article. We are very grateful for the collaboration of the family of the patient.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03148/full#supplementary-material>

20. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International union of immunological societies: 2017 primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity. *J Clin Immunol*. (2018) 38:96–128. doi: 10.1007/s10875-017-0464-9
21. Boisson-Dupuis S, Bustamante J, El-Baghdadi J, Camcioglu Y, Parvaneh N, El Azbaoui S, et al. Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunol Rev*. (2015) 264:103–20. doi: 10.1111/immr.12272
22. Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, et al. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4⁺ T cells into distinct effector subsets. *J Exp Med*. (2016) 213:1589–608. doi: 10.1084/jem.20151467
23. Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, et al. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. (2015) 136:993–1006.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.036
24. Hu H, Wu X, Jin W, Chang M, Cheng X, Sun SC. Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2011) 108:12827–32. doi: 10.1073/pnas.1105774108
25. Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol*. (2011) 11:575–83. doi: 10.1038/nri3046
26. Halim TY, Hwang YY, Scanlon ST, Zaghouani H, Garbi N, Fallon PG, et al. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat Immunol*. (2016) 17:57–64. doi: 10.1038/ni.3294
27. Wong EB, Ndung'u T, Kasprowitz VO. The role of mucosal-associated invariant T cells in infectious diseases. *Immunology* (2017) 150:45–54. doi: 10.1111/imm.12673
28. Arduini S, Dunne J, Conlon N, Feighery C, Doherty DG. Mucosal-associated invariant T cells are depleted and functionally altered in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. (2017) 176:23–30. doi: 10.1016/j.clim.2016.12.002
29. Platt CD, Massaad MJ, Cangemi B, Schmidt B, Aldhekri H, Geha RS. Janus kinase 3 deficiency caused by a homozygous synonymous exonic mutation that creates a dominant splice site. *J Allergy Clin Immunol*. (2017) 140:268–71. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.057

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Gonzalez-Granado, Ruiz-García, Blas-Espada, Moreno-Villares, Germán-Díaz, López-Nevado, Paz-Artal, Toldos, Rodríguez-Gil, de Inocencio, Domínguez-Pinilla and Allende. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Capítulo 2. Extreme Phenotypes With Identical Mutations: Two Patients With Same Non-sense NHEJ1 Homozygous Mutation.



Extreme Phenotypes With Identical Mutations: Two Patients With Same Non-sense *NHEJ1* Homozygous Mutation

Maria J. Recio^{1,2}, Nerea Dominguez-Pinilla^{2,3}, Melina Soledad Perrig^{1,2}, Carmen Rodriguez Vigil-Iturrate⁴, Nerea Salmón-Rodríguez^{2,5,6}, Cristina Martínez Faci⁴, María J. Castro-Panete⁷, Javier Blas-Espada^{2,7}, Marta López-Nevado^{2,7}, Raquel Ruiz-García^{2,7}, Rebeca Chaparro-García¹, Luis M. Allende^{2,7†} and Luis Ignacio Gonzalez-Granado^{2,5,6†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Andrew R. Gennery,
Newcastle University, United Kingdom

Reviewed by:

Silvia Clara Gillani,
Università degli Studi di Brescia, Italy
John Bernard Ziegler,
Sydney Children's Hospital, Australia

*Correspondence:

Luis Ignacio Gonzalez-Granado
luisignacio.gonzalez@salud.madrid.org

[†]These authors have contributed
equally to this work and share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 05 October 2018

Accepted: 30 November 2018

Published: 07 January 2019

Citation:

Recio MJ, Dominguez-Pinilla N,
Perrig MS, Rodriguez Vigil-Iturrate C,
Salmón-Rodríguez N, Martínez Faci C,
Castro-Panete MJ, Blas-Espada J,
López-Nevado M, Ruiz-García R,
Chaparro-García R, Allende LM and
Gonzalez-Granado LI (2019) Extreme
Phenotypes With Identical Mutations:
Two Patients With Same Non-sense
NHEJ1 Homozygous Mutation.
Front. Immunol. 9:2959.
doi: 10.3389/fimmu.2018.02959

¹ Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, School of Medicine, Complutense University, 12 de Octubre Health Research Institute (imas12), Madrid, Spain, ² Hospital 12 de Octubre Health Research Institute (imas12), Madrid, Spain, ³ Pediatric Hematology and Oncology Unit, University Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain, ⁴ Pediatric Hematology and Oncology Unit, University Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain, ⁵ Immunodeficiencies Unit, Pediatrics, University Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain, ⁶ Complutense University School of Medicine, Madrid, Spain, ⁷ Department of Immunology, University Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain

Cernunnos/XLF deficiency is a rare primary immunodeficiency classified within the DNA repair defects. Patients present with severe growth retardation, microcephaly, lymphopenia and increased cellular sensitivity to ionizing radiation. Here, we describe two unrelated cases with the same non-sense mutation in the *NHEJ1* gene showing significant differences in clinical presentation and immunological profile but a similar DNA repair defect.

Keywords: XLF/Cernunnos, *NHEJ1* mutation, DNA repair, severe combined immunodeficiency, lymphomagenesis, radiosensitive SCID (RS-SCID)

INTRODUCTION

Clinical Presentation and Laboratory Test Results

We report two patients harboring the same homozygous mutation in *NHEJ1* gene. Strikingly, their clinical phenotypes differed markedly. One presented with severe combined immunodeficiency whereas the other only had isolated thrombocytopenia and macrocytosis. Clinical characteristics are summarized in **Table 1**. Both patients presented severe lymphopenia: immunophenotyping of Patient 1 (P1) showed severe T and B-cell lymphopenia and normal to elevated NK cells (T⁻B⁻NK⁺ phenotype) in contrast to Patient 2 (P2) who presented a milder immunophenotype. T-cell compartment also showed differences between the two patients: P1 had a more senescent T-cell phenotype with increase in CD4⁺ and CD8⁺ effector memory (CCR7⁻CD45RA⁻) and decrease naïve and recent thymic emigrants (RTE) (CD4⁺CD45RA⁺CD31⁻) T cells and a higher proportion of activated T-cells (CD3⁺HLA-DR⁺) (**Table 2**). Of note, P1 had a severe decrease in CD8⁺ population mimicking the one reported in ZAP70 or HLA class I deficiencies among patients with combined immunodeficiency/severe combined immunodeficiency.

B cells were severely reduced in both patients. The B-cell profile in P2 showed a normal proportion of naïve, unswitched memory, switched memory, transitional, and plasmoblast B-cells. Serum immunoglobulins were reduced in P1. Due to age limitation, specific antibody response was

TABLE 1 | Clinical features of the patients with Cernunnos/XLF deficiency.

		P1	P2
Age	Origin	Caucasic	Caucasic
	Consanguinity	No	No
	Onset	1 m	9 m
	Current	1 year 10 m.	8 year 4 m.
Clinical features	Microcephaly	+	+
	Growth retardation	+	+
	Facial dysmorphism	-	+
Additional clinical features	Neurological manifestations	-	-
	Bone malformation	-	-
	Autoimmunity	-	+
	Cytopenias	-	+ (thrombocytopenia)
Infections	Respiratory tract infections	-	+
	Bacterial and opportunistic infection	-	-
	Urinary tract abnormalities	-	-
	Age at HSCT	4.5 m. and 9 months	7y. 10 m.
Outcome	Status	Alive and well (HSCT)	Alive and well (HSCT)

only tested in P2, showing a specific antibody deficiency: IgG and IgG2 levels against pneumococcus antigen were reduced while IgG levels against tetanus toxoid antigen showed normal values after vaccination. Regarding to the immunophenotype in T and B-cells, P1 had very low TRECs and KRECs copies, whereas P2 had preserved levels (Table 2).

The clinical presentation and immunologic features of both patients lead to suspicion of a primary immunodeficiency (PID). Accordingly, an in house targeted NGS sequencing panel for 192 PID related genes (Table 3) was performed and revealed a homozygous nucleotide substitution in exon 2 of *NHEJ1* gene (NM_024782, c.169C>T) that affects codon 57 and is predicted to result in a severely truncated protein (p.R57X), this mutational change has been previously described in two Cernunnos/XLF defective patients similar to P2 patient displaying microcephaly and slight lymphopenia (1–6). Sanger sequencing confirmed the variants in the patients which were inherited in autosomal recessive fashion from their healthy parents (Figure 1).

Increased sensitivity and decreased double strand breaks (DSB) rejoining to ionizing irradiation (IR) is a feature of Cernunnos/XLF deficient cells. Accordingly, a cell-survival assay revealed an increased IR sensitivity in fibroblasts from P2 similar to that observed in LIG4-deficient fibroblasts (Figure 2A). We also analyze DSB rejoining in primary fibroblasts from both patients (P1 and P2) by enumerating the rate of loss of γ -H2AX foci following exposure to γ -IR. The results showed impaired DSB rejoining after treatment with γ -irradiation and etoposide in both patients (Figure 2B). These findings are in agreement with previously published results in Cernunnos and LIG4-defective patients (7).

Comparative testing of DNA repair was also performed on T cells from the second patient (P2). Upon exposure of PBMCs to 10 Gy, induction and resolution of DNA damage was measured at various time points and a delayed kinetics of DNA repair were observed in P2 compared to a healthy control (Figure 2B).

METHODS

Cell Culture

Primary fibroblasts were grown in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin and streptomycin.

Immunofluorescence and Antibodies

To characterize the repair capacity of the patient's cells we scored the *in situ* modification of the histone variant H2AX, which is phosphorylated proximal to sites of DNA double-strand breaks. The number of phosphorylated H2AX (γ H2AX) foci in a nucleus is reported to be directly proportional to the number of DSBs, and de-phosphorylation coincides with DSB repair. Primary skin fibroblasts were irradiated with ionizing irradiation (^{137}Cs) or treated with 20 mM Etoposide for 1 h. After the indicated treatments, the slides were washed with PBS, fixed using 4% formaldehyde for 10 min at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min. Cells were incubated with primary antibodies for 1 h, the slides were washed with PBS and the bound antibodies were revealed by IgG Alexa fluor antibodies (Invitrogen). Nuclei were counterstained with DAPI, and slides were mounted for immunofluorescence. Images were taken with a fluorescent microscopy (Zeiss AxioImages.A1, Carl Zeiss). In a single experiment at least 30 cells per sample were counted.

Survival Assay

Primary skin fibroblasts were irradiated with ionizing radiation (^{137}Cs). After irradiation, the cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/mL in T75 flasks in triplicate. To evaluate cell sensitivity to γ -IR (1 and 3 Gy), adherent cells were trypsinized and counted 11 days later.

TABLE 2 | Immunologic features of patients with Cernunnos/XLF deficiency.

Parameter	RefValues (children)	P1	P2
Lymphocyte ($n^{\circ}/\mu\text{L}$)	2500–6000	809	879
T CELLS			
CD3+ $n^{\circ}/\mu\text{L}$ (%)	1400–4300 (52–88)	60 (7)	661 (75)
CD3+TCR $\alpha\beta$ (%)	85–99	5	54
CD3+TCR $\gamma\delta$ (%)	2–15	1	16
CD3+HLA-DR+ (%)	0–10	22	7
CD3+TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8- (%)	0–2.5	0.2	0.7
CD4+ $n^{\circ}/\mu\text{L}$ (%)	1000–2500 (33–55)	53 (7)	304 (35)
CD4+CD45RA+CCR7+ (Naive) (%)	32–82	4.1	45.4
CD4+CD45RA-CCR7+ (CM) (%)	15–30	41.5	28.9
CD4+CD45RA-CCR7- (EM) (%)	8–30	53.9	23.8
CD4+CD45RA+CCR7- (E) (%)	0.4–4	0.4	1.89
CD4+CD45RA+CD31+ (%)	44–60	2	ND
CD8+ $n^{\circ}/\mu\text{L}$ (%)	400–1400 (17–34)	6 (1)	264 (30)
CD8+CD45RA+CCR7+ (Naive) (%)	30–80	15.3	72.0
CD8+CD45RA-CCR7+ (CM) (%)	3–28	16.2	4.5
CD8+CD45RA-CCR7- (EM) (%)	17–40	59.5	16.7
CD8+CD45RA+CCR7- (TEMRA) (%)	2–15	9	6.8
TRECS (copies/punch)	> 10	< 10	50
NK CELLS			
CD56+CD3- $n^{\circ}/\mu\text{L}$ (%)	100–650 (2–20)	671 (83)	191 (21.7)
B CELLS			
CD19+ $n^{\circ}/\mu\text{L}$ (%)	400–1500 (9–28)	49 (6)	22 (2.5)
CD19+CD27+ (%)	7–19	ND	32
CD19+IgD+CD27- (%Naive)	75–89	ND	63
CD19+IgD+CD27+ (%MZ)	2.6–7.1	ND	14.9
CD19+IgD-CD27+ (%SW)	4.5–20	ND	17.10
CD19+CD38 ^{hi} IgM+ (%Transitional)	3–10	ND	13
Plasmablasts	0.5–5	ND	4.6
KRECS (copies/punch)	> 10	< 10	100
SERUM IMMUNOGLOBULINS (mg/dl)			
IgG (mg/dL)	600–1230	446	779
IgA (mg/dL)	30–200	18	<6.67
IgM (mg/dL)	50–200	40	109
SPECIFIC ANTIBODIES			
IgG vs. Pneumococcus (mg/dL)	>5.4	ND	2.9
IgG2 vs. Pneumococcus (mg/dL)	>2.4	ND	0.36
IgG vs. Tetanus toxoid (IU/mL)	>0.1	ND	9.10

ND, not determined.

Flow Cytometry

Proportions and lymphocyte count of T-, B-, and NK-cells were determined in blood samples using conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies and data were collected by flow cytometry using a Navios Cytometer (Beckman Coulter, Madrid, Spain) and analyzed with Kaluza 1.5a software (Beckman Coulter, Indianapolis IN, US).

PBMCs from patient and healthy controls were irradiated with 10Gy, fixed and stained for CD3, CD19, and phospho-histone H2AX. Mean fluorescence intensities (MFI) of γ H2AX were evaluated on gated CD3+ lymphocytes.

Immunoglobulins

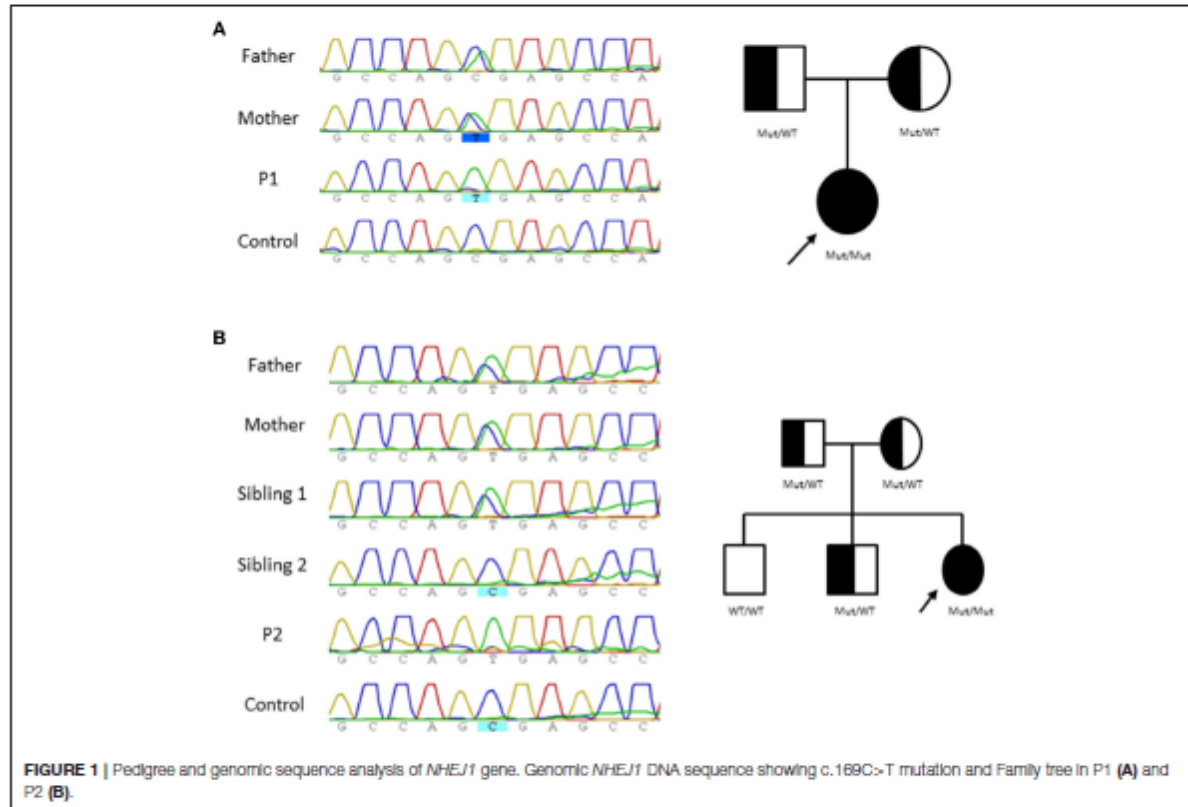
Total serum immunoglobulins (IgG, IgA, IgM, and IgE) were measured by nephelometry (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

NGS and Sanger Sequencing

Genomic DNA was extracted from EDTA whole blood using a MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, Madrid, Spain). Missense *NHEJ1* mutation was identified by targeted next-generation sequencing with an in-house designed panel of 192 genes involved in primary immunodeficiencies (PID) (Ampliseq, Thermo Fisher, Madrid, Spain) and confirmed

TABLE 3 | Gene-panel related to PID.

ACT1 ADA AICDA AIRE AK2 AP3B1 AP3D1 ATM BCL10 BLNK BTK C3 CARD11 CARD9 CASP10 CASP8 CD127 CD19 CD20 CD21 CD27 CD3D CD3E CD3G CD3Z CD45 CD79A CD79B CD81 CD8A CEBPE CECR1 CLEC7A COFA CORO1A CTLA4 CTPS1 CTSC CXCR4 CYBA CYBB DCLRE1C DKC1 DNMT3B DOCK2 DOCK8 ELANE EVER1 EVER2 FADD FCGR3A FOXP1 FOXP3 G6PC3 GATA2 GF11 HAX1 HOIL1 ICOS IFNGR1 IFNGR2 IGHM IGLL1 IKAROS IKBA IKBKB IKBKG IL10 IL10RA IL10RB IL12B IL12RB1 IL12RB2 IL17F IL17RA IL17RC IL1RN IL21 IL21R IL2RA IL2RG IL7 IRAK4 IRF3 IRF7 IRFB ISG15 ITGB2 ITK JAGN1 JAK3 KIND3 KRAS LAMTOR2 LCK LIG4 LPIN2 LRBA LYST MAGT1 MALT1 MAP3K14 MCM4 MEFV MHC2TA MRE11 MST1 MVK MYD88 NCF1 NCF2 NFKB1 NFKB2 NHEJ1 NHP2 NLRP3 NLRP12 NLRP3 NOD2 NOP10 NPAS ORAI1 p40phox PGMS PIK3CD PIK3R1 PLOG2 PMS2 PNP POLE1 PRF1 PRKDC PSMB8 PSTPIP1 PTPN6 RAB27A RAG1 RAG2 RFX5 RFXANK RFXAP RLTPR RMRP RNF168 RORC RTEL1 SH2D1A SMARCAL1 SP110 SPINK5 STAT1 STAT2 STAT3 STAT5B STIM1 STX11 STXB2P2 TAP1 TAP2 TAPBP TBK1 TCF3 TCN2 TERC TERT TINF2 TIRAP TLR3 TMEM173 TNFRSF13B TNFRSF13C TNFRSF1A TNFRSF5 TNFRSF6 TNFSF5 TNFSF6 TRAF3 TRIF TRN1 TTC7A TWEAK UNC119B UNC13D UNC93B1 UNG VPS45 WAS WIPF1 XIAP XRCC4 ZAP70 ZBTB24



by PCR and Sanger sequencing using an ABI PRISM 3130 genetic analyzer.

TRECs and KRECs

TRECs, KRECs, and beta-actin (ACTB) copy numbers were determined from dried blood spots (DBS, punches of 3.2 mm) using triplex real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) (TIB MOLBIOL) and run in a Light Cycler 480 II from Roche Diagnostics.

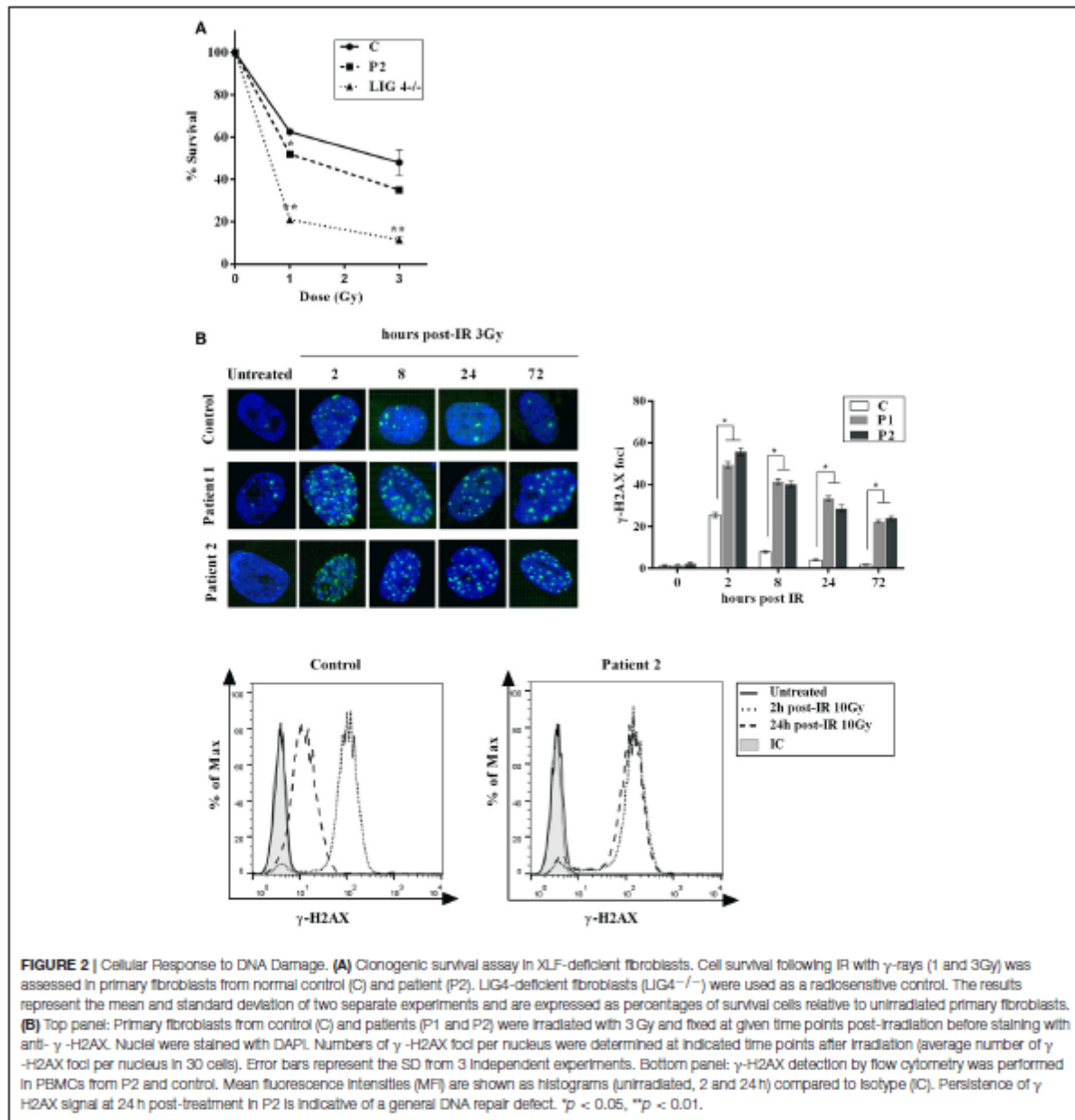
Ethics Statement

The protocols of this study were approved by the Institutional Review Board of Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) and written informed consent was obtained from

all subjects/caregivers in accordance with the Declaration of Helsinki.

BACKGROUND

DNA non-homologous end-joining (NHEJ) is the major DNA double strand break (DSB) repair pathway in mammalian cells. NHEJ also functions during immune development rejoining the programmed DSBs introduced during V(D)J recombination (7). Most of the patients deficient in NHEJ components display radiosensitivity and severe combined immunodeficiency (SCID), a phenotype which has been called radiosensitive SCID (RS-SCID). To date, mutations in five genes encoding components of the NHEJ pathway, *LIG4*



(encoding DNA ligase IV), *NHEJ1* (encoding Cernunnos), *PRKDC* (encoding DNA-PKcs), *DCLRE1C* (encoding Artemis), and *XRCC4* (encoding XRCC4) have been identified in patients. Although RS-SCID represents the extreme phenotype, radiosensitivity coupled with variable immunodeficiency ranging from Omenn's Syndrome to CID has been observed. Additional features are also observed in some patients, including microcephaly and severe growth delay. However, all of these

patients are at risk of malignancies, particularly lymphoma (6).

History

Cernunnos, was identified through both cDNA complementation of cells derived from a IR-sensitive immunodeficient patient (1) and through a yeast two-hybrid screen for XRCC4-interacting partners (8). Cernunnos is a homolog of Nej1,

one of the NHEJ factors identified in yeast (9, 10). Data from several studies suggest that although Cernunnos may not be strictly required for NHEJ, the loss of Cernunnos does affect NHEJ and interestingly DNA repair defect in these patients is quite similar to that found in LIG4 syndrome patients (11).

Review of Similar Cases

Cernunnos/XLF deficiency in human results in extreme sensitivity to IR, microcephaly, and growth retardation, but the effect on the immune system is variable (1–4, 8). Mutations in *NHEJ1* have been described previously in 27 patients with clinical features comparable to LIG4 deficiencies. Of contrast, *XRCC4* deficiency shares the radiosensitivity and neurological impairment but not overt immunodeficiency (5, 12, 13).

Most of the Cernunnos/XLF deficient patients are hypersensitive to IR and have a significant NHEJ defect (1, 14) similar to LIG4 deficiency, which belong to NHEJ ligation complex; immunodeficiency, however, is milder compared with defects in NHEJ factors involved in hairpin opening as Artemis and DNA-PKcs.

In this study, we reported two patients who present the same c.169C>T mutation in *NHEJ1* gene but different immunologic features (Table 2). P2 presented with mild T lymphopenia, hypersensitivity and NHEJ repair defect, typical for patients with Cernunnos/XLF defects (1, 5). On the other hand, P1 presented a more severe phenotype (T-B-); hypersensitivity and NHEJ repair defect, however, was similar to P2. These findings indicate that patients with same *NHEJ1* mutation and DNA repair defect may show great variability in the clinical phenotype.

Patients with homozygous mutations (p.R178X) in *NHEJ1* gene have been previously reported. Two patients died at 1.5 and 4 years (1, 2), while another of the patients remains alive at the age of 8 years (without HSCT) (5). However, none of these patients presented the severe T lymphopenia observed in our first patient.

One explanation for the different degree of lymphopenia found in Cernunnos-deficient patients (P1 and P2) might be the existence of alternative DNA repair proteins that only work to repair DSBs generated during lymphocyte development (3). It has been described that RAG complex and Cernunnos functionally overlap in the repair of DNA breaks during antigen receptor assembly ensuring stabilization of DNA ends after DNA cleavage by RAG (15). ATM and/or ATM-dependent DRR factors, as 53BP1, would contribute to the RAG-DSB stabilization and the recruitment of NHEJ pathway proteins. Severely impaired joining of RAG-generated DSBs in cells that are deficient for Cernunnos and either ATM, 53BP1 or H2AX has been observed (16). Thus, genetic factors such as mutations or polymorphisms in some of these proteins could affect the VDJ recombination process and explain the severe T lymphopenia observed in P1. As Cernunnos is not usually found in the context of a patient with a SCID phenotype we cannot rule out a digenic cause (particularly 53BP1, as other VDJ recombination genes were wild-type in our panel).

DISCUSSION

Diagnosis and Treatment

The assignment of a timely and accurate diagnosis is of paramount importance in the management of patients with defects in DNA repair, as HSCT is the only curative therapy available. Usually the repair defect in these disorders is assessed by immunofluorescence assays of irradiation-induced γ -H2AX foci using skin fibroblasts. Flow cytometry (FC) can be applied as a rapid diagnostic tool for DNA repair disorders (17, 18). Therefore, we have used flow cytometry to analyze PBMCs from P2 and the results showed a DNA repair defect similar to that obtained in skin fibroblasts (data not shown) (19).

Hence, a high throughput, sensitive and reliable assay to quantify γ -H2AX foci in PBMCs isolated from blood samples would be a valuable tool to diagnose these patients and thus allow HSCT without delay.

In addition, it would also be helpful in cancer patients to individualize and to guide the dosing of ionizing radiation (IR) and/or genotoxic agents to avoid accumulation of cells with genomic instability that could accelerate cancer development.

In the era of newborn screening an abnormal TREC assay should be followed by NGS approach as Cernunnos/XLF deficiency may present early in life as SCID, as other RS-SCID defects (20). Since genetic diagnosis takes time, functional radiosensitivity assays in peripheral blood may lead to the correct diagnosis and avoid exposure to alkylating agents during the conditioning regimen even in the absence of a genetic diagnosis (21).

The patients presented in this work are alive and well and both patients after undergoing HSCT. Of note, P2 has survived to age 7 years. It has been reported that the Cernunnos/XLF deficient patients may survive the first years of life, or even up to 18 years, without HSCT. However, due to the comorbidities that these patients face, it is highly recommended HSCT pre-emptively, rather than expect the appearance of a malignant refractory disease disregarding the age at diagnosis (21).

Given the extreme rarity of the disorder, the appearance of two unrelated homozygous cases in non-consanguineous family with the same mutation seems unlikely. However, we can offer three reasons to discard consanguinity in both kindreds: First, Geographical: Both families are more than 450 km apart each other. Both kindreds deny any consanguinity (even far) ties. Second, Molecular: HLA typing were done in both families. It is shown HLA haplotypes generated by segregation analysis in both families: Family 1, Father: A*30, B*18, DRB1*03 and A*02, B*40, DRB1*08; Mother: A*01, B*37, DRB1*13 and A*-, B*57, DRB1*07. Family 2, Father: A*02, B*39, DRB1*11 and A*29, B*51, DRB1*04; Mother: A*11, B*40, DRB1*04 and A*11, B*07, DRB1*15. In conclusion, both families did not share any HLA haplotype (Table 4). Third, No other mutations in PID genes that associate radiosensitivity (*LIG4*, *PRKDC*, *DCLRE1C*, *ATM*, *RNF168*) were found.

TABLE 4 | HLA typing in P1 and P2 families.

HLA	P1 Family			P2 Family		
	P1	Father	Mother	P2	Father	Mother
HLA-A	A*01, A*30	A*02, A*30	A*01, A*Null	A*02, A*11	A*02, A*29	A*11, A*11
HLA-B	B*18, B*37	B*18, B*40	B*37, B*57	B*07, B*39	B*39, B*51	B*07, B*40
HLA-DRB1	DRB1*03, DRB1*13	DRB1*03, DRB1*08	DRB1*07, DRB1*13	DRB1*11, DRB1*15	DRB1*04, DRB1*11	DRB1*04, DRB1*15

CONCLUDING REMARKS

We report two unrelated cases diagnosed with Cernunnos/XLF deficiency. Both patients showed a similar DNA repair defect and increased cellular sensitivity to ionizing radiation as per *in vitro* assays. However, clinical presentation and immunological profile were extremely different. The first patient showed a senescent phenotype with decreased TRECs, RTE and naive T-cells counts suggesting that the sustained self-renewal of T-cell pool was impaired, while P2 presented only a slight reduction in T-cell counts as it has been reported in Cernunnos/XLF deficient patients reported up to date with normal TRECs/KRECs and IgG levels (22).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JB-E and RR-G performed the laboratory work for this study and computational predictions. MR, RR-G, ML-N, RC-G, MC-P, MP, and JB-E performed the laboratory work for this study. CR, CM, ND-P, NS-R, CR, and LG-G were responsible for the clinical

management of the patients. LA, MR, JB-E, and LG-G designed the research and drafted the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

FUNDING

This research was supported by grants from the Spanish Health Research Fund FIS PI16/2053 to LA and LG-G, PI16/0044 to LG-G, MINECO grants SAF2014-54708-R, SAF2016-81876-REDT, and RTI2018-095673-B-I00. CAM grant B2017/BMD3673. The project has been co-financed with FEDER funds.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank both families and Pablo Morales, Isabel Castro, María José Díaz-Madroñero, Marta Martín Cabezedo, and María Teresa Fernández González for their personal and technical assistance and Jaime de Inocencio for critical review of the article.

REFERENCES

- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanèche MC, Sanal O, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* (2006) 124:287–99. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.030
- Dutrannoy V, Demuth I, Baumann U, Schindler D, Konrat K, Neitzel H, et al. Clinical variability and novel mutations in the NHEJ1 gene in patients with a Nijmegen breakage syndrome-like phenotype. *Hum Mutat.* (2010) 31:1059–68. doi: 10.1002/humu.21315
- Sheikh F, Hawwari A, Alhissi S, Al Gazlan S, Al Dhekri H, Rehan Khaliq AM, et al. Loss of NHEJ1 protein due to a novel splice site mutation in a family presenting with combined immunodeficiency, microcephaly, and growth retardation and literature review. *J Clin Immunol.* (2017) 37:575–81. doi: 10.1007/s10875-017-0423-5
- Cipe FE, Aydogmus C, Babayigit Hocaoglu A, Kilic M, Kaya GD, Yilmaz Gulec E. Cernunnos/XLF deficiency: a syndromic primary immunodeficiency. *Case Rep Pediatr.* (2014) 2014:614238. doi: 10.1155/2014/614238
- Ijspeert H, Rotzmus J, Schwarz K, Warren RL, van Zessen D, Holt RA, et al. XLF deficiency results in reduced N-nucleotide addition during V(D)J recombination. *Blood* (2016) 128:650–9. doi: 10.1182/blood-2016-02-701029
- Du L, Peng R, Björkman A, Filipe de Miranda N, Rosner C, Kotnis A, et al. Cernunnos influences human immunoglobulin class switch recombination and may be associated with B cell lymphomagenesis. *J Exp Med.* (2012) 209:291–305. doi: 10.1084/jem.20110325
- Riballo E, Woodbine L, Stiff T, Walker SA, Goodarzi AA, Jeggo PA. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res.* (2009) 37:482–92. doi: 10.1093/nar/gkn957
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* (2006) 124:301–13. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.031
- Kegel A, Sjöstrand JO, Aström SU. Nej1p, a cell type-specific regulator of nonhomologous end joining in yeast. *Curr Biol.* (2001) 11:1611–7. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00488-2
- Callebaut I, Malivert L, Fischer A, Morion JP, Revy P, de Villartay JP. Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. *J Biol Chem.* (2006) 281:13857–60. doi: 10.1074/jbc.C500473200
- Girard PM, Kysela B, Härer CJ, Doherty AJ, Jeggo PA. Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms. *Hum Mol Genet.* (2004) 13:2369–76. doi: 10.1093/hmg/ddh274
- Menon V, Povirk LF. XLF/Cernunnos: an important but puzzling participant in the nonhomologous end joining DNA repair pathway. *DNA Repair.* (2017) 58:29–37. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.08.003
- Guo C, Nakazawa Y, Woodbine L, Björkman A, Shimada M, Fawcett H, et al. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 136:1007–17. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.007
- Vera G, Rivera-Munoz P, Abramowski V, Malivert L, Lim A, Bole-Feysot C, et al. Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans. *Mol Cell Biol.* (2013) 33:701–11. doi: 10.1128/MCB.01057-12
- Lescale C, Abramowski V, Bedora-Faure M, Murigneux V, Vera G, Roth DB, et al. RAG2 and XLF/Cernunnos interplay reveals a novel role for the RAG complex in DNA repair. *Nat Commun.* (2016) 7:10529. doi: 10.1038/ncomms10529

16. Zha S, Guo C, Boboila C, Oksenyk V, Cheng HL, Zhang Y, et al. ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature* (2011) 469:250–4. doi: 10.1038/nature09604
17. Johansson P, Fath A, Ek T, Hammarsten O. Validation of a flow cytometry-based detection of γ -H2AX, to measure DNA damage for clinical applications. *Cytometry B Clin Cytom.* (2017) 92:534–40. doi: 10.1002/cyto.b.21374
18. Viktorsson A, Mathew ST, Hammarsten O, Johansson P. A control for the day-to-day normalization of the flow cytometry γ -H2AX assay for clinical routine. *Cytometry B Clin Cytom.* (2018) 94:946–9. doi: 10.1002/cyto.b.21627
19. Kwan A, Hu D, Song M, Gomes H, Brown DR, Bourque T, et al. Successful newborn screening for SCID in the Navajo Nation. *Clin Immunol.* (2015) 158:29–34. doi: 10.1016/j.clim.2015.02.015
20. Yazdani R, Abolhassani H, Tafaraji J, Azizi G, Hamidieh AA, Chou J, et al. Cernunnos deficiency associated with BCG adenitis and autoimmunity: first case from the national Iranian registry and review of the literature. *Clin Immunol.* (2017) 183:201–6. doi: 10.1016/j.clim.2017.07.007
21. Slack J, Albert MH, Balashov D, Belohradsky BH, Bertaina A, Blessing J, et al. Outcome of hematopoietic cell transplantation for DNA double-strand break repair disorders. *J Allergy Clin Immunol.* (2018) 141:322–8.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.036
22. Carrillo J, Calvete O, Pintado-Berniches L, Manguan-García C, Sevilla Navarro J, Arias-Salgado EG, et al. Mutations in XLF/NHEJ1/Cernunnos gene results in downregulation of telomerase genes expression and telomere shortening. *Hum Mol Genet.* (2017) 26:1900–14. doi: 10.1093/hmg/ddx098

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Recio, Domínguez-Pinilla, Ferrig, Rodríguez Vigil-Iturrate, Salóm-Rodríguez, Martínez Faci, Castro-Panete, Blas-Espada, López-Nevaldo, Ruiz-García, Chaparro-García, Allende and González-Granado. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Clinical Communications

Disseminated abscesses due to *Mycoplasma faucium* in a patient with activated PI3K δ syndrome type 2



Nerea Dominguez-Pinilla, MD^{a,b,*},

Luis M. Allende, MD, PhD^{c,*},

Jérémie Rosain, PharmD, MSc^{d,e,f},

Maria del Carmen Gallego, MD^g,

Fernando Chaves, MD, PhD^h, Caroline Deswarta, MSc^{h,f},

Esther Viedma, MD, PhD^h,

Jaime de Inocencio Arocena, MD, PhDⁱ,

Jesús Ruiz-Contreras, MD, PhD^j,

Jacinta Bustamante, MD, PhD^{d,k,l,x}, and

Luis Ignacio Gonzalez-Granado, MD^j

Clinical Implications

- PIK3R1-dominant mutations can cause activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome type 2, which may cause early onset and long-term disseminated abscesses due to *Mycoplasma faucium* even in the absence of hyper-IgM-like phenotype.

TO THE EDITOR:

A 16-year-old girl with a 2-year history of recurrent peritoneal effusion, which required periodic paracentesis, was admitted to our institution. She was born of Caucasian unrelated parents from Spain. She lived in a nonrural area with no contact with farm animals. At the age of 6 years, she had an episode of knee arthritis—which never recurred—and first of multiple episodes of skin abscesses. Her initial immunological study revealed low serum immunoglobulin levels (IgG <7.3 mg/dL, IgA <5.8 mg/dL, IgM <4.3 mg/dL; normal range, 504–1464 mg/dL, 27–195 mg/dL, and 24–210 mg/dL, respectively) with low CD19+B-cell count (1 cell/ μ L). Quantitative dihydrorhodamine flow cytometric assay on neutrophils was normal. She was diagnosed with hypogammaglobulinemia, and mutations in the genes involved in autosomal-recessive forms were tested by Sanger sequencing (*IGHM*, *CD79A*, *CD79B*, *IGLL1*); all sequences, however, were wild type. Shortly thereafter she presented with recurrent cervical and right axillary fistulizing abscesses that required drainage and multiple antibiotic courses including amoxicillin-clavulanate, azithromycin, cephalosporins, and carbapenems with or without corticosteroids (Figure 1, A-C). Splenic abscesses were drained for the first time at the age of 14 years. Bacterial, fungal, and mycobacterium cultures were repeatedly negative. With a diagnosis of hypogammaglobulinemia she was started on standard subcutaneous immunoglobulin replacement therapy and subcutaneous injections of IFN- γ , because her condition was very poor and she and her parents refused hematopoietic stem cell transplantation.

Physical examination on admission confirmed stunted growth (weight and height below the third percentile) and revealed cutaneous abscesses on her face and arms, right fistulized axillary

lymphadenitis, an enlarged liver (5–6 cm), and marked splenomegaly (see Figure E1, A.1–8, in this article's Online Repository at www.jaci-inpractice.org). A 10 \times 15 cm elastic, painless mass was noted on her back. A computerized tomographic scan and magnetic resonance imaging disclosed a large retroperitoneal abscess that displaced the left kidney. Percutaneous drainage and sclerosis with alcohol and povidone-iodine instillation was performed by interventional radiology (Figure E1, B.1–8).

Pus from retroperitoneal collection and from skin abscesses was sent for direct microscopic examination, Gram and auramine stains, and bacterial, fungal, and mycobacterium culture. No isolation was obtained. 16S rRNA PCR-sequencing with primers that amplified V1–V3 regions (\approx 500 bp) was performed in both samples. The alignment analysis with the GenBank database showed more than 99% similarity with *Mycoplasma faucium* (NR024983) (see Figure E2 in this article's Online Repository at www.jaci-inpractice.org). Samples were sent for culture *M faucium* in specific medium (supplemented SP-4 medium and supplemented PPLO Agar base) to isolate it and to perform antibiogram, but no growth was obtained. Three more samples from cutaneous abscesses were obtained 6, 18, and 19 months later (the last one without antimicrobial therapy). They yielded identical result by 16S rRNA PCR-sequencing.

Although the bacterium could not be visualized through microscopy nor cultured in the specific media, detection by 16S rRNA gene sequencing provides strong evidence regarding the role of this microorganism as the causal agent of the infection, as the isolation of this microorganism from abscess samples has been previously reported.¹

Electropherograms obtained from 16S rRNA gene sequencing were clean, indicating the absence of additional bacteria.

Combined antibiotic therapy (doxycycline plus levofloxacin) was started. Three days later cutaneous abscesses stopped draining and in 2 months all her skin lesions and the retroperitoneal abscess were resolved. Splenic abscess was no longer active after drainage, but skin abscesses relapsed after levofloxacin was discontinued because of enthesitis development. Chronic infection remained stable under antibiotic combination therapy (2 of doxycycline, moxifloxacin, and josamycin) for the following 4 years. Hematopoietic stem cell transplantation was declined by the patient and her parents. Five years after the sclerotherapy the patient was admitted to another institution with bacterial pneumonia, developed respiratory arrest, and died. We cannot rule out the development of antimicrobial resistance or infection by a noncovered pathogen.

Immunological screening of the patient showed T, B, and natural killer cell lymphopenia (Table 1) with reduced recent thymic emigrants and increased effector memory CD4 T cells. When an extended naive/memory T CD8-cell phenotype was performed, an increased CD8 T-cell number affecting mainly effector/memory T CD8 cells was shown. The senescent T-cell phenotype, the impaired T-cell lymphoproliferation after mitogen stimulation (PHA and phorbol myristate acetate + ionomycin), and hypogammaglobulinemia suggested a combined immunodeficiency (Table 1). Whole-exome sequencing revealed a heterozygous mutation in the *PIK3R1* gene (see Figure E3, A

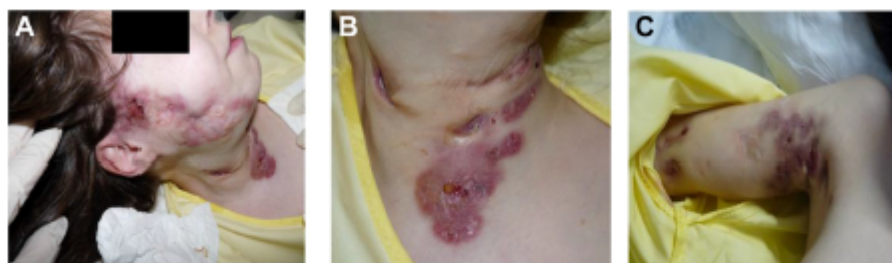


FIGURE 1. Fistulizing abscesses involving neck (A and B) and right axilla (C).

TABLE I. Immunologic features of the patient

Parameter/age	19 y	
	Absolute number/%	Normal range Absolute number/%
Total lymphocytes	704	1200-3000
CD3+	614/87%	850-2250/62%-81%
CD3+ $\alpha\beta$ +	549/78%	1000-1350/60%-80%
CD3+ $\gamma\delta$ +	49/7%	0-150/0%-7%
DN T cells	1.8%	<2.5%
CD4+	284/40%	500-1450/32%-59%
CD4+CD45RA+CD31+ (recent thymic emigrant)	20%	26%-58%
CD4+CD45RA+CCR7+ (naive)	31%	20%-60%
CD4+CD45RA-CCR7+ (central memory)	30%	25%-50%
CD4+CD45RA-CCR7- (effector memory)	38%	5%-30%
CD4+CD45RA+CCR7- (effector memory expressing CD45RA)	1%	0%-5%
CD8+ μ L	319/45%	160-950/15%-36%
CD8+CD45RA+CCR7+ (naive)	6%	15%-45%
CD8+CD45RA-CCR7+ (central memory)	4%	5%-25%
CD8+CD45RA+CCR7+/- (effector memory)	75%	25%-55%
CD8+CD45RA+CCR7+/- (TEMRA)	15%	5%-20%
CD19+	42/6%	100-500/8%-20%
CD56+CD3-	42/6%	60-450/4%-22%
CD3+HLA-DR+	106/15%	0-2500/0%-10%
T-cell proliferation (cpm)		Response index
PHA	40	>57
PMA + Ionomycin	27	>65
sCD25 (pg/mL)	3684	0-2000

PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate.

and B, in this article's Online Repository at www.jaci-inpractice.org). Briefly, the mutation is a G to T nucleotide substitution at the +1 position of the donor splice site (c.1425+1G>T), which leads to the in-frame deletion of exon 11 of p85 α . This mutation has been previously reported and affects 13% of patients with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome type 2 (APDS2).² By Sanger sequencing, the mutation was confirmed in the patient. In addition, familial segregation was made,

showing a wild-type sequence in both parents (Figure E3, C). There were no other relevant variants in the 312 known genes of inborn errors of immunity (according to the IUIS 2017 classification). Moreover, this mutation fits with the clinical (lymphoproliferative disorder) and immunological (specially B and T cells) phenotype of the patient.

To date 49 patients with APDS2 have been reported, 5 of them in Spain.^{2,7} A wide clinical spectrum is noted with recurrent respiratory tract infections in all of them. Despite frequent viral opportunistic infections (EBV, cytomegalovirus, varicella-zoster virus, widespread *Molluscum contagiosum*), there are no reports concerning bacterial opportunistic infections.² Typical opportunistic infections are linked to certain primary immunodeficiencies (PIDs), such as *Chromobacterium violaceum* and *Helicobacter/Flexispira* spp. infections in chronic granulomatous disease and X-linked agammaglobulinemia, respectively. An ongoing registry promoted by the European Society for Immunodeficiencies is collecting long-term follow-up data of patients with APDS. Hematopoietic stem cell transplantation has been performed in some patients with APDS but promising results are being obtained in patients treated with the mTor inhibitor rapamycin or the PI3K δ inhibitor leniolisib.⁸

Although *M faucium* was first described in 1969 as a rare inhabitant of the human oropharynx, more recent studies based on molecular techniques have reported that it is rather common in the human oropharynx.⁹ However, in 2009, this bacterium was also identified in the brain abscesses of 3 non-immunocompromised patients.¹

Our description is the first since then to report this bacteria in human PID. We report it in a patient with APDS2, which could give further insight into the pathogenesis of *M faucium*. APDS2 can impact innate immunity, B-cell-mediated immunity, or T-cell-mediated immunity although further reports are needed to decipher which branch of the immune system is relevant to the control of *M faucium* infection.^{7,10} Other invasive infections due to *Mycoplasma* species have been reported in patients with humoral deficiency such as agammaglobulinemia or common variable immunodeficiency and thus we may hypothesize that humoral immunity may be determinant.¹⁰

In summary, this report emphasizes that concerning PID disseminated *M faucium* infections should raise suspicion of combined immunodeficiency, particularly APDS2 even in the absence of a hyper-IgM phenotype. A multidisciplinary approach is essential in diagnosing and treating these patients, as it has been shown in this case, where 16S rRNA gene sequencing was key to reach microbiological diagnosis in an infection caused by difficult growth or noncultivable bacteria. Combined treatment

of antibiotics with interventional radiology may be helpful in the eradication of very large abscesses in patients with PID.

Acknowledgment

We thank Alessandro Plebani and Vassili Lougaris for the help with the molecular screening for agammaglobulinemia autosomal-recessive genes and Maite for her care of the patient. We also are grateful to the family.

^aPediatric Hematology & Oncology Unit, University Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

^bResearch Institute Hospital 12 Octubre (i+12), Madrid, Spain

^cImmunology Department, University Hospital 12 de Octubre, Research Institute Hospital 12 Octubre (i+12), Madrid, Spain

^dStudy Center for Primary Immunodeficiencies, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Necker Children Hospital, Paris, France

^eParis Descartes University, Imagine Institute, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^fLaboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U-1163, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France

^gPediatric Radiology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^hMicrobiology Department, University Hospital 12 de Octubre, Research Institute Hospital 12 Octubre (i+12), Madrid, Spain

ⁱPediatric Rheumatology Unit, University Hospital 12 de Octubre and Department of Pediatrics, Complutense University of Madrid Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^jImmunodeficiencies Unit, Department of Pediatrics, University Hospital 12 de Octubre, Research Institute Hospital 12 Octubre (i+12), Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

^kSt Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY

*These authors contributed equally to this work and are co-first authors.

This work was supported in part by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (grant no. FIS-PI16/02053 to L.I.G.-G. and L.M.A. and grant no. PI2016/0044 to L.I.G.-G.). The project has been cofinanced with Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) funds.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication October 22, 2017; revised February 11, 2018; accepted for publication February 13, 2018.

Available online March 1, 2018.

Corresponding author: Luis Ignacio Gonzalez-Granado, MD, Primary Immunodeficiencies Unit, Department of Pediatrics, University Hospital 12 de Octubre, Research Institute Hospital 12 Octubre, Avenida de Córdoba S/N, 28041 Madrid, Spain. E-mail: luisignacio.gonzalez@salud.madrid.org.

2213-2198

© 2018 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.02.014>

REFERENCES

- Al Masalma M, Armougom F, Scheld WM, Dufour H, Roche PH, Dinncourt M, et al. The expansion of the microbiological spectrum of brain abscesses with use of multiple 16S ribosomal DNA sequencing. *Clin Infect Dis* 2009;48:1169-78.
- Elkaim E, Neven B, Brunau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, et al. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:210-218.e9.
- Bravo García-Morato M, García-Miñán S, Molina Garcíaño J, Santos Simarro F, Del Pino Molina L, López-Granados E, et al. Mutations in PIK3R1 can lead to APOD2, SHORT syndrome or a combination of the two. *Clin Immunol* 2017;179:77-80.
- Ölbrich P, Lotz M, Cura Daball P, Lucena JM, Rensing-Ehl A, Sanchez B, et al. Activated PI3K δ syndrome type 2: two patients, a novel mutation, and review of the literature. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27:640-4.
- Martínez-Saavedra MT, García-Gómez S, Domínguez Acosta A, Mendoza Quintana JJ, Plez JP, García-Reino EJ. Gain-of-function mutation in PIK3R1 in a patient with a narrow clinical phenotype of respiratory infections. *Clin Immunol* 2016;173:117-20.
- Deau MC, Heurtier L, Frange P, Suarez F, Bols-Feysot C, Nitschke P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J Clin Invest* 2014;124:3923-8.
- Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, Bosompem A, Wang YD, Coustan-Smith E, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85 α subunit of PI3K. *J Exp Med* 2012;209:463-70.
- Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condiffe AM, Okkenhaug K. PI3K δ and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 2016;16:702-14.
- Edouard S, Courtois GD, Gautrot P, Jouve JL, Minodier P, Noël G, et al. High prevalence of mycoplasma faecium DNA in the human oropharynx. *J Clin Microbiol* 2016;54:194-6.
- Pruman DA, Chin H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell* 2017;170:605-35.

4. DISCUSIÓN

Los resultados y la discusión de los artículos incluidos en el presente trabajo, no solo aportan nuevos conocimientos específicos sobre las inmunodeficiencias primarias a las que se refiere, sino que ilustran algunos aspectos que pueden contribuir a mejorar el enfoque general de estas enfermedades. En primer lugar, los resultados de nuestro estudio, a partir de 7 sujetos de 3 familias no relacionadas muestran que para un diagnóstico preciso de los EII son necesarios equipos multidisciplinares bien coordinados, que suponen una herramienta esencial que no depende aisladamente de la pericia de un equipo por separado. Es evidente que el proceso asistencial que culmina con un tratamiento con intención curativa pasa por la identificación del defecto molecular concreto. Por tanto, es un requisito la existencia de estos grupos coordinados para que un centro se convierta en centro de referencia para los EII. Los EII son enfermedades que presentan manifestaciones heterogéneas desde el punto de vista clínico-analítico e inmunológico, además de heterogeneidad genética. La NGS a día de hoy es la herramienta estándar para el diagnóstico de pacientes con síndromes del tipo EII sin fenotipo claramente identificable con la contribución indispensable de pruebas funcionales que soportan el diagnóstico definitivo. Dicha colaboración excede el ámbito hospitalario e involucra a la universidad y la presencia de colaboradores externos, en ocasiones internacionales, como se ha puesto de manifiesto en el presente trabajo.

Los estudios de segregación familiar permiten identificar el carácter de portador o la presencia de un defecto *de novo*. Esto hace posible un asesoramiento genético adecuado tanto para los padres como para los pacientes en relación a futura descendencia, sin olvidar que en hasta el 6% de las familias se manifiesta el fenómeno de mosaicismo gonosómico con presencia del defecto molecular en gónadas pero no en línea germinal (75). Ante la presencia de variantes de

significado incierto, el estudio de segregación familiar es un primer paso clave para la dilucidación del potencial carácter patogénico de la variante en cuestión, pudiendo descartarse razonablemente si uno de los progenitores es afecto, al menos en enfermedades con penetrancia completa, que no es el caso de la IDCV (28). Por último, en caso de padres portadores, permite el estudio prenatal de la enfermedad en cuestión (232).

De los pacientes estudiados, dos de ellos fueron identificados a raíz de una infección oportunista. En el primero de ellos, con deficiencia de *NFKB1*, una infección diseminada por *Mycobacterium genavense* en contexto de una histiocitosis de células de Langerhans refractaria tratada con esteroides, vinblastina y clofarabina. En el segundo caso, una infección por *Mycoplasma faucium* de más de una década de evolución de abscesos cutáneos diseminados, recurrentes, con innumerables cultivos microbiológicos previos sin aislamiento. En ausencia de diagnóstico molecular, la identificación de un microorganismo oportunista debe hacernos considerar la posibilidad de un EII.

El primero de los trabajos pone de manifiesto la dificultad en diferenciar entre el carácter primario o secundario de la inmunodeficiencia de *NFKB1*. En este paciente la asociación de esteroides con tratamiento quimioterápico intensivo hizo considerar el problema de base inicialmente como secundario a estos fármacos. Además, está descrita la inducción de apoptosis en linfocitos T, así como por fármacos antituberculosos (concretamente isoniacida) sobre linfocitos CD4 activados (233) y es el $\text{IFN-}\gamma$ el que media la apoptosis de linfocitos CD4 durante la infección micobacteriana (234). La dificultad adicional viene dada por el tipo de variante, sinónima, en la que se produce un cambio a nivel de DNA genómico pero sin cambio en el aminoácido resultante. La mayor parte de las estrategias de filtrado excluyen este tipo de variantes por considerarlas no patogénicas. Sin embargo, estas variantes pueden presentar una baja frecuencia

poblacional y pueden conducir a la apertura de sitios críticos de splicing dando lugar a cambios deletéreos a nivel de proteína (81,235,236). La variante en el gen *NFκB1* c.705 G>A no ha sido identificada en otros pacientes con deficiencia de *NFκB1*. Sin embargo, los defectos funcionales en la fosforilación comparado con otros pacientes con pérdida del exón 8 es similar.(237)

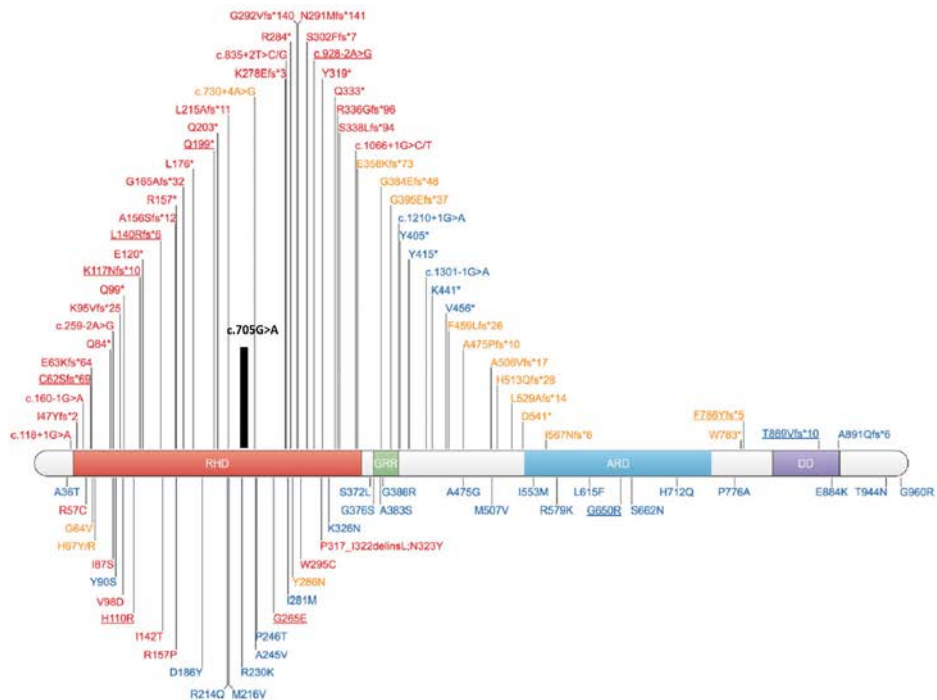


Figura 8. Representación de la variante patológica en la familia con haploinsuficiencia de *NFκB1* (c.705G>A). Modificado de Abolhassani et al. (224)

Se pueden establecer diferentes fenotipos clínicos según el defecto en fosforilación afecte fundamentalmente a p50 o p105 (238). A nivel de mRNA en este paciente se pudo identificar una disminución del 70% respecto al control en el linfocito T. Los datos podrían sugerir un efecto adicional del uso de clofarabina que desencadenara el defecto combinado y la susceptibilidad a la micobacteria. Ninguno de los otros familiares afectados o de los pacientes estudiados presentaron infección por micobacterias, lo que apoya el carácter oportunista de la infección.

En relación a la deficiencia de Cernunnos, se puede establecer una comparativa entre el fenotipo del ratón KO y el humano, con el fenotipo de la variante identificada. El diagnóstico clínico de esta entidad es difícil debido a la expresividad variable en humanos. El ratón KO no presenta alteraciones inmunitarias graves, como ocasionalmente puede ocurrir en pacientes con deficiencia de NHEJ1 (239,240). El paciente portador del cambio (sustitución citosina por timina) en homocigosis en el exon 2 del gen *NHEJ1* (c.169C>; p.R57X) con resultado de una proteína truncada. El modelo murino muestra linfopenia T y B moderada, con alteración del repertorio TCRVa. Esto va en línea con los resultados experimentales que sugieren que el papel de NHEJ1 no es esencial para el funcionamiento del sistema inmune (241).

Para finalizar la paciente con APDS2 presentó abscesos previamente considerados estériles de 10 años de duración y se identificó *M. faucium* como agente causante del cuadro crónico. El modelo murino KO de PIK3R1, obtenido a partir de la delección del exón 1 de la isoforma p85 α , presenta un número disminuido de linfocitos B. Esto permite restringir el defecto a la subunidad reguladora p85 α conservando intacta la señalización vía p50 α y p55 α . (242). El ratón KO muestra recuento normal o elevado de células pro-B (B220+/CD43+) en médula ósea con un fenotipo similar al que presenta el ratón deficiente en Btk.

4.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

4.1.1. Fallo de medro.

Las 3 inmunodeficiencias descritas están asociadas a fallo de medro, si bien NHEJ1 y PIK3R1 están asociadas a retraso en el crecimiento intrauterino y en el caso de NFkB1 el retraso es postnatal. Particularmente relevante es la asociación de variantes patogénicas somáticas en PIK3R1 como sucede en los síndromes de hipercrecimiento/anomalías vasculares en *PIK3CA*

(243). En el espectro del fallo de medro por mutaciones en *PIK3RI* está el síndrome SHORT, caracterizado por forma de cara triangular con frente prominente y ojos hundidos, fosas nasales delgadas, boca hacia abajo y mentón pequeño (244). El mecanismo es diferente ya que en APDS2/síndrome SHORT la alta cantidad de P85 α monomérica compite con el dímero p85-p110 por la unión a la tirosina fosforilada IRS-1. Esto impide la activación de la insulina y del factor de crecimiento tipo insulina-1 (Insulin growth factor, IGF-1). En consecuencia, no se activa AKT y se impide la correcta transducción de la señal (245,246). En los pacientes que presentan la inmunodeficiencia sucede exactamente lo opuesto, siendo la sobreactivación de la vía mTOR la que desencadena las manifestaciones clínicas (247).

En el caso de la deficiencia de *NFKB1* el fallo de medro es multifactorial y más difícilmente atribuible a la inmunodeficiencia. Las razones son 2: el tratamiento quimioterápico y la infección por *M. genavense* con afectación gastrointestinal pueden explicar el cuadro. Sin embargo, el fallo de medro se inicia previamente al desarrollo de estas complicaciones. Por otro lado, no es típico que este EII asocie fallo de medro, salvo un caso aislado (*NFKB1* c.2878G>A; p.G690R) con aparición del defecto a partir de los 3 meses de vida (248,249). Sin embargo, un estudio reciente que ha evaluado 365 variantes en *NFKB1* considera el cambio c.2878G>A es neutral (Figura 8) (224). En el caso de la deficiencia de *NHEJ1* el fallo de medro se manifiesta en forma de retraso del crecimiento intrauterino.

4.1.2. Microcefalia.

No hay descripciones de la asociación microcefalia- deficiencia de *NFKB1*, si bien dentro de la vía la microcefalia es uno de los componentes del síndrome de incontinencia pigmenti en niñas con mutaciones en NEMO (gen *IKBKG*) la presencia de microcefalia (250), dado que dicho gen

está involucrado en la apoptosis neuronal y la neurogénesis (28,251). Los pacientes con deficiencia de *NHEJ1* pueden presentar microcefalia. La adquisición de los hitos del desarrollo psicomotor puede ser normal (240).

Las familias con deficiencia en *NHEJ1* y en *NFKB1* nos permiten abordar el problema de la correlación genotipo-fenotipo, no solo interindividual, sino también intrafamiliar (252,253). En el caso de la deficiencia de Cernunnos descrita, se observa que se trata de una mutación sin sentido que produce un fenotipo completamente distinto en los 2 pacientes identificados (254). Se considera que en este caso cambios epigenéticos podrían explicar la ausencia de correlación genotipo-fenotipo (255).

Por otro lado, la familia con la variante en *NFKB1* presenta una variabilidad intrafamiliar extrema, explicable por los cambios inducidos, no del todo transitorios, probablemente por efecto del tratamiento con quimioterapia (158,256–258). En cualquier caso, no se puede descartar la existencia de otro defecto monogénico o, alternativamente, otra combinación de variantes.

4.1.3. Citopenias autoinmunes

Tanto los pacientes con IDCV como IDC(G) pueden presentar citopenias autoinmunes (259). En una serie reciente de 176 pacientes con trombopenia inmune primaria refractaria se identificaron variantes patogénicas en 16 pacientes (9,1%). De ellos 8 (4,5%) altamente sugestivos de IDCV (260). El caso índice de la familia con la deficiencia en *NFKB1* debutó con una neutropenia autoinmune. No es posible determinar la relación de causalidad con el EII en este sujeto, dada la alta prevalencia de la neutropenia autoinmune en el periodo del lactante (261). Las manifestaciones autoinmunes están presentes en *NFKB1*, *APDS1* y *APDS2* en el 42,5% 28-42%

y 20% de casos, respectivamente (29). La anemia hemolítica autoinmune y la trombopenia representan el 76% de ellas (262).

En los pacientes con deficiencia en NHEJ1 no es infrecuente la presencia de citopenias autoinmunes incluso en ausencia de otros hallazgos clínicos o de laboratorio (240). En una cohorte italiana que recoge las características de 30 pacientes se hallan fenómenos de autoinmunidad y desregulación inmune en 6 (17%), de ellos 2 presentaron trombopenia inmune primaria en la infancia, un paciente desarrolló anemia hemolítica autoinmune tras recibir quimioterapia por un linfoma y otro un síndrome de Evans asociado a leucemia linfocítica crónica. En una cohorte posterior se evaluó la respuesta terapéutica a la IS: las citopenias autoinmunes fueron la cuarta manifestación principal (30% de los pacientes), con afectación multilinear y pobre respuesta al tratamiento en primera línea (sirolimus) (34). En ella se identifica un paciente con variante patogénica en *PIK3CD*, entre otros defectos monogénicos (*KMT2D*, *FAS*, *UNC13D*, *AIRE*, *CARD11*, *STAT3*, *IKZF1*)

4.1.4. Infección oportunista

La secuenciación del RNA ribosomal (rRNA) aplicada al diagnóstico microbiológico permitió la amplificación de rRNA16S en múltiples localizaciones de las secuencias concordantes con *Mycoplasma faucium* como la hipótesis de la diseminación hemolinfática y por contigüidad en una de las pacientes estudiadas, en la que posteriormente se identificó una variante patogénica en *PIK3R1* (véase Tabla 6)

Tabla 6. Aislamientos mediante PCR RNA ribosomal, el último de ellos tras tratamiento antimicrobiano prolongado.

TIPO DE MUESTRA	FECHA	PCR RNAr 16S
Absceso retroperitoneal	18/03/2011	<i>Mycoplasma faucium</i>
Absceso subcutáneo (cuello)	24/03/2011	<i>Mycoplasma faucium</i>
Absceso subcutáneo	29/09/2011	<i>Mycoplasma faucium</i>
Absceso subcutáneo	07/09/2012	<i>Mycoplasma faucium</i>
Absceso subcutáneo (Tórax)	29/10/2012	<i>Mycoplasma faucium</i>
Absceso subcutáneo	16/12/2013	No se identifica <i>M. faucium</i>

Mycoplasma faucium es una bacteria descrita en 1969 que actúa como saprófito en orofaringe y está excepcionalmente asociado a patología en el humano: en 2009, se aisló en abscesos cerebrales de 3 pacientes no inmunodeprimidos (263). En 2022 se identificó mediante rRNA 16S en un paciente con psoriasis (264). En el paciente estudiado en este trabajo se trata de un caso aislado de microorganismo oportunista en paciente con síndrome APDS2. Aunque en este síndrome son frecuentes las infecciones oportunistas fundamentalmente por herpesvirus, la paciente sólo desarrolló una infección aislada y crónica por *Mycoplasma faucium*, a diferencia de la identificación más habitual: el absceso cerebral polimicrobiano (263,265). A pesar de haber recibido múltiples ciclos de tratamiento antimicrobiano la mala tolerancia al tratamiento con levofloxacino y el potencial desarrollo de resistencias con el tiempo pudo impedir la resolución de la infección. Cabe destacar que sólo con el empleo de la PCR de rRNA 16S se consiguió el diagnóstico definitivo de la infección, tras resultados de cultivos persistentemente negativos en múltiples muestras biológicas sobre medios enriquecidos. Por tanto, es esencial, como también se ha demostrado en el caso de la infección oportunista por *Mycobacterium genavense*, la

colaboración multidisciplinaria básico-clínica. Esta micobacteria atípica afecta, sobre todo, a pacientes VIH, aunque también se ha descrito en 44 sujetos con otra situación predisponente: trasplante de órgano sólido (40%), sarcoidosis (14%), TPH (7%), además de neoplasia hematológica -linfoma- o desarrollo de anticuerpos plasmáticos anti IL12p40) (266,267). Ha sido descrito excepcionalmente en pacientes con EII (deficiencia de ADA(268)) y afecta de modo característico -a diferencia de las Micobacterias del grupo avium- al tracto gastrointestinal con una alta mortalidad, hasta el 35% (266,269). Las infecciones por *Mycobacterium spp.* afectan al 6,5% de los pacientes con deficiencia de *NFKB1* (29).

Es conocido el papel de la inmunidad humoral para la defensa frente a microorganismos del grupo *Ureaplasma/Mycoplasma*, habiéndose descrito casos de infección diseminada en pacientes con agammaglobulinemia desde 1970 (270,271). Con todo, se considera que la inmunidad celular participa en la respuesta, basado en la cronicidad de la infección y en el modelo de hámster y murino: los microorganismos son aclarados más rápidamente del pulmón de los animales normales que de aquellos deplecionados de linfocitos T (272).

La paciente con la infección diseminada por *M. faucium* sufrió un retraso diagnóstico de una década. Pese al alto número de pacientes diagnosticados de esta enfermedad en los últimos años, este hallazgo no ha sido identificado en ningún otro paciente. Si bien en 2 de los 4 pacientes mostrados hubo una infección oportunista bacteriana/micobacteriana, en ninguno de ellos la infección oportunista fue un virus, lo que hubiera sido esperable dado el defecto T grave subyacente en todos ellos y particularmente por la susceptibilidad a herpesvirus de los pacientes con síndrome APDS2. En ambas situaciones se invierte la concepción clásica de la sospecha del EII a partir de infecciones de repetición. En estos casos se trató de una infección única, persistente, por una bacteria difícil de aislar y/o cultivar, con la dificultad añadida del empleo de un

tratamiento empírico sin posibilidad de basarlo en un estudio de resistencias, derivado del método de identificación. Finalmente, el abordaje multidisciplinar por un equipo que cuente con expertos clínicos y de laboratorio en el campo de la microbiología, inmunología y genética puede evitar el retraso diagnóstico (273,274). El reto de la medicina del siglo XXI es integrar la alta especialización de clínicos, inmunólogos y genetistas en el ámbito del diagnóstico de las enfermedades, en lo que se ha dado en llamar la Santísima Trinidad (“Wholly Trinity”) en el diagnóstico y manejo de los EII (274).

En la Tabla 7 se presentan los microorganismos oportunistas identificados en los EII.

Tabla 7. Asociación germen oportunista y EII.

GERMEN	DEFICIENCIA
<i>Mycoplasma/Ureaplasma spp</i>	STAT3 LOF (275)
<i>Mycoplasma/Ureaplasma spp</i> (276) <i>Helicobacter/Flexispira spp</i> (277) <i>Spiroplasma apis</i> (278) Meningoencefalitis crónica por enterovirus(279) (280)	Agammaglobulinemia
<i>Granulibacter bethesdensis</i> (281) <i>Chromobacterium violaceum</i> (282)	Enfermedad granulomatosa crónica
Micobacterias no tuberculosas (98)	MSMD

4.2. LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO:

4.2.1. Función tímica: TRECs

El método estándar de determinación del output tímico en la actualidad es la cuantificación de TRECs. Las determinaciones en los pacientes, están disminuidas en todas, excepto en uno de ellos, se pueden ver en la Tabla 8.

Tabla 8. Determinación TRECs y RTE en los pacientes descritos.

	NFKB1	NHEJ1		APDS2
Edad	3 años	P1 (1a 10m)	P2 (8a 4m)	16 años
TREC	5.3	< 10	50	N.D.
RTE	10%	2%	N.D.	20%

N.D. No determinado. Punto de corte para TRECs > 10 copias / punch. Punto de corte para RTE adultos > 26%, niños > 44%

Como medida del output tímico se pueden emplear tanto la determinación de TRECs como la de linfocitos naïve con fenotipo CD4+CD45RA+CD31+, ya que son un buen marcador de la competencia inmunológica en general y de la reconstitución inmunológica postTPH en particular (283,284).

Se determinaron TRECs en todos los sujetos excepto el paciente con síndrome APDS2. Una medida indirecta del mismo se basa en la alta correlación existente entre la determinación de

TRECs y el output tímico medido por los linfocitos CD3+CD4+CD45RA+CD31+ (ver Tabla 9) (285). En la paciente APDS2 el valor de linfocitos CD3+CD4+CD45RA+CD31+ fue 20 % (rango 26 - 58%), lo que es también concordante con la proliferación linfocitaria disminuida (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de proliferación linfocitaria frente a PHA e Ionomicina+PMA comparado con control sano. Los resultados se muestran como índice de proliferación: cpm mitógeno/cpm sin mitógeno.

Estímulo	RANGO (N=50)	CONTROL DIA	<i>PIK3R1</i> c.1425+1G>T
PHA	> 57	109	40
ION+PMA	> 65	87	27

4.2.2. Inmunosenescencia y susceptibilidad al cáncer:

Dentro del campo de los EII existe una susceptibilidad incrementada al cáncer, por lo que se describen a continuación algunas de las causas potenciales que pueden estar implicadas en las enfermedades abordadas en este trabajo.

XLf/Cernunos está involucrado en la estabilización del complejo XRCC4/DNALig4, esencial para la reparación del DNA en situaciones de inestabilidad genómica. Un mecanismo adicional de susceptibilidad al cáncer es el acortamiento telomérico (286). El mantenimiento de los telómeros requiere un equilibrio preciso entre los procesos de acortamiento y elongación de los mismos mediante la acción del complejo de la telomerasa. Los telómeros deben ser protegidos de la acción de la maquinaria de reparación del DNA. El desequilibrio de la función telomérica desencadena fusiones en los mismos mediadas por el NHEJ, provocando roturas cromosómicas, tumorigénesis, apoptosis o senescencia replicativa (287). La senescencia replicativa está

presente tanto en los pacientes con APDS2 como en aquellos con deficiencia de Cernunos. Dicho fenómeno está asociado a estímulos intrínsecos o extrínsecos y se objetiva en el fenotipo linfocitario de los pacientes incluidos (ver Tabla 10) (288,289).

Tabla 10. Valores de CD4+, CD8+ y compartimento CD8+ en los pacientes analizados. Se representan los valores expresados en número absoluto y (%). Los valores normales se indican entre corchetes.

	CD4+ [500-1450(32%-59%)]	CD8+ [160-950 (15%-36%)]	CD4/CD8 [1-4]	% CD8+CD45RA+CCR7+ (naïve) [30-80]	% CD8+CD45RA+CCR7-(MC) [3-28]	% CD8+CD45RA-CCR7-(ME) [17-35]	% TEMRA (CD8+CD45RA+CCR7+) [2-15]
NFKB1 (3a)	293 (17) ↓	1,282(74) ↑	0,23 ↓↓	(2.3) ↓↓	(1.3) ↓	(91.1) ↑↑	(5.3)
NHEJ1-P1 (0.5a)	53(7) ↓↓	6(1) ↓↓	8,83 ↑	(15.3) ↓	(16.2)	(59.5) ↑	(9)
NHEJ1 - P2 (7a)	304(35) ↓	264(30)	1,15	(72.0)	(4.5)	(16.7)	(6.8)
APDS2 (16a)	284(40) ↓	319(45)	0,89 ↓	(6) ↓↓	(4)	(75) ↑↑	(15)

Una flecha indica descenso o incremento leve. Dos flechas indican descenso o incremento moderado-grave

De modo característico en todos los pacientes, la población de ME en CD8+ está claramente aumentada, como ha sido previamente descrito (289) (290). En el modelo murino KO p50/p105- presentan autoinmunidad orgánica con incremento de la producción de IL6 y activación de linfocitos T autorreactivos.

La inhibición farmacológica *NFKB1* tiene un efecto anti-edad y evita la senescencia inmune, por lo que el mecanismo subyacente de la senescencia en este paciente se debe a otras causas:(291) infección micobacteriana prolongada o el empleo de quimioterapia, particularmente clofarabina. Se trata de un antimetabolito nucleósido análogo de la purina que es usado en el acondicionamiento para el trasplante de progenitores hematopoyéticos, el tratamiento de la leucemia aguda recidivada/refractaria y algunos trastornos histiocíticos en la última década (292–294).

Ninguno de los pacientes desarrolló complicaciones neoplásicas excepto el paciente con deficiencia en *NFKB1*, que padeció una histiocitosis de células de Langerhans (HCL). Sin embargo, no existe relación entre la inmunodeficiencia y este tipo de neoplasia mieloides: en el 47,1% de los casos se identifican mutaciones somáticas en *BRAF* y 21,7% en *MAP2K1*. Esto sugiere que la vía oncogénica principal es la Ras/Raf/MEK/ERK (295). Los pacientes con APDS desarrollan neoplasia hematológica maligna en el 7/53 (11%) de los casos con un debut entre los 1,5 años y los 27 años, siendo el linfoma B difuso de células grandes la variante más frecuente (2 casos). La edad media de presentación de enfermedad maligna en estos pacientes son los 19,5 años, ligeramente más tardía que en el síndrome APDS1 (184). En la Tabla 11 se muestra una comparación de los datos de 2 diferentes cohortes y el paciente descrito en este texto.

Tabla 11. Comparación del paciente APDS2 descrito en este trabajo comparado con 3 cohortes publicadas

Cohorte APDS2 (%) Item	Qiu (296) [n = 3]	Jamee (184) [n=64]	Oh. USIDNET (297) [n=7]	APDS2 (paciente)
Complicaciones infecciosas	100	100	?	Si
Tonsilitis	66,7	38,1	8,6	Si
Infección ocular	33,3	20,3	14,3	No
Linfoproliferación (Adenopatías, Esplenomegalia, Hepatomegalia)	100 100 100 33,3	N.D. 76,6 39,1 12,5	N.D. 71,4 57,1 28,6	Si
Enteropatía	0	21,9	14,3	No
Retraso psicomotor	33,3	26,6	14,3	No
Linfoma	0	18,8	14,3	No

4.2.3. Mecanismos generales de la inmunidad adaptativa: Recombinación VDJ

La influencia de la recombinación VDJ en estos tres tipos de defectos monogénicos es diversa:

En *NHEJ1* y *PIK3R1* se produce un compromiso relevante, por mecanismos diferentes (247).

Por contra, *NFKB1* no interviene en el reordenamiento VDJ.

PIK3R1 es esencial en el reordenamiento VDJ: la ausencia de la subunidad reguladora (p85 α) permite la señalización constitutiva de la subunidad catalítica (p110). De este modo, la señalización excesiva PI3K provoca un fallo en la recombinación VDJ y la inactivación subsiguiente de FOXO1 que culmina en un bloqueo del desarrollo del linfocito B en la médula

ósea (247,298,299). Además, dicha señalización exagerada incrementa la sensibilidad a la selección negativa por autoantígenos (300). La interferencia con la expresión de RAG y/o la selección negativa lleva al desarrollo de linfocitos B con fenotipo aberrante, exactamente como ocurre en los pacientes con APDS.

En el caso de *NHEJ1*, el defecto es menos claro. Los mecanismos de reparación del DNA de doble cadena son en cierto modo redundantes gracias al papel del extremo C-terminal de RAG2 (301).

El resultado final del defecto de recombinación VDJ es el inmunofenotipo T-B-NK+ que puede orientar en el diagnóstico diferencial, siendo T+/-B-NK+ en el caso del síndrome APDS2 al ser el defecto B más grave que el correspondiente a la célula T (184).

4.2.4. Linfocitos T foliculares: cTfh.

En los EII las cTfh tienen un papel central. Participan en el centro germinal de la cooperación T-B necesaria para la producción de anticuerpos además de prevenir la formación de linfocitos B autorreactivos (302). Para una comparativa de las alteraciones observadas en esta población véase la Tabla 12 -modificado de (303)-. Dichos cambios afectan la población cTfh cuantitativa y/o cualitativamente en las inmunodeficiencias primarias y también en las enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y diabetes tipo 1 (304).

Se describen en la Tabla 12 los principales EII que cursan con disminución de cTfh, con el fenotipo cTfh detallado Th1-, Th2-, Th17- y su correlación con la disminución del compartimento B de memoria en la mayoría de los casos y en los 3 tipos de defectos mostrados en este trabajo.

Tabla 12. Alteraciones compartimento cTfh en los pacientes con EII.

efecto genético	TFH	CXCR3 TFH	CCR6 TFH	PD1	IFN- γ	IL-17A	% Memory B cells
APDS2 (PIK3R1)	Bajo	Bajo/Normal	Bajo	Alto	Normal	Bajo	Bajo
NFKB1	Bajo	Normal	Bajo	Normal/Alto	Bajo	Bajo	Bajo
NHEJ1	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
STAT3 LOF	Bajo	Alto	Bajo	Normal	Bajo	Bajo	Bajo
NEMO	Bajo	Bajo	Bajo	Normal	Bajo	Bajo	Bajo
ICOS	Bajo/Normal	Normal	Bajo	Normal/Alto	Normal	Bajo	Normal
BTK	Bajo	Normal	Normal	Normal/Alto	Bajo	Bajo	Bajo
CD40LG	Bajo	Bajo	Bajo	Normal/Alto	Bajo	Normal	Bajo

IL12RB1 LOF	Bajo	Normal	Bajo	Normal	Bajo	Bajo	Normal
IL10R	Bajo	Normal	Normal	Normal	Normal	Alto	Bajo

4.2.5. Linfocitos T no convencionales. El papel de las MAIT.

Las células T invariantes asociadas a mucosa (*Mucosal-associated invariant T*, MAIT) son células T de tipo innato definido por el TCR $\alpha\beta$ semi-invariante que reconoce derivados biosintéticos de pequeñas moléculas derivados de la síntesis de riboflavina que son presentadas sobre la proteína 1 relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad MHC-MR1. Están constituidas en humanos por una cadena alfa V α 7.2 y V β 2/13. En consecuencia, es un TCR restringido con limitada capacidad de reconocimiento de virus, bacterias y células malignas. Sin embargo, son capaces de responder frente a un grupo específico de ligandos sin necesidad de expansión. Presentan un linaje característico: CD45RA⁻CD45RO⁺ CD95^{Hi}CD62L^{Lo}CD44^{Hi}, capaces de secretar citocinas proinflamatorias y tienen mayor representación relativa en tejidos comparado con la sangre periférica, 20-40% vs 2%, respectivamente. Si bien sus funciones no son del todo conocidas su importancia es innegable, ya que la homología es del 90% comparado con el ratón, lo que implica una alta presión evolutiva para la conservación de la población de células MAIT (305).

Se evidenció disminución de las células MAIT en el paciente con deficiencia en NFKB1, sin que hayan podido determinarse en el resto de los pacientes. El listado completo de EII asociados a la disminución o ausencia de células MAIT es: IDCV (306), NFKB1, STAT3 LOF (307), IKZF2

(308), *NHEJ1* (239) , *PIK3CD* (309) , *DOCK8* (310), *MAGT1* (311), *RLTPR* (312), *T-bet* (99), *IL-12R β 2*, *IL-23R*, *IL-12R β 1*, *ROR- γ t* (313) y, potencialmente, *TRAF3* (314).

Si la ausencia de células MAIT (dada su alta capacidad de producción de IFN- γ) es predisponente o determinante para que el paciente con deficiencia de NFKB1 desarrollara infección micobacteriana diseminada es controvertido y no se ha podido demostrar en otras ocasiones, como en la actual (313,315).

4.2.6. Otros defectos del linfocito T no dependientes del mecanismo de recombinación VDJ

Cernunnos está implicado en la correcta longitud telomérica mediante regulación de la biología telomérica. Tanto en APDS como en la deficiencia de Cernunnos está descrito el acortamiento telomérico en los linfocitos CD8+, sin alteraciones en los pacientes con deficiencia de *NFKB1* (286,316). Sin embargo, en el modelo de ratón KO sí se ha evidenciado este fenómeno secundario a inflamación crónica (317).

4.2.7. Linfocito B. Alteración del Cambio de clase e hipermutación somática.

El resultado de la alteración en el cambio de isotipo es la cuantificación normal de IgM en estos pacientes. La IgM es liberada por los plasmablastos a los 3 días de la primovacunación en condiciones normales desde el centro germinal a través del vaso linfático eferente (318).

En el cambio de clase existen mecanismos de membrana y colaboración mediante citocinas. En ausencia de contribución de la vía NFKB existe un defecto en el cambio correcto de isotipo (319). NFKB regula la expresión de citidina deaminasa inducida por activación (AID codificado por el gen *AICDA*, cuyo defecto produce el síndrome Hiper IgM tipo 2), un enzima imprescindible para la escisión del DNA durante la recombinación y cambio de clase. Así, el

modelo murino y los pacientes con este EII presentan dicho defecto (320). Esto explica que el defecto en NFκB bloquea la recombinación y cambio de clase mediado por AID (321).

El cambio de clase de las inmunoglobulinas también se ve afectado por NHEJ1 (322–324). De los defectos monogénicos mostrados, el más característico se da en el síndrome APDS2 (en el que también está alterada la hipermutación somática (325)).

Los pacientes descritos se caracterizan por presentar una inmunodeficiencia humoral o combinada. Sin embargo, la cuantificación de la inmunoglobulina M (IgM) resulta normal en todos ellos. Las inmunodeficiencias combinadas o humorales suelen cursar con disminución o incluso ausencia de la IgM, con ciertas excepciones como se puede observar en la siguiente Tabla 13.

Tabla 13. EII con IgM normal o elevada.

EII con IgM normal	IgM normal/elevada
<i>COPG1</i>	CD40 (<i>TNFRSF5</i>)
<i>MAN2B2</i>	CD40LG (<i>TNFSF5</i>)
<i>IL6ST</i>	<i>NSMCE3</i>
<i>CD28</i>	IKBKG (<i>IKBKG</i>)
<i>PD1</i>	IKBA GOF (<i>NFKBIA</i>)
ELF (<i>ELF4</i>)	APDS1 (<i>PIK3CD</i> GOF)
<i>LAT</i>	APDS2 (<i>PIK3R1</i> LOF)
	Pseudo hiperIgM (<i>AID</i> , <i>UNG</i>)
	<i>INO80</i>
	CMMRD* (<i>PMS2</i> , <i>MSH6</i>)
	XMNE (<i>MAGT1</i>)
	<i>CXCR2</i>
	<i>ATM</i>
	<i>DOCK2</i> **
	<i>RAG1</i> , <i>RAG2</i> **
	NBS (<i>NBN</i>)
	NHEJ (<i>XLF</i> , <i>DCLRE1C</i> , <i>PRKDC</i> , <i>DNALig4</i>)**
	Síndrome CATCH22 con desregulación**

*CMMRD: deficiencia constitucional en la reparación de errores de apareamiento (Constitutional mismatch repair deficiency)

**Casos aislados (326–329)

La señalización PIK3CD es necesaria para que el cambio de clase de isotipo principal de inmunoglobulina se produzca correctamente (véase Tabla 13)(309). En consecuencia, hasta el 80% de los pacientes presentan elevación de IgM o un resultado normal a pesar de una linfopenia B grave, ya que la supervivencia del linfocito B está comprometida desde un estadio anterior al que se produce en la deficiencia de BTK (330).

4.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Todos los pacientes han sido diagnosticados mediante técnicas de secuenciación masiva, ya sea por panel de genes customizado con los genes conocidos en cada momento de estudio del paciente (*NFKB1*, *NHEJ1*) o bien mediante exoma completo y filtrado posterior de las variantes patogénicas identificadas (*PIK3R1*). Cabe destacar que los 2 pacientes con deficiencia de Cernunnos presentaron la misma mutación con manifestaciones fenotípicas opuestas. El primero de ellos como inmunodeficiencia combinada grave y el segundo de ellos como una deficiencia de IgA acompañado de trombopenia inmune primaria. El fenotipo peculiar y la asociación de linfopenia motivó la determinación de poblaciones linfocitarias y a partir de ahí los estudios de segundo (proliferación linfocitaria) y tercer nivel (secuenciación masiva). En la paciente con la deficiencia de p85 α , la agammaglobulinemia y el fenotipo peculiar motivó el estudio de las causas de agammaglobulinemia. Tras un resultado negativo, el estudio mediante trioWES evidenció un cambio de un nucleótido G por T en la posición +1 del sitio donador de splicing (c.1425+1G>T), lo que provoca una delección sin cambio en el marco de lectura del exon 11 de

p85 α . Este cambio ocurre en el 13% de los pacientes con síndrome APDS2. Estas variantes patogénicas de splicing pueden ocurrir en pacientes con mutaciones sinónimas, como es el caso de la familia con la deficiencia de *NFKB1*. En este caso, la pericia del equipo de diagnóstico molecular en el Servicio de Inmunología permitió, en ausencia de variantes patogénicas obvias, orientar al estudio en detalle hacia la variante sinónima *NFKB1* c.705G>A, que provoca un skipping del exón 8. Los estudios mediante mRNA y proteína permitieron elucidar el papel patogénico del cambio.

En el futuro, la aplicación de la mNGS (*Metagenomic Next Generation Sequencing*) permitirá potencialmente identificar con la misma muestra de tejido, el germen causante y la enfermedad subyacente del huésped. Esto puede constituir en el futuro, con todos los retos técnicos (ej. obtención de suficiente DNA de la muestra) y bioinformáticos (alineamiento correcto con los genomas de referencia) que se pueden anticipar, una herramienta clave para la medicina de precisión, al identificar los microorganismos involucrados, la sensibilidad antimicrobiana y la enfermedad del huésped al mismo tiempo(331).

Actualmente el estudio del transcriptoma permite priorizar el filtrado de variantes o tomar decisiones terapéuticas que orienten al potencial defecto subyacente incluso en ausencia de diagnóstico definitivo, como es el caso de las interferonopatías o algunas enfermedades autoinflamatorias (incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal de inicio precoz -inferior a los 6 años- o muy precoz -por debajo de los 2 años-) mediante el empleo de la huella de interferón(332,333).

4.4. TRATAMIENTO

El tratamiento antimicrobiano en los 2 pacientes con infección oportunista fue prolongado. La infección diseminada por *M. genavense* con participación digestiva y de médula ósea requirió 3 años de tratamiento antimicrobiano con desescalada progresiva debido a una muy lenta reconstitución T. Actualmente requiere profilaxis secundaria con azitromicina (dosis única diaria, tres veces a la semana) por un defecto T residual y la gravedad potencial en caso de reactivación(266,334). La paciente con infección oportunista por *Mycoplasma faucium* recibió tratamiento indefinido con la combinación de moxifloxacino (levofloxacino hasta presentar un entesopatía grave), josamicina y doxiciclina combinando 2 de ellos para evitar el desarrollo de resistencias antimicrobianas, dado que la paciente y la familia rechazaron el trasplante de progenitores hematopoyéticos. La controversia existe en sí el primer paciente fue candidato a TPH. El efecto aditivo de la quimioterapia con un agente particularmente lesivo para la inmunidad adaptativa T ha permitido reconocer con el paso de los años que el fenómeno nuclear del defecto inmunitario en este paciente es el de un defecto humoral (ausencia de producción de anticuerpos vacunales, disminución de linfocitos B de memoria de cambio de clase y necesidad de tratamiento sustitutivo con gammaglobulina subcutánea por hipogammaglobulinemia de tipo IgG e IgA), siendo el defecto T en la actualidad parcial, motivo por el que la indicación de TPH es controvertida. Los 2 pacientes con deficiencia de Cernunnos fueron sometidos a TPH y están curados.

Para los EII considerados en este documento el tratamiento curativo es el trasplante de progenitores hematopoyéticos excepto para la deficiencia de *NFKB1*(29,335). Los pacientes con deficiencia de Cernunnos y APDS2 son, en la actualidad, candidatos a TPH. Si bien se puede considerar en el último caso la utilización de los inhibidores específicos como puente hasta el

trasplante(35). A pesar de los buenos resultados preliminares, se ha descrito inestabilidad genómica en linfocitos B de ratones. Si bien esto no se ha replicado en humanos, genera incertidumbre sobre la seguridad a largo plazo, a falta de datos a medio y largo plazo de los ensayos clínicos(336). Dado que el empleo de los inhibidores de PIK3CD se está generalizando en el ámbito de la Oncología, la confirmación de la seguridad del fármaco puede permitir que el tratamiento basado en medicina personalizada sea una alternativa válida con menos riesgos, el menos teóricos, que el TPH, dejando esta opción a los pacientes que desarrollen enfermedad maligna (337). En casos seleccionados los pacientes con deficiencia de NFkB1 pueden ser candidatos a trasplante.

Los pacientes de los 3 tipos de inmunodeficiencias presentados desarrollan senescencia inmunológica. La respuesta a las infecciones en este contexto puede ser subóptimo de manera que incluso en el caso de leucoencefalopatía multifocal progresiva por reactivación del virus JC se emplea el bloqueo PD1 o la terapia con linfocitos T antivirales específicos (338–340). Queda pendiente evaluar la respuesta a la inmunoterapia de los pacientes con EII en el contexto de malignidad, si bien la dificultad de su uso ya se ha demostrado para las enfermedades autoinmunes (341). Por otra parte, este fenotipo senescente no es específico de los EII, sino que también ha sido identificado en otras enfermedades como la infección por el VIH (342). La senescencia inmunológica se considera que puede ser un factor contribuyente al desarrollo de tumores en los pacientes con EII (343), debido probablemente a la reactivación viral y por tanto mayor susceptibilidad a la malignización.

5. CONCLUSIONES

1. La colaboración multidisciplinar en los pacientes que presentaron IDC ha permitido el diagnóstico de 3 enfermedades complejas. Actualmente, el diagnóstico de EII sigue siendo un reto ya que en la mayoría de las ocasiones solo se consigue el diagnóstico en aproximadamente el 30-50% de los pacientes.
2. La deficiencia de *NFKB1* muestra un amplio rango de variabilidad fenotípica que incluye desde individuos asintomáticos hasta otros con síntomas autoinflamatorios o enfermedad gastrointestinal inflamatoria.
3. La variante en heterocigosis *NFKB1* (c.705G>A) de pérdida de función conduce a un nuevo fenotipo de inmunodeficiencia combinada no completamente penetrante con predisposición a las infecciones por micobacterias no tuberculosas.
4. La presencia de una infección oportunista en un paciente con una variante sinónima en *NFKB1*, atípica o recalcitrante incluso en un paciente con inmunodeficiencia secundaria, constituye un signo de alarma para la sospecha de EII, dado que su presencia en la región codificante puede impedir el splicing normal afectando a la inmunidad innata y adquirida.
5. Los pacientes con deficiencia de Cernunnos/XLF pueden exhibir un perfil clínico e inmunológico extremadamente diferente aunque compartan un defecto similar de la reparación del DNA. Ello implica que otros factores genéticos o ambientales pueden modular ciertos fenotipos clínicos.
6. Las mutaciones dominantes en *PIK3R1* pueden causar el síndrome APDS2 y manifestarse con infección precoz y de larga duración como abscesos diseminados por *Mycoplasma faucium* incluso en ausencia de un fenotipo HiperIgM.

7. El abordaje multidisciplinar es esencial para el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes, como se muestra en este caso, donde la secuenciación rRNA 16S fue clave para conseguir un diagnóstico microbiológico en una infección por un germen de difícil crecimiento o no cultivable.
8. La combinación del tratamiento antibiótico con radiología intervencionista puede ser útil en la erradicación de abscesos gigantes en pacientes con EII.
9. El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva disminuye el riesgo de retraso diagnóstico y favorece un tratamiento personalizado que permita seleccionar los pacientes candidatos a terapias celulares antes de que se establezca daño orgánico irreversible, ya sea mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos o el empleo de terapia génica.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. 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*. 24 de junio de 2022;
2. Schwarze K, Buchanan J, Fermont JM, Dreau H, Tilley MW, Taylor JM, et al. The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in the United Kingdom. *Genet Med*. enero de 2020;22(1):85-94.
3. Piovesan A, Antonaros F, Vitale L, Strippoli P, Pelleri MC, Caracausi M. Human protein-coding genes and gene feature statistics in 2019. *BMC Res Notes*. 4 de junio de 2019;12(1):315.
4. Itan Y, Casanova JL. Novel primary immunodeficiency candidate genes predicted by the human gene connectome. *Front Immunol*. 2015;6:142.
5. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Benhsaien I, Mahlaoui N, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol*. enero de 2013;33(1):1-7.
6. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. Vol. 27, *J Clin Immunol*. 2007. p. 497-502.
7. Popa C, Fischer R, Kurbitaeva S, Ravakhah K. Common Variable Immune Deficiency: An Outpatient Experience. *South Med J*. agosto de 2022;115(8):593-6.
8. in collaboration with the Plasma Protein Therapeutics Association (PPTA) Taskforce, Odnoletkova I, Kindle G, Quinti I, Grimbacher B, Knerr V, et al. The burden of common variable immunodeficiency disorders: a retrospective analysis of the European Society for Immunodeficiency (ESID) registry data. *Orphanet J Rare Dis*. diciembre de 2018;13(1):201.
9. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 1 de enero de 2008;111(1):77-85.
10. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 15 de julio de 2008;112(2):277-86.
11. 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. Vol. 134, *J Allergy Clin Immunol*. 2014. p. 116-26.
12. Mauracher AA, Gujer E, Bachmann LM, Güsewell S, Pachlopnik Schmid J. Patterns of Immune Dysregulation in Primary Immunodeficiencies: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract*. febrero de 2021;9(2):792-802.e10.
13. Condino-Neto A, Espinosa-Rosales FJ. Changing the Lives of People With Primary Immunodeficiencies (PI) With Early Testing and Diagnosis. *Front Immunol*. 2018;9:1439.
14. Subbarayan A, Colarusso G, Hughes SM, Gennery AR, Slatter M, Cant AJ, et al. Clinical features that identify children with primary immunodeficiency diseases. *Pediatrics*. mayo de 2011;127(5):810-6.
15. Costagliola G, Peroni DG, Consolini R. Beyond Infections: New Warning Signs for Inborn Errors of Immunity in Children. *Front Pediatr*. 10 de junio de 2022;10:855445.
16. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol*. 2018;14(Suppl 2):61.
17. Eldeniz FC, Gul Y, Yorulmaz A, Guner SN, Keles S, Reisli I. Evaluation of the 10 Warning Signs in Primary and Secondary Immunodeficient Patients. *Front Immunol*. 13 de

mayo de 2022;13:900055.

18. Broderick L. Recurrent Fevers for the Pediatric Immunologist: It's Not All Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep.* enero de 2016;16(1):2.
19. Al-Herz W, Chou J, Delmonte OM, Massaad MJ, Bainter W, Castagnoli R, et al. Comprehensive Genetic Results for Primary Immunodeficiency Disorders in a Highly Consanguineous Population. *Front Immunol.* 2018;9:3146.
20. Simon AJ, Golan AC, Lev A, Stauber T, Barel O, Somekh I, et al. Whole exome sequencing (WES) approach for diagnosing primary immunodeficiencies (PIDs) in a highly consanguineous community. *Clin Immunol Orlando Fla.* mayo de 2020;214:108376.
21. Chapel H, Prevot J, Gaspar HB, España±ol T, Bonilla FA, Solis L, et al. Primary Immune Deficiencies - Principles of Care. *Front Immunol [Internet].* 15 de diciembre de 2014 [citado 28 de julio de 2022];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00627/abstract>
22. Vorsteveld EE, Hoischen A, van der Made CI. Next-Generation Sequencing in the Field of Primary Immunodeficiencies: Current Yield, Challenges, and Future Perspectives. *Clin Rev Allergy Immunol.* octubre de 2021;61(2):212-25.
23. Fusaro M, Rosain J, Grandin V, Lambert N, Hanein S, Fourrage C, et al. Improving the diagnostic efficiency of primary immunodeficiencies with targeted next-generation sequencing. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2021;147(2):734-7.
24. Weifenbach N, Schneckenburger AAC, Lötters S. Global Distribution of Common Variable Immunodeficiency (CVID) in the Light of the UNDP Human Development Index (HDI): A Preliminary Perspective of a Rare Disease. *J Immunol Res.* 1 de septiembre de 2020;2020:1-8.
25. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood.* 16 de febrero de 2012;119(7):1650-7.
26. Abolhassani H, Hammarström L, Cunningham-Rundles C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. *Blood.* 27 de febrero de 2020;135(9):656-67.
27. Fliegau M, L. Bryant V, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, et al. Haploinsufficiency of the NF-κB1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* septiembre de 2015;97(3):389-403.
28. Tuijnenburg P, Lango Allen H, Burns SO, Greene D, Jansen MH, Staples E, et al. Loss-of-function nuclear factor κB subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. Vol. 142, *J Allergy Clin Immunol.* 2018. p. 1285-96.
29. Lorenzini T, Fliegau 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.* octubre de 2020;146(4):901-11.
30. Ameratunga R, Brewerton M, Slade C, Jordan A, Gillis D, Steele R, et al. Comparison of Diagnostic Criteria for Common Variable Immunodeficiency Disorder. *Front Immunol [Internet].* 15 de septiembre de 2014 [citado 3 de octubre de 2022];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00415/abstract>
31. ESID - European Society for Immunodeficiencies [Internet]. [citado 28 de julio de 2022]. Disponible en: <https://esid.org/Working-Parties/Clinical-Working-Party/Resources/Diagnostic-criteria-for-PID2#Q3>

32. Egg D, Rump IC, Mitsuiki N, Rojas-Restrepo J, Maccari ME, Schwab C, et al. Therapeutic options for CTLA-4 insufficiency. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2022;149(2):736-46.
33. 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. *Vol. 349, Science*. 2015. p. 436-40.
34. 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. *Vol. 9, Front Immunol*. 2018. p. 543.
35. 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. *Vol. 130, Blood*. 2017. p. 2307-16.
36. Arnold DE, Chellapandian D, Leiding JW. The Use of Biologic Modifiers as a Bridge to Hematopoietic Cell Transplantation in Primary Immune Regulatory Disorders. *Front Immunol*. 24 de junio de 2021;12:692219.
37. Hadjadj J, Frémond ML, Neven B. Emerging Place of JAK Inhibitors in the Treatment of Inborn Errors of Immunity. *Front Immunol*. 17 de septiembre de 2021;12:717388.
38. Gruber C, Martin-Fernandez M, Ailal F, Qiu X, Taft J, Altman J, et al. Homozygous STAT2 gain-of-function mutation by loss of USP18 activity in a patient with type I interferonopathy. *J Exp Med*. 4 de mayo de 2020;217(5):e20192319.
39. Perez EE, Orange JS, Bonilla F, Chinen J, Chinn IK, Dorsey M, et al. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *J Allergy Clin Immunol*. marzo de 2017;139(3):S1-46.
40. Abolhassani H, Sadaghiani MS, Aghamohammadi A, Ochs HD, Rezaei N. Home-based subcutaneous immunoglobulin versus hospital-based intravenous immunoglobulin in treatment of primary antibody deficiencies: systematic review and meta analysis. *J Clin Immunol*. 2012;32(6):1180-92.
41. Anderson-Smits C, Park M, Bell J, Mitchell S, Hartley L, Hawe E. Subcutaneous immunoglobulin use in immunoglobulin-naïve patients with primary immunodeficiency: a systematic review. *Immunotherapy*. abril de 2022;14(5):373-87.
42. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol*. junio de 2009;145(6):709-27.
43. Hurst JR, Verma N, Lowe D, Baxendale HE, Jolles S, Kelleher P, et al. British Lung Foundation/United Kingdom Primary Immunodeficiency Network Consensus Statement on the Definition, Diagnosis, and Management of Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. julio de 2017;5(4):938-45.
44. Cinetto F, Scarpa R, Carrabba M, Firinu D, Lougaris V, Buso H, et al. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers. *Front Immunol*. 10 de marzo de 2021;12:627423.
45. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. agosto de 2004;114(2):415-21.

46. Lamers OAC, Smits BM, Leavis HL, de Bree GJ, Cunningham-Rundles C, Dalm VASH, et al. Treatment Strategies for GLILD in Common Variable Immunodeficiency: A Systematic Review. *Front Immunol.* 15 de abril de 2021;12:606099.
47. Bintalib HM, Lowe DM, Mancuso G, Gkrepi G, Seneviratne SL, Burns SO, et al. Corticosteroid-induced remission and mycophenolate maintenance therapy in granulomatous lymphocytic interstitial lung disease: long-term, longitudinal change in lung function in a single-centre cohort. *ERJ Open Res.* octubre de 2022;8(4):00024-2022.
48. Pulvirenti F, Pecoraro A, Cinetto F, Milito C, Valente M, Santangeli E, et al. Gastric Cancer Is the Leading Cause of Death in Italian Adult Patients With Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol.* 5 de noviembre de 2018;9:2546.
49. Maarschalk-Ellerbroek L, Oldenburg B, Mommers I, Hoepelman A, Brosens L, Offerhaus G, et al. Outcome of screening endoscopy in common variable immunodeficiency disorder and X-linked agammaglobulinemia. *Endoscopy.* 16 de enero de 2013;45(04):320-3.
50. Egg D, Schwab C, Gabrysch A, Arkwright PD, Cheesman E, Giulino-Roth L, et al. Increased Risk for Malignancies in 131 Affected CTLA4 Mutation Carriers. *Front Immunol.* 10 de septiembre de 2018;9:2012.
51. Slatter MA, Gennery AR. Advances in the treatment of severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol.* septiembre de 2022;242:109084.
52. Raymond LS, Leiding J, Forbes-Satter LR. Diagnostic Modalities in Primary Immunodeficiency. *Clin Rev Allergy Immunol.* agosto de 2022;63(1):90-8.
53. Compagno N, Malipiero G, Cinetto F, Agostini C. Immunoglobulin Replacement Therapy in Secondary Hypogammaglobulinemia. *Front Immunol [Internet].* 8 de diciembre de 2014 [citado 29 de agosto de 2022];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00626/abstract>
54. Ruffner MA, Sullivan KE, Henrickson SE. Recurrent and Sustained Viral Infections in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2017;8:665.
55. Aguilar C, Malphettes M, Donadieu J, Chandesris O, Coignard-Biehler H, Catherinot E, et al. Prevention of infections during primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de noviembre de 2014;59(10):1462-70.
56. Ewertowska M, Grześk E, Urbańczyk A, Dąbrowska A, Bąbol-Pokora K, Łęcka M, et al. Activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome 1 and 2 (APDS 1 and APDS 2): similarities and differences based on clinical presentation in two boys. *Allergy Asthma Clin Immunol.* diciembre de 2020;16(1):22.
57. Del Rosal T, Quintana-Ortega C, Deyá-Martínez A, Soler-Palacín P, Goycochea-Valdivia WA, Salmón N, et al. Impact of cytomegalovirus infection prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with inborn errors of immunity. *Eur J Pediatr.* 14 de septiembre de 2022;1-10.
58. Antoine C, Müller S, Cant A, Cavazzana-Calvo M, Veys P, Vossen J, et al. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. Vol. 361, *Lancet.* 2003. p. 553-60.
59. Chan A, Scalchunes C, Boyle M, Puck JM. Early vs. delayed diagnosis of severe combined immunodeficiency: A family perspective survey. *Clin Immunol.* enero de 2011;138(1):3-8.
60. van den Akker-van Marle ME, Blom M, van der Burg M, Bredius RGM, Van der Ploeg CPB. Economic Evaluation of Different Screening Strategies for Severe Combined Immunodeficiency Based on Real-Life Data. *Int J Neonatal Screen.* 15 de septiembre de

2021;7(3):60.

61. Brown L, Xu-Bayford J, Allwood Z, Slatter M, Cant A, Davies EG, et al. Neonatal diagnosis of severe combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. *Blood*. 17 de marzo de 2011;117(11):3243-6.
62. Myers LA, Patel DD, Puck JM, Buckley RH. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. *Vol. 99, Blood*. 2002. p. 872-8.
63. Speckmann C, Doerken S, Aiuti A, Albert MH, Al-Herz W, Allende LM, et al. A prospective study on the natural history of patients with profound combined immunodeficiency: An interim analysis. *J Allergy Clin Immunol*. abril de 2017;139(4):1302-1310.e4.
64. Felgentreff K, Perez-Becker R, Speckmann C, Schwarz K, Kalwak K, Markelj G, et al. Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. *Vol. 141, Clin Immunol*. 2011. p. 73-82.
65. Liston A, Enders A, Siggs OM. Unravelling the association of partial T-cell immunodeficiency and immune dysregulation. *Vol. 8, Nat Rev Immunol*. 2008. p. 545-58.
66. Cirillo E, Cancrini C, Azzari C, Martino S, Martire B, Pession A, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Features of Typical and Atypical Severe Combined Immunodeficiency: Report of the Italian Primary Immunodeficiency Network. *Front Immunol*. 2019;10:1908.
67. Morris EC. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults with primary immunodeficiency. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 4 de diciembre de 2020;2020(1):649-60.
68. Fox TA, Chakraverty R, Burns S, Carpenter B, Thomson K, Lowe D, et al. Successful outcome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults with primary immunodeficiency. *Blood*. 22 de febrero de 2018;131(8):917-31.
69. Pessach I, Walter J, Notarangelo LD. Recent advances in primary immunodeficiencies: identification of novel genetic defects and unanticipated phenotypes. *Pediatr Res*. mayo de 2009;65(5 Pt 2):3R-12R.
70. Blom M, Bredius RGM, van der Burg M. Future Perspectives of Newborn Screening for Inborn Errors of Immunity. *Int J Neonatal Screen*. 2 de noviembre de 2021;7(4):74.
71. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. mayo de 2015;17(5):405-24.
72. Ellard S, Baple EL, Berry I, Forrester N, Turnbull C, Owens M, Eccles DM, Abbs S, Scott R, Deans Z, Lester T, Campbell J, Newman W, McMullan D. ACGS best practice guidelines for variant classification 2020: association for clinical genetics science (ACGS). 2020; Disponible en: <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/#VariantGuidelines>
73. Houge G, Laner A, Cirak S, de Leeuw N, Scheffer H, den Dunnen JT. Stepwise ABC system for classification of any type of genetic variant. *Eur J Hum Genet*. febrero de 2022;30(2):150-9.
74. Petrikin JE, Willig LK, Smith LD, Kingsmore SF. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin Perinatol*. diciembre de 2015;39(8):623-31.
75. Mensa-Vilaró A, Bravo García-Morato M, de la Calle-Martin O, Franco-Jarava C,

- Martínez-Saavedra MT, González-Granado LI, et al. Unexpected relevant role of gene mosaicism in patients with primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. enero de 2019;143(1):359-68.
76. Mørup SB, Nazaryan-Petersen L, Gabrielaite M, Reekie J, Marquart HV, Hartling HJ, et al. Added Value of Reanalysis of Whole Exome- and Whole Genome Sequencing Data From Patients Suspected of Primary Immune Deficiency Using an Extended Gene Panel and Structural Variation Calling. *Front Immunol*. 30 de junio de 2022;13:906328.
 77. Platt CD, Zaman F, Bainter W, Stafstrom K, Almutairi A, Reigle M, et al. Efficacy and economics of targeted panel versus whole-exome sequencing in 878 patients with suspected primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2021;147(2):723-6.
 78. Seleman M, Hoyos-Bachiloglu R, Geha RS, Chou J. Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. Vol. 8, *Front Immunol*. 2017. p. 847.
 79. Engelbrecht C, Urban M, Schoeman M, Paarwater B, van Coller A, Abraham DR, et al. Clinical Utility of Whole Exome Sequencing and Targeted Panels for the Identification of Inborn Errors of Immunity in a Resource-Constrained Setting. *Front Immunol*. 21 de mayo de 2021;12:665621.
 80. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. abril de 2002;3(4):285-98.
 81. Gallego-Bustos F, Gotea V, Ramos-Amador JT, Rodríguez-Pena R, Gil-Herrera J, Sastre A, et al. A Case of IL-7R Deficiency Caused by a Novel Synonymous Mutation and Implications for Mutation Screening in SCID Diagnosis. Vol. 7, *Front Immunol*. 2016. p. 443.
 82. Gonzalez-Granado LI, Ruiz-García R, Blas-Espada J, Moreno-Villares JM, Germán-Díaz M, López-Nevado M, et al. Acquired and Innate Immunity Impairment and Severe Disseminated Mycobacterium genavense Infection in a Patient With a NF-κB1 Deficiency. *Front Immunol*. 2018;9:3148.
 83. Elsink K, Huibers MMH, Hollink IHIM, Simons A, Zonneveld-Huijssoon E, van der Veken LT, et al. Implementation of Early Next-Generation Sequencing for Inborn Errors of Immunity: A Prospective Observational Cohort Study of Diagnostic Yield and Clinical Implications in Dutch Genome Diagnostic Centers. *Front Immunol*. 21 de diciembre de 2021;12:780134.
 84. Thaventhiran JED, Lango Allen H, Burren OS, Rae W, Greene D, Staples E, et al. Whole-genome sequencing of a sporadic primary immunodeficiency cohort. *Nature*. 2 de julio de 2020;583(7814):90-5.
 85. Downie L, Halliday J, Lewis S, Amor DJ. Principles of Genomic Newborn Screening Programs: A Systematic Review. *JAMA Netw Open*. 20 de julio de 2021;4(7):e2114336.
 86. Menu E, Driouich JS, Luciani L, Morand A, Ranque S, L'Ollivier C. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in Hospitalized Children Less Than 3 Years of Age. *J Fungi*. 9 de julio de 2021;7(7):546.
 87. Lundgren IS, Englund JA, Burroughs LM, Torgerson TR, Skoda-Smith S. Outcomes and Duration of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia Therapy in Infants With Severe Combined Immunodeficiency. *Pediatr Infect Dis J*. enero de 2012;31(1):95-7.
 88. Kiaee F, Azizi G, Rafiemanesh H, Zainaldain H, Sadaat Rizvi F, Alizadeh M, et al. Malignancy in common variable immunodeficiency: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol*. 3 de octubre de 2019;15(10):1105-13.
 89. Bruns L, Panagiota V, von Hardenberg S, Schmidt G, Adriawan IR, Sogka E, et al.

- Common Variable Immunodeficiency-Associated Cancers: The Role of Clinical Phenotypes, Immunological and Genetic Factors. *Front Immunol.* 17 de febrero de 2022;13:742530.
90. Bednarska M, Jankowska I, Pawelas A, Piwczyńska K, Bajer A, Wolska-Kuśnierz B, et al. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitol Res.* septiembre de 2018;117(9):2869-79.
 91. van den Berg JM, van Koppen E, Åhlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic Granulomatous Disease: The European Experience. Alspaugh A, editor. *PLoS ONE.* 21 de abril de 2009;4(4):e5234.
 92. Einarsdóttir HM, Erlendsdóttir H, Kristinsson KG, Gottfredsson M. Nationwide study of recurrent invasive pneumococcal infections in a population with a low prevalence of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* septiembre de 2005;11(9):744-9.
 93. Rotulo GA, Plat G, Beaupain B, Blanche S, Moushous D, Sicre de Fontbrune F, et al. Recurrent bacterial infections, but not fungal infections, characterise patients with ELANE-related neutropenia: a French Severe Chronic Neutropenia Registry study. *Br J Haematol.* septiembre de 2021;194(5):908-20.
 94. Prince BT, Thielen BK, Williams KW, Kellner ES, Arnold DE, Cosme-Blanco W, et al. Geographic Variability and Pathogen-Specific Considerations in the Diagnosis and Management of Chronic Granulomatous Disease. *Pediatr Health Med Ther.* 2020;11:257-68.
 95. Lim HK, Huang SXL, Chen J, Kerner G, Gilliaux O, Bastard P, et al. Severe influenza pneumonitis in children with inherited TLR3 deficiency. *J Exp Med.* 2 de septiembre de 2019;216(9):2038-56.
 96. Mogensen TH. Genetic susceptibility to viral disease in humans. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 24 de febrero de 2022;S1198-743X(22)00098-2.
 97. Bustamante J. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: recent discoveries. *Hum Genet.* junio de 2020;139(6-7):993-1000.
 98. Noma K, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S. Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases: state of the art. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 11 de marzo de 2022;S1198-743X(22)00143-4.
 99. Yang R, Mele F, Worley L, Langlais D, Rosain J, Benhsaien I, et al. Human T-bet Governs Innate and Innate-like Adaptive IFN- γ Immunity against Mycobacteria. *Cell.* 23 de diciembre de 2020;183(7):1826-1847.e31.
 100. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Semin Immunol.* diciembre de 2014;26(6):454-70.
 101. Cifaldi C, Ursu GM, D'Alba I, Paccoud O, Danion F, Lantermier F, et al. Main human inborn errors of immunity leading to fungal infections. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 18 de julio de 2022;S1198-743X(22)00346-9.
 102. Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, 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.* 19 de agosto de 2021;6(62).
 103. Zhang Q, Pizzorno A, Miorin L, Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with critical influenza pneumonia. *J Exp Med.* 7 de noviembre de 2022;219(11):e20220514.
 104. Spaan AN, Neehus AL, Laplantine E, Staels F, Ogishi M, Seeleuthner Y, et al. Human

- OTULIN haploinsufficiency impairs cell-intrinsic immunity to staphylococcal α -toxin. *Science*. 17 de junio de 2022;376(6599):eabm6380.
105. Boisson B. The genetic basis of pneumococcal and staphylococcal infections: inborn errors of human TLR and IL-1R immunity. *Hum Genet*. junio de 2020;139(6-7):981-91.
 106. Fischer A, Provot J, Jais JP, Alcais A, Mahlaoui N, members of the CEREDIH French PID study group. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2017;140(5):1388-1393.e8.
 107. Pfajfer L, Seidel MG, Houmadi R, Rey-Barroso J, Hirschmugl T, Salzer E, et al. WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly. *Blood*. 26 de octubre de 2017;130(17):1949-53.
 108. Brigida I, Zoccolillo M, Cicalese MP, Pfajfer L, Barzaghi F, Scala S, et al. T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood*. 29 de noviembre de 2018;132(22):2362-74.
 109. Au-Yeung BB, Shah NH, Shen L, Weiss A. ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease. *Annu Rev Immunol*. 26 de abril de 2018;36(1):127-56.
 110. Mao H, Yang W, Latour S, Yang J, Winter S, Zheng J, et al. RASGRP1 mutation in autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease. *J Allergy Clin Immunol*. agosto de 2018;142(2):595-604.e16.
 111. Stepensky P, Rensing-Ehl A, Gather R, Revel-Vilk S, Fischer U, Nabhani S, et al. Early-onset Evans syndrome, immunodeficiency, and premature immunosenescence associated with tripeptidyl-peptidase II deficiency. *Blood*. 29 de enero de 2015;125(5):753-61.
 112. Bezrodnik L, Gaillard MI, Caldirola MS. Dysregulatory syndromes: the role of signal transducers and activators of transcription. *Curr Opin Pediatr*. diciembre de 2018;30(6):821-8.
 113. Besnard C, Levy E, Aladjidi N, Stolzenberg MC, Magerus-Chatinet A, Alibeu O, et al. Pediatric-onset Evans syndrome: Heterogeneous presentation and high frequency of monogenic disorders including LRBA and CTLA4 mutations. *Clin Immunol*. marzo de 2018;188:52-7.
 114. Duclaux-Loras R, Charbit-Henrion F, Neven B, Nowak J, Collardeau-Frachon S, Malcus C, et al. Clinical Heterogeneity of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A French Multicenter Retrospective Study. *Clin Transl Gastroenterol*. octubre de 2018;9(10):e201.
 115. Morales-Mantilla DE, King KY. The Role of Interferon-Gamma in Hematopoietic Stem Cell Development, Homeostasis, and Disease. *Curr Stem Cell Rep*. septiembre de 2018;4(3):264-71.
 116. Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 16 de abril de 2020;135(16):1332-43.
 117. Ridaura-Sanz C, Durán-McKinster C, Ruiz-Maldonado R. Usefulness of the skin biopsy as a tool in the diagnosis of silvery hair syndrome. *Pediatr Dermatol*. noviembre de 2018;35(6):780-3.
 118. West AH, Churpek JE. Old and new tools in the clinical diagnosis of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology*. 8 de diciembre de 2017;2017(1):79-87.
 119. Geier CB, Ellison M, Cruz R, Pawar S, Leiss-Piller A, Zmajkovicova K, et al. Disease Progression of WHIM Syndrome in an International Cohort of 66 Pediatric and Adult Patients. *J Clin Immunol*. 10 de agosto de 2022;
 120. Badolato R, Donadieu J, the WHIM Research Group. How I treat warts,

- hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome. *Blood*. 7 de diciembre de 2017;130(23):2491-8.
121. Adeli MM, Buckley RH. Why Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Is Essential: A Case Report. *Pediatrics*. 1 de agosto de 2010;126(2):e465-9.
 122. Zafar R, Ver Heul A, Beigelman A, Bednarski JJ, Bayliss SJ, Dehner LP, et al. Omenn Syndrome Presenting with Striking Erythroderma and Extreme Lymphocytosis in a Newborn. *Pediatr Dermatol*. enero de 2017;34(1):e37-9.
 123. Moignet A, Lamy T. Latest Advances in the Diagnosis and Treatment of Large Granular Lymphocytic Leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. mayo de 2018;(38):616-25.
 124. Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Rajala H, Gómez-Seguí I, Olson T, et al. STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 3 de octubre de 2013;122(14):2453-9.
 125. Lu HY, Biggs CM, Blanchard-Rohner G, Fung SY, Sharma M, Turvey SE. Germline CBM-opathies: From immunodeficiency to atopy. *J Allergy Clin Immunol*. mayo de 2019;143(5):1661-73.
 126. Boisson B, Puel A, Picard C, Casanova JL. Human I κ B α Gain of Function: a Severe and Syndromic Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. julio de 2017;37(5):397-412.
 127. Touw IP. Congenital neutropenia: disease models guiding new treatment strategies. *Curr Opin Hematol*. enero de 2022;29(1):27-33.
 128. Saettini F, Mantovani P, De Lorenzo P, Biondi A, Bonanomi S. Severe and recurrent infections identify severe congenital neutropenia and primary immunodeficiencies in pediatric isolated neutropenia. *Clin Immunol*. febrero de 2021;223:108643.
 129. Hoenig M, Lagresle-Peyrou C, Pannicke U, Notarangelo LD, Porta F, Gennery AR, et al. Reticular dysgenesis: international survey on clinical presentation, transplantation, and outcome. *Blood*. 25 de mayo de 2017;129(21):2928-38.
 130. Volpi S, Santori E, Abernethy K, Mizui M, Dahlberg CIM, Recher M, et al. N-WASP is required for B-cell-mediated autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*. 14 de enero de 2016;127(2):216-20.
 131. de la Morena MT. Clinical Phenotypes of Hyper-IgM Syndromes. *J Allergy Clin Immunol Pract*. noviembre de 2016;4(6):1023-36.
 132. Lagresle-Peyrou C, Luce S, Ouchani F, Soheili TS, Sadek H, Chouteau M, et al. X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *J Allergy Clin Immunol*. diciembre de 2016;138(6):1681-1689.e8.
 133. Miano M, Guardo D, Grossi A, Palmisani E, Fioredda F, Terranova P, et al. Underlying Inborn Errors of Immunity in Patients With Evans Syndrome and Multilineage Cytopenias: A Single-Centre Analysis. *Front Immunol*. 17 de mayo de 2022;13:869033.
 134. Walter JE, Farmer JR, Foldvari Z, Torgerson TR, Cooper MA. Mechanism-Based Strategies for the Management of Autoimmunity and Immune Dysregulation in Primary Immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol Pract*. noviembre de 2016;4(6):1089-100.
 135. the DEFI study group, Guffroy A, Mourot-Cottet R, Gérard L, Gies V, Lagresle C, et al. Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome. *J Clin Immunol*. octubre de 2017;37(7):715-26.
 136. Ghurye RR, Sundaram K, Smith F, Clark B, Simpson MA, Fairbanks L, et al. Novel ADA 2 mutation presenting with neutropenia, lymphopenia and bone marrow failure in patients with deficiency in adenosine deaminase 2 (DADA 2). *Br J Haematol* [Internet]. agosto de

- 2019 [citado 5 de septiembre de 2022];186(3). Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.15896>
137. Bolze A, Boisson B, Bosch B, Antipenko A, Bouaziz M, Sackstein P, et al. Incomplete penetrance for isolated congenital asplenia in humans with mutations in translated and untranslated *RPSA* exons. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 21 de agosto de 2018 [citado 4 de septiembre de 2022];115(34). Disponible en:
<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1805437115>
 138. Bride K, Teachey D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Research*. 1 de noviembre de 2017;6:1928.
 139. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in *GATA2* are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*. 8 de septiembre de 2011;118(10):2653-5.
 140. Bradshaw G, Lualhati RR, Albury CL, Maksemous N, Roos-Araujo D, Smith RA, et al. Exome Sequencing Diagnoses X-Linked Moesin-Associated Immunodeficiency in a Primary Immunodeficiency Case. *Front Immunol*. 5 de marzo de 2018;9:420.
 141. Locatelli F, Strahm B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood*. 29 de marzo de 2018;131(13):1406-14.
 142. Bigley V, Maisuria S, Cytlak U, Jardine L, Care MA, Green K, et al. Biallelic interferon regulatory factor 8 mutation: A complex immunodeficiency syndrome with dendritic cell deficiency, monocytopenia, and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol*. junio de 2018;141(6):2234-48.
 143. Sun X, Wei Y, Lee PP, Ren B, Liu C. The role of WASp in T cells and B cells. *Cell Immunol*. julio de 2019;341:103919.
 144. Volpi S, Cicalese MP, Tuijnburg P, Tool ATJ, Cuadrado E, Abu-Halaweh M, et al. A combined immunodeficiency with severe infections, inflammation, and allergy caused by *ARPC1B* deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. junio de 2019;143(6):2296-9.
 145. Takenouchi T, Okamoto N, Ida S, Uehara T, Kosaki K. Further evidence of a mutation in *CDC42* as a cause of a recognizable syndromic form of thrombocytopenia. *Am J Med Genet A*. abril de 2016;170(4):852-5.
 146. Crowley TB, Campbell IM, Liebling EJ, Lambert MP, Levitt Katz LE, Heimall J, et al. Distinct immune trajectories in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome and immune-mediated diseases. *J Allergy Clin Immunol*. enero de 2022;149(1):445-50.
 147. Consonni F, Dotta L, Todaro F, Vairo D, Badolato R. Signal transducer and activator of transcription gain-of-function primary immunodeficiency/immunodysregulation disorders: *Curr Opin Pediatr*. diciembre de 2017;29(6):711-7.
 148. Stremenova Spigarova J, Lawless D, Mohamad SMB, Engelhardt KR, Doody G, Shrimpton J, et al. Germline *TET2* loss of function causes childhood immunodeficiency and lymphoma. *Blood*. 27 de agosto de 2020;136(9):1055-66.
 149. Bakhtiar S, Kaffenberger C, Salzmann-Manrique E, Donhauser S, Lueck L, Karaca NE, et al. Regulatory B cells in patients suffering from inborn errors of immunity with severe immune dysregulation. *J Autoimmun*. octubre de 2022;132:102891.
 150. Pieniawska-Śmiech K, Pasternak G, Lewandowicz-Uszyńska A, Jutel M. Diagnostic Challenges in Patients with Inborn Errors of Immunity with Different Manifestations of Immune Dysregulation. *J Clin Med*. 20 de julio de 2022;11(14):4220.
 151. López-Nevado M, González-Granado LI, Ruiz-García R, Pleguezuelo D, Cabrera-

- Marante O, Salmón N, et al. Primary Immune Regulatory Disorders With an Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome-Like Phenotype: Immunologic Evaluation, Early Diagnosis and Management. *Front Immunol.* 10 de agosto de 2021;12:671755.
152. Consonni F, Gambineri E, Favre C. ALPS, FAS, and beyond: from inborn errors of immunity to acquired immunodeficiencies. *Ann Hematol.* marzo de 2022;101(3):469-84.
 153. Wallace JG, Alosaimi MF, Khayat CD, Jaber F, Almutairi A, Beaussant-Cohen S, et al. ITK deficiency presenting as autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2021;147(2):743-745.e1.
 154. Alkhairy OK, Perez-Becker R, Driessen GJ, Abolhassani H, van Montfrans J, Borte S, et al. Novel mutations in TNFRSF7/CD27: Clinical, immunologic, and genetic characterization of human CD27 deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* septiembre de 2015;136(3):703-712.e10.
 155. Ghosh S, Köstel Bal S, Edwards ESJ, Pillay B, Jiménez Heredia R, Erol Cipe F, et al. Extended clinical and immunological phenotype and transplant outcome in CD27 and CD70 deficiency. *Blood.* 3 de diciembre de 2020;136(23):2638-55.
 156. Canna SW, de Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet.* octubre de 2014;46(10):1140-6.
 157. Groarke EM, Young NS, Calvo KR. Distinguishing constitutional from acquired bone marrow failure in the hematology clinic. *Best Pract Res Clin Haematol.* junio de 2021;34(2):101275.
 158. Ottaviano G, Marinoni M, Graziani S, Sibson K, Barzaghi F, Bertolini P, et al. Rituximab Unveils Hypogammaglobulinemia and Immunodeficiency in Children with Autoimmune Cytopenia. *J Allergy Clin Immunol Pract.* enero de 2020;8(1):273-82.
 159. Rosenberg AS, Pariser AR, Diamond B, Yao L, Turka LA, Lacana E, et al. A role for plasma cell targeting agents in immune tolerance induction in autoimmune disease and antibody responses to therapeutic proteins. *Clin Immunol.* abril de 2016;165:55-9.
 160. Christou EAA, Giardino G, Worth A, Ladomenou F. Risk factors predisposing to the development of hypogammaglobulinemia and infections post-Rituximab. *Int Rev Immunol.* 2 de noviembre de 2017;36(6):352-9.
 161. Otani IM, Lehman HK, Jongco AM, Tsao LR, Azar AE, Tarrant TK, et al. Practical guidance for the diagnosis and management of secondary hypogammaglobulinemia: A Work Group Report of the AAAAI Primary Immunodeficiency and Altered Immune Response Committees. *J Allergy Clin Immunol.* mayo de 2022;149(5):1525-60.
 162. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood.* 8 de julio de 2010;116(1):7-15.
 163. Collen LV, Kim DY, Field M, Okoroafor I, Saccocia G, Whitcomb SD, et al. Clinical Phenotypes and Outcomes in Monogenic Versus Non-monogenic Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2 de abril de 2022;jjac045.
 164. Vardi I, Chermesh I, Werner L, Barel O, Freund T, McCourt C, et al. Monogenic Inflammatory Bowel Disease: It's Never Too Late to Make a Diagnosis. *Front Immunol.* 4 de septiembre de 2020;11:1775.
 165. Kelsen J, Dawany N, Conrad M, Patel T, Devoto M, Maurer K, et al. Clinical and laboratory predictors of monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Clin Immunol.* julio de 2022;240:109047.
 166. Roca M, Rodriguez Varela A, Carvajal E, Donat E, Cano F, Armisen A, et al. Fecal

- calprotectin in healthy children aged 4–16 years. *Sci Rep.* diciembre de 2020;10(1):20565.
167. Levine AE, Zheng HB, Suskind DL. Linking Genetic Diagnosis to Therapeutic Approach in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease: Pharmacologic Considerations. *Pediatr Drugs.* mayo de 2022;24(3):207-16.
168. Russo P. Updates in Pediatric Congenital Enteropathies. *Surg Pathol Clin.* diciembre de 2020;13(4):581-600.
169. 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.* enero de 2017;139(1):232-45.
170. Alfayez M, Wang SA, Bannon SA, Kontoyiannis DP, Kornblau SM, Orange JS, et al. Myeloid malignancies with somatic *GATA 2* mutations can be associated with an immunodeficiency phenotype. *Leuk Lymphoma.* 3 de julio de 2019;60(8):2025-33.
171. Zakharova V, Raykina E, Mersyanova I, Deordieva E, Pershin D, Vedmedskia V, et al. Cancer-causing *MAP2K1* mutation in a mosaic patient with cardio-facio-cutaneous syndrome and immunodeficiency. *Hum Mutat.* 2 de septiembre de 2022;humu.24463.
172. Zampella J, Cohen B. Consideration of underlying immunodeficiency in refractory or recalcitrant warts: A review of the literature. *Skin Health Dis [Internet].* marzo de 2022 [citado 4 de septiembre de 2022];2(1). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ski2.98>
173. Leiding JW, Holland SM. Warts and all: Human papillomavirus in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* noviembre de 2012;130(5):1030-48.
174. Leonardi L, Rivalta B, Leone F, Cancrini C, Caffarelli C, Marseglia GL, et al. Host Defenses to Viruses: Lessons from Inborn Errors of Immunity. *Medicina (Mex).* 7 de febrero de 2022;58(2):248.
175. Lino CNR, Ghosh S. Epstein–Barr Virus in Inborn Immunodeficiency—More Than Infection. *Cancers.* 23 de septiembre de 2021;13(19):4752.
176. Leone P, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. Common Variable Immunodeficiency and Gastric Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2 de febrero de 2018;19(2):451.
177. Chandra S, Kalashnikova T, Wright NAM, Dávila Saldaña BJ. Primary Immunodeficiencies and Hematologic Malignancies: A Diagnostic Approach. *Front Immunol.* 18 de marzo de 2022;13:852937.
178. Bresnick EH, Jung MM, Katsumura KR. Human *GATA2* mutations and hematologic disease: how many paths to pathogenesis? *Blood Adv.* 22 de septiembre de 2020;4(18):4584-92.
179. Wong JC, Bryant V, Lamprecht T, Ma J, Walsh M, Schwartz J, et al. Germline *SAMD9* and *SAMD9L* mutations are associated with extensive genetic evolution and diverse hematologic outcomes. *JCI Insight.* 26 de julio de 2018;3(14):e121086.
180. Barmettler S, Sharapova SO, Milota T, Greif PA, Magg T, Hauck F. Genomics Driving Diagnosis and Treatment of Inborn Errors of Immunity With Cancer Predisposition. *J Allergy Clin Immunol Pract.* julio de 2022;10(7):1725-1736.e2.
181. Ben-Ali M, Yang J, Chan KW, Ben-Mustapha I, Mekki N, Benabdesselem C, et al. Homozygous transcription factor 3 gene (*TCF3*) mutation is associated with severe hypogammaglobulinemia and B-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Allergy Clin Immunol.* octubre de 2017;140(4):1191-1194.e4.
182. Pilaian RK, Banday AZ, Sharma S, Kumrah R, Joshi V, Loganathan S, et al. Deficiency of Human Adenosine Deaminase Type 2 – A Diagnostic Conundrum for the Hematologist.

- Front Immunol. 3 de mayo de 2022;13:869570.
183. Guevara-Hoyer K, Fuentes-Antrás J, de la Fuente-Muñoz E, Fernández-Arquero M, Solano F, Pérez-Segura P, et al. Genomic crossroads between non-Hodgkin's lymphoma and common variable immunodeficiency. *Front Immunol.* 5 de agosto de 2022;13:937872.
 184. Jamee M, Moniri S, Zaki-Dizaji M, Olbrich P, Yazdani R, Jadidi-Niaragh F, et al. Clinical, Immunological, and Genetic Features in Patients with Activated PI3K δ Syndrome (APDS): a Systematic Review [Internet]. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31111319>
 185. Urban A, NCI Lymphoma Physicians Consortium, Melani C, Roschewski M, Wilson W, Pittaluga S, et al. Malignancy in STAT3 Deficient Hyper IgE Syndrome. *J Clin Immunol.* abril de 2022;42(3):699-702.
 186. Ye X, Maglione PJ, Wehr C, Li X, Wang Y, Abolhassani H, et al. Genomic characterization of lymphomas in patients with inborn errors of immunity. *Blood Adv.* 10 de junio de 2022;bloodadvances.2021006654.
 187. Wimmer K, Kratz CP, Vasen HFA, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, et al. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'Care for CMMRD' (C4CMMRD). *J Med Genet.* junio de 2014;51(6):355-65.
 188. de la Morena MT, Leonard D, Torgerson TR, Cabral-Marques O, Slatter M, Aghamohammadi A, et al. Long-term outcomes of 176 patients with X-linked hyper-IgM syndrome treated with or without hematopoietic cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol.* abril de 2017;139(4):1282-92.
 189. Kesserwan C, Sokolic R, Cowen EW, Garabedian E, Heselmeyer-Haddad K, Lee CCR, et al. Multicentric dermatofibrosarcoma protuberans in patients with adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* marzo de 2012;129(3):762-769.e1.
 190. Zhang Q, Ju Y, You X, Sun T, Ding Y. Case report: Identification of a novel heterozygous germline ERCC2 mutation in a patient with dermatofibrosarcoma protuberans. *Front Oncol.* 10 de agosto de 2022;12:966020.
 191. Fournier B, Mahlaoui N, Moshous D, de Villartay J. Inborn errors of immunity caused by defects in the DNA damage response pathways: Importance of minimizing treatment-related genotoxicity. *Pediatr Allergy Immunol [Internet].* junio de 2022 [citado 6 de septiembre de 2022];33(6). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pai.13820>
 192. Clarke TL, Mostoslavsky R. DNA repair as a shared hallmark in cancer and ageing. *Mol Oncol.* 28 de julio de 2022;1878-0261.13285.
 193. Chiriaco M, Ursu GM, Amodio D, Cotugno N, Volpi S, Berardinelli F, et al. Radiosensitivity in patients affected by ARPC1B deficiency: a new disease trait? *Front Immunol.* 29 de julio de 2022;13:919237.
 194. Aghamohammadi A, Moin M, Kouhi A, Mohagheghi MA, Shirazi A, Rezaei N, et al. Chromosomal radiosensitivity in patients with common variable immunodeficiency. *Immunobiology.* junio de 2008;213(5):447-54.
 195. Mahmoodi M, Abolhassani H, Mozdarani H, Rezaei N, Azizi G, Yazdani R, et al. In vitro chromosomal radiosensitivity in patients with common variable immunodeficiency. *Cent Eur J Immunol.* 2018;43(2):155-61.
 196. Milito C, Pulvirenti F, Serra G, Valente M, Pesce AM, Granata G, et al. Lung Magnetic Resonance Imaging with Diffusion Weighted Imaging Provides Regional Structural as well as Functional Information Without Radiation Exposure in Primary Antibody Deficiencies. *J Clin*

- Immunol. julio de 2015;35(5):491-500.
197. Sperlich JM, Grimbacher B, Workman S, Haque T, Seneviratne SL, Burns SO, et al. Respiratory Infections and Antibiotic Usage in Common Variable Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract.* enero de 2018;6(1):159-168.e3.
 198. Smits BM, Kleine Budde I, de Vries E, ten Berge IJM, Bredius RGM, van Deuren M, et al. Immunoglobulin Replacement Therapy Versus Antibiotic Prophylaxis as Treatment for Incomplete Primary Antibody Deficiency. *J Clin Immunol.* febrero de 2021;41(2):382-92.
 199. Grammatikos A, Albur M, Gompels M, Barnaby CL, Allan S, Johnston S. Antibiotic prophylaxis for the prevention of respiratory tract infections in antibody deficient patients: A retrospective cohort study. *Clin Infect Pract.* octubre de 2020;7-8:100048.
 200. Caselli D, Petris MG, Rondelli R, Carraro F, Colombini A, Muggeo P, et al. Single-Day Trimethoprim/Sulfamethoxazole Prophylaxis for Pneumocystis Pneumonia in Children with Cancer. *J Pediatr.* febrero de 2014;164(2):389-392.e1.
 201. Sobh A, Bonilla FA. Vaccination in Primary Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* noviembre de 2016;4(6):1066-75.
 202. Cetin Gedik K, Lamot L, Romano M, Demirkaya E, Piskin D, Torreggiani S, et al. The 2021 European Alliance of Associations for Rheumatology/American College of Rheumatology points to consider for diagnosis and management of autoinflammatory type I interferonopathies: CANDLE/PRAAS, SAVI and AGS. *Ann Rheum Dis.* mayo de 2022;81(5):601-13.
 203. Klemann C, Esquivel M, Magerus-Chatinet A, Lorenz MR, Fuchs I, Neveux N, et al. Evolution of disease activity and biomarkers on and off rapamycin in 28 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Haematologica.* febrero de 2017;102(2):e52-6.
 204. Leiding JW, Vogel TP, Santarlas VGJ, Mhaskar R, Smith MR, Carisey A, et al. Monogenic Early-Onset Lymphoproliferation and Autoimmunity: The Natural History of STAT3 GOF Syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* octubre de 2022;S0091674922011824.
 205. Stevens E, Weinblatt ME, Massarotti E, Griffin F, Emani S, Desai S. Safety of the Zoster Vaccine Recombinant Adjuvanted in Rheumatoid Arthritis and Other Systemic Rheumatic Disease Patients: A Single Center's Experience With 400 Patients. *ACR Open Rheumatol.* junio de 2020;2(6):357-61.
 206. van Assen S, Holvast A, Telgt DSC, Benne CA, de Haan A, Westra J, et al. Patients with humoral primary immunodeficiency do not develop protective anti-influenza antibody titers after vaccination with trivalent subunit influenza vaccine. *Clin Immunol.* agosto de 2010;136(2):228-35.
 207. Gernez Y, Baker MG, Maglione PJ. Humoral immunodeficiencies: conferred risk of infections and benefits of immunoglobulin replacement therapy. *Transfusion (Paris).* diciembre de 2018;58(S3):3056-64.
 208. BRUTON OC. Agammaglobulinemia. Vol. 9, *Pediatrics.* 1952. p. 722-8.
 209. Wasserman RL. Immunoglobulin replacement for primary immunodeficiency: Indications for initiating and continuing treatment. *Allergy Asthma Proc.* 1 de noviembre de 2021;42(6):489-94.
 210. Rojavin MA, Hubsch A, Lawo JP. Quantitative Evidence of Wear-Off Effect at the End of the Intravenous IgG (IVIG) Dosing Cycle in Primary Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* abril de 2016;36(3):210-9.
 211. Guo Y, Tian X, Wang X, Xiao Z. Adverse Effects of Immunoglobulin Therapy. *Front Immunol.* 8 de junio de 2018;9:1299.

212. Mustafa SS, Rider NL, Jolles S. Immunosuppression in patients with primary immunodeficiency – Walking the Line. *J Allergy Clin Immunol Pract.* agosto de 2022;S2213219822008601.
213. Ameratunga R, Storey P, Barker R, Jordan A, Koopmans W, Woon ST. Application of diagnostic and treatment criteria for common variable immunodeficiency disorder. *Expert Rev Clin Immunol.* 3 de marzo de 2016;12(3):257-66.
214. Orange JS, Grossman WJ, Navickis RJ, Wilkes MM. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies. *Clin Immunol.* octubre de 2010;137(1):21-30.
215. Tucci F, Galimberti S, Naldini L, Valsecchi MG, Aiuti A. A systematic review and meta-analysis of gene therapy with hematopoietic stem and progenitor cells for monogenic disorders. Vol. 13, *Nat Commun.* 2022. p. 1315.
216. Castagnoli R, Delmonte OM, Calzoni E, Notarangelo LD. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Primary Immunodeficiency Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Front Pediatr.* 8 de agosto de 2019;7:295.
217. Fekrvand S, Delavari S, Chavoshzadeh Z, Sherkat R, Mahdavian SA, Sadeghi Shabestari M, et al. The First Iranian Cohort of Pediatric Patients with Activated Phosphoinositide 3-Kinase- δ (PI3K δ) Syndrome (APDS). *Immunol Invest.* 3 de abril de 2022;51(3):644-59.
218. Conti F, Catelli A, Cifaldi C, Leonardi L, Mulè R, Fusconi M, et al. Case Report: Hodgkin Lymphoma and Refractory Systemic Lupus Erythematosus Unveil Activated Phosphoinositide 3-Kinase- δ Syndrome 2 in an Adult Patient. *Front Pediatr.* 8 de julio de 2021;9:702546.
219. Diaz N, Juarez M, Cancrini C, Heeg M, Soler-Palacín P, Payne A, et al. Seletalisib for Activated PI3K δ Syndromes: Open-Label Phase 1b and Extension Studies. *J Immunol.* 1 de diciembre de 2020;205(11):2979-87.
220. Sun B, Zhou S, Yang H, Zhou J, Leng X, Zhang W, et al. Case Report: Tofacitinib as a possible treatment for arthritis in an APDS2 patient. *Rheumatology.* 29 de julio de 2022;keac436.
221. 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.* enero de 2022;149(1):410-421.e7.
222. Inglés-Ferrándiz M, Martín-Inaraja M, Herrera L, Villaverde M, Santos S, Vesga MA, et al. Generation, establishment and characterization of a pluripotent stem cell line (CVTTHi001-A) from primary fibroblasts isolated from a patient with activated PI3 kinase delta syndrome (APDS2). *Stem Cell Res.* diciembre de 2020;49:102082.
223. Hargreaves CE, Dhalla F, Patel AM, de Oteyza ACG, Bateman E, Miller J, et al. Resolving the polygenic aetiology of a late onset combined immune deficiency caused by NFKB1 haploinsufficiency and modified by PIK3R1 and TNFRSF13B variants. *Clin Immunol.* enero de 2022;234:108910.
224. Li J, Lei WT, 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.* 1 de noviembre de 2021;218(11):e20210566.
225. Jamee M, Khakbazan Fard N, Fallah S, Golchehre Z, Fallahi M, Shamsian BS, et al. Cernunnos defect in an Iranian patient with T⁻ B⁺ NK⁺ severe combined immunodeficiency: A case report and review of the literature. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. agosto de 2022 [citado 3 de octubre de 2022];10(8). Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.1990>

226. Frizinsky S, Rechavi E, Barel O, Lee YN, Simon AJ, Lev A, et al. Novel NHEJ1 pathogenic variant linked to severe combined immunodeficiency, microcephaly, and abnormal T and B cell receptor repertoires. *Front Pediatr.* 27 de julio de 2022;10:883173.
227. Poyer F, Jimenez Heredia R, Novak W, Zeitlhofer P, Nebral K, Dworzak MN, et al. Case Report: Refractory Cytopenia With a Switch From a Transient Monosomy 7 to a Disease-Ameliorating del(20q) in a NHEJ1-Deficient Long-term Survivor. *Front Immunol.* 24 de junio de 2022;13:869047.
228. Felgentreff K, Baumann U, Klemann C, Schuetz C, Viemann D, Wetzke M, et al. Biomarkers of DNA Damage Response Enable Flow Cytometry-Based Diagnostic to Identify Inborn DNA Repair Defects in Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* febrero de 2022;42(2):286-98.
229. Kelm JM, Samarbakhsh A, Pillai A, VanderVere-Carozza PS, Aruri H, Pandey DS, et al. Recent Advances in the Development of Non-PIKKs Targeting Small Molecule Inhibitors of DNA Double-Strand Break Repair. *Front Oncol.* 6 de abril de 2022;12:850883.
230. Lankester AC, Albert MH, Booth C, Gennery AR, Güngör T, Hönig M, et al. EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity. *Bone Marrow Transplant.* septiembre de 2021;56(9):2052-62.
231. Perez E. Future of Therapy for Inborn Errors of Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* agosto de 2022;63(1):75-89.
232. Sheikhabaei S, Sherkat R, Camacho-Ordonez N, Khoshnevisan R, Kalantari A, Salehi M, et al. Pregnancy, child bearing and prevention of giving birth to the affected children in patients with primary immunodeficiency disease; a case-series. *BMC Pregnancy Childbirth.* diciembre de 2018;18(1):299.
233. Tousif S, Singh DK, Ahmad S, Moodley P, Bhattacharyya M, Van Kaer L, et al. Isoniazid Induces Apoptosis Of Activated CD4+ T Cells. *J Biol Chem.* octubre de 2014;289(44):30190-5.
234. Li X, McKinstry KK, Swain SL, Dalton DK. IFN- γ Acts Directly on Activated CD4⁺ T Cells during Mycobacterial Infection to Promote Apoptosis by Inducing Components of the Intracellular Apoptosis Machinery and by Inducing Extracellular Proapoptotic Signals. *J Immunol.* 15 de julio de 2007;179(2):939-49.
235. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Vol. 3, *Nat Rev Genet.* 2002. p. 285-98.
236. Platt CD, Massaad MJ, Cangemi B, Schmidt B, Aldhekri H, Geha RS. Janus kinase 3 deficiency caused by a homozygous synonymous exonic mutation that creates a dominant splice site. Vol. 140, *J Allergy Clin Immunol.* 2017. p. 268-271.e6.
237. Fliegau M, Kinnunen M, Posadas-Cantera S, Camacho-Ordonez N, Abolhassani H, Alsina L, et al. Detrimental NFKB1 missense variants affecting the Rel-homology domain of p105/p50. *Front Immunol.* 29 de agosto de 2022;13:965326.
238. Kaustio M, Haapaniemi E, Göös H, Hautala T, Park G, Syrjänen J, et al. Damaging heterozygous mutations in NFKB1 lead to diverse immunologic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* septiembre de 2017;140(3):782-96.
239. Vera G, Rivera-Munoz P, Abramowski V, Malivert L, Lim A, Bole-Feysot C, et al. Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans. *Mol Cell Biol.* febrero de 2013;33(4):701-11.

240. Esmaeilzadeh H, Bordbar MR, Hojaji Z, Habibzadeh P, Afshinfar D, Miryounesi M, et al. An immunocompetent patient with a nonsense mutation in NHEJ1 gene. *BMC Med Genet*. 21 de marzo de 2019;20(1):45.
241. Roch B, Abramowski V, Chaumeil J, de Villartay JP. Cernunnos/Xlf Deficiency Results in Suboptimal V(D)J Recombination and Impaired Lymphoid Development in Mice. Vol. 10, *Front Immunol*. 2019. p. 443.
242. Suzuki H, Terauchi Y, Fujiwara M, Aizawa S, Yazaki Y, Kadowaki T, et al. *Xid*-Like Immunodeficiency in Mice with Disruption of the p85 α Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase. *Science*. 15 de enero de 1999;283(5400):390-2.
243. Cottrell CE, Bender NR, Zimmermann MT, Heusel JW, Corliss M, Evenson MJ, et al. Somatic PIK3R1 variation as a cause of vascular malformations and overgrowth. *Genet Med*. octubre de 2021;23(10):1882-8.
244. Dymont DA, Smith AC, Alcantara D, Schwartzentruber JA, Basel-Vanagaite L, Curry CJ, et al. Mutations in PIK3R1 Cause SHORT Syndrome. *Am J Hum Genet*. julio de 2013;93(1):158-66.
245. Goncalves MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. *N Engl J Med*. 22 de noviembre de 2018;379(21):2052-62.
246. Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR. Molecular Balance between the Regulatory and Catalytic Subunits of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cell Signaling and Survival. *Mol Cell Biol*. febrero de 2002;22(3):965-77.
247. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3K δ and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*. noviembre de 2016;16(11):702-14.
248. Mandola AB, Sharfe N, Nagdi Z, Dadi H, Vong L, Merico D, et al. Combined immunodeficiency caused by a novel homozygous NFKB1 mutation. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2021;147(2):727-733.e2.
249. Garkaby J, Ngan B. Homozygous NF- κ B1 mutation causing combined immunodeficiency: a histopathological analysis. *LymphoSign J*. 1 de marzo de 2021;8(1):11-8.
250. Pescatore A, Spinosa E, Casale C, Lioi MB, Ursini MV, Fusco F. Human Genetic Diseases Linked to the Absence of NEMO: An Obligatory Somatic Mosaic Disorder in Male. *Int J Mol Sci*. 21 de enero de 2022;23(3):1179.
251. Courtois G, Smahi A. NF- κ B-related genetic diseases. *Cell Death Differ*. mayo de 2006;13(5):843-51.
252. Dutrannoy V, Demuth I, Baumann U, Schindler D, Konrat K, Neitzel H, et al. Clinical variability and novel mutations in the NHEJ1 gene in patients with a Nijmegen breakage syndrome-like phenotype. *Hum Mutat*. septiembre de 2010;31(9):1059-68.
253. Çağdaş D, Özgür TT, Asal GT, Revy P, De Villartay JP, van der Burg M, et al. Two SCID cases with Cernunnos-XLF deficiency successfully treated by hematopoietic stem cell transplantation: Two SCID cases with Cernunnos-XLF deficiency. *Pediatr Transplant*. agosto de 2012;16(5):E167-71.
254. 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*. 1 de octubre de 2019;10:2325.
255. Martínez-Cano J, Campos-Sánchez E, Cobaleda C. Epigenetic Priming in Immunodeficiencies. *Front Cell Dev Biol*. 10 de julio de 2019;7:125.

256. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions Between CD8+ and CD4+ T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy. *Blood*. 15 de mayo de 1997;89(10):3700-7.
257. Kang DH, Weaver MT, Park NJ, Smith B, McArdle T, Carpenter J. Significant Impairment in Immune Recovery After Cancer Treatment. *Nurs Res*. marzo de 2009;58(2):105-14.
258. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. noviembre de 2020;20(11):651-68.
259. Chawla S, Barman P, Tyagi R, Jindal AK, Sharma S, Rawat A, et al. Autoimmune Cytopenias in Common Variable Immunodeficiency Are a Diagnostic and Therapeutic Conundrum: An Update. *Front Immunol*. 20 de junio de 2022;13:869466.
260. Ma J, Fu L, Gu H, Chen Z, Zhang J, Zhao S, et al. Screening for Genetic Mutations for the Early Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency in Children With Refractory Immune Thrombocytopenia: A Retrospective Data Analysis From a Tertiary Children's Center. *Front Pediatr*. 3 de diciembre de 2020;8:595135.
261. Kirk SE, Grimes AB, Shelke S, Despotovic JM, Powers JM. The cost of a "benign" condition: Healthcare utilization and infectious outcomes in young children with primary autoimmune neutropenia. *Pediatr Blood Cancer [Internet]*. abril de 2020 [citado 28 de agosto de 2022];67(4). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.28146>
262. Schworer SA, Francis OL, Johnson SM, Smith BD, Gold SH, Smitherman AB, et al. Autoimmune Cytopenia as an Early and Initial Presenting Manifestation in Activated PI3 Kinase Delta Syndrome: Case Report and Review. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1 de noviembre de 2021;43(8):281-7.
263. Al Masalma M, Armougom F, Scheld WM, Dufour H, Roche P, Drancourt M, et al. The Expansion of the Microbiological Spectrum of Brain Abscesses with Use of Multiple 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Clin Infect Dis*. mayo de 2009;48(9):1169-78.
264. Arabatzis M, Velegraki A. Evidence for the presence of a human saprophytic oral bacterium, *Mycoplasma faucium*, in the skin lesions of a psoriatic patient. *J Cutan Pathol*. mayo de 2022;49(5):463-7.
265. Rothman R, Saini V, Min Z, Bhanot N. Brain abscess associated with *Mycoplasma faucium* – The initial presentation of pulmonary arteriovenous malformation. *IDCases*. 2022;29:e01575.
266. Mahmood M, Ajmal S, Abu Saleh OM, Bryson A, Marcelin JR, Wilson JW. *Mycobacterium genavense* infections in non-HIV immunocompromised hosts: a systematic review. Vol. 50, *Infect Dis (Lond)*. 2018. p. 329-39.
267. Chen J, Nguyen M, Cheong E, Sean Riminton D, Reddel S. Refractory *Mycobacterium genavense* infection secondary to thymoma-associated endogenous IL-12 inhibitor. *BMJ Neurol Open*. mayo de 2022;4(1):e000285.
268. Grunebaum E, Reid B, Naqvi A, Hershfield MS, Kim VHD, Muller MP, et al. Morbidity in an adenosine deaminase-deficient patient during 27 years of enzyme replacement therapy. *Clin Immunol*. febrero de 2020;211:108321.
269. Thomsen VØ, Dragsted UB, Bauer J, Fuursted K, Lundgren J. Disseminated Infection with *Mycobacterium genavense*: a Challenge to Physicians and Mycobacteriologists. *J Clin Microbiol*. diciembre de 1999;37(12):3901-5.
270. Foy HM, Oehs H, Davis SD, Kenny GE, Luee RR. *Mycoplasma pneumoniae* Infections

- in Patients with Immunodeficiency Syndromes: Report of Four Cases. *J Infect Dis.* 1 de abril de 1973;127(4):388-93.
271. Poddighe D, Demirkaya E, Sazonov V, Romano M. *Mycoplasma pneumoniae* Infections and Primary Immune Deficiencies. Zhang K, editor. *Int J Clin Pract.* 8 de julio de 2022;2022:1-6.
272. Taylor-Robinson D. The use of organ cultures and animal models in the study of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Infection.* marzo de 1976;4(S1):S4-8.
273. Tang W, Zhang Y, Luo C, Zhou L, Zhang Z, Tang X, et al. Clinical Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Suspected Infections in Patients With Primary Immunodeficiency Disease. *Front Immunol.* 13 de agosto de 2021;12:696403.
274. Abraham RS, Butte MJ. The New “Wholly Trinity” in the Diagnosis and Management of Inborn Errors of Immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract.* febrero de 2021;9(2):613-25.
275. Chandesris MO, Melki I, Natividad A, Puel A, Fieschi C, Yun L, et al. Autosomal Dominant STAT3 Deficiency and Hyper-IgE Syndrome: Molecular, Cellular, and Clinical Features From a French National Survey. *Medicine (Baltimore).* julio de 2012;91(4):e1-19.
276. Romo-Gonzalez C, Bustamante-Ogando JC, Yamazaki-Nakashimada MA, Aviles-Jimenez F, Otero-Mendoza F, Espinosa-Rosales FJ, et al. Infections With Enterohepatic Non-*H. pylori* Helicobacter Species in X-Linked Agammaglobulinemia: Clinical Cases and Review of the Literature. *Front Cell Infect Microbiol.* 4 de febrero de 2022;11:807136.
277. Cuccherini B, Chua K, Gill V, Weir S, Wray B, Stewart D, et al. Bacteremia and Skin/Bone Infections in Two Patients with X-Linked Agammaglobulinemia Caused by an Unusual Organism Related to *Flexispira*/Helicobacter Species. *Clin Immunol.* noviembre de 2000;97(2):121-9.
278. Etienne N, Bret L, Le Brun C, Lecuyer H, Moraly J, Lanternier F, et al. Disseminated *Spiroplasma apis* Infection in Patient with Agammaglobulinemia, France. *Emerg Infect Dis.* diciembre de 2018;24(12):2382-6.
279. Bearden D, Collett M, Quan PL, Costa-Carvalho BT, Sullivan KE. Enteroviruses in X-Linked Agammaglobulinemia: Update on Epidemiology and Therapy*. *J Allergy Clin Immunol Pract.* noviembre de 2016;4(6):1059-65.
280. Chetty K, Cheng I, Kaliakatsos M, Gonzalez-Granado LI, Klapsa D, Martin J, et al. Case report: Novel treatment regimen for enterovirus encephalitis in SCID. *Front Immunol.* 13 de septiembre de 2022;13:930031.
281. Greenberg DE, Ding L, Zelazny AM, Stock F, Wong A, Anderson VL, et al. A Novel Bacterium Associated with Lymphadenitis in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. Cossart P, editor. *PLoS Pathog.* 14 de abril de 2006;2(4):e28.
282. Yang CH, Li YH. Chromobacterium violaceum infection: A clinical review of an important but neglected infection. *J Chin Med Assoc.* octubre de 2011;74(10):435-41.
283. van den Brink MRM, Velardi E, Perales MA. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology.* 5 de diciembre de 2015;2015(1):215-9.
284. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Immune Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* abril de 2014;20(4):440-9.
285. Ravkov E, Slev P, Heikal N. Thymic output: Assessment of CD4⁺ recent thymic emigrants and T-Cell receptor excision circles in infants: THYMIC OUTPUT. *Cytometry B Clin Cytom.* julio de 2017;92(4):249-57.
286. Carrillo J, Calvete O, Pintado-Berninches L, Manguan-García C, Sevilla Navarro J,

- Arias-Salgado EG, et al. Mutations in XLF/NHEJ1/Cernunnos gene results in downregulation of telomerase genes expression and telomere shortening. *Hum Mol Genet.* 15 de mayo de 2017;26(10):1900-14.
287. Rivera-Munoz P, Malivert L, Derdouch S, Azerrad C, Abramowski V, Revy P, et al. DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *Eur J Immunol.* noviembre de 2007;37(S1):S71-82.
288. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:645593.
289. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, et al. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study. Vol. 138, *J Allergy Clin Immunol.* 2016. p. 210-218.e9.
290. Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Sreaton N, et al. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome: A large patient cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2017;139(2):597-606.e4.
291. Zhang L, Zhao J, Mu X, McGowan SJ, Angelini L, O'Kelly RD, et al. Novel small molecule inhibition of IKK/NF- κ B activation reduces markers of senescence and improves healthspan in mouse models of aging. *Aging Cell [Internet].* diciembre de 2021 [citado 17 de agosto de 2022];20(12). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ace1.13486>
292. Patrick K, Vora A. Update on biology and treatment of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Curr Opin Pediatr.* febrero de 2015;27(1):44-9.
293. Simko SJ, Tran HD, Jones J, Bilgi M, Beaupin LK, Coulter D, et al. Clofarabine salvage therapy in refractory multifocal histiocytic disorders, including Langerhans cell histiocytosis, juvenile xanthogranuloma and Rosai-Dorfman disease: Clofarabine Salvage in Histiocytic Disorders. *Pediatr Blood Cancer.* marzo de 2014;61(3):479-87.
294. Epperly R, Talleur AC, Li Y, Schell S, Tuggle M, Métais JY, et al. Sub-myeloablative Second Transplantations with Haploidentical Donors and Post-Transplant Cyclophosphamide have limited Anti-Leukemic Effects in Pediatric Patients. *Transplant Cell Ther.* mayo de 2022;28(5):262.e1-262.e10.
295. Tran G, Huynh TN, Paller AS. Langerhans cell histiocytosis: A neoplastic disorder driven by Ras-ERK pathway mutations. *J Am Acad Dermatol.* marzo de 2018;78(3):579-590.e4.
296. Qiu L, Wang Y, Tang W, Yang Q, Zeng T, Chen J, et al. Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome: a Large Pediatric Cohort from a Single Center in China. *J Clin Immunol.* mayo de 2022;42(4):837-50.
297. Oh J, Garabedian E, Fuleihan R, Cunningham-Rundles C. Clinical Manifestations and Outcomes of Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome from the USIDNET Cohort. *J Allergy Clin Immunol Pract.* noviembre de 2021;9(11):4095-102.
298. Alkhatib A, Werner M, Hug E, Herzog S, Eschbach C, Faraidun H, et al. FoxO1 induces Ikaros splicing to promote immunoglobulin gene recombination. *J Exp Med.* 13 de febrero de 2012;209(2):395-406.
299. Dengler HS, Baracho GV, Omori SA, Bruckner S, Arden KC, Castrillon DH, et al. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol.* diciembre de 2008;9(12):1388-98.
300. Shojaee S, Chan LN, Buchner M, Cazzaniga V, Cosgun KN, Geng H, et al. PTEN opposes negative selection and enables oncogenic transformation of pre-B cells. *Nat Med.*

abril de 2016;22(4):379-87.

301. Lescale C, Abramowski V, Bedora-Faure M, Murigneux V, Vera G, Roth DB, et al. RAG2 and XLF/Cernunnos interplay reveals a novel role for the RAG complex in DNA repair. *Nat Commun.* abril de 2016;7(1):10529.
302. Walker LSK. The link between circulating follicular helper T cells and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 11 de marzo de 2022 [citado 20 de agosto de 2022]; Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41577-022-00693-5>
303. Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, et al. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+ T cells into distinct effector subsets. *J Exp Med.* 25 de julio de 2016;213(8):1589-608.
304. Cicalese MP, Salek-Ardakani S, Fousteri G. Editorial: Follicular Helper T Cells in Immunity and Autoimmunity. *Front Immunol.* 29 de mayo de 2020;11:1042.
305. Provine NM, Klenerman P. MAIT Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 26 de abril de 2020;38(1):203-28.
306. Paquin-Proulx D, Santos BAN, Barsotti NS, Marinho AKBB, Kokron CM, Carvalho KI, et al. Loss of Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells in Common Variable Immunodeficiency Is Associated with Immune Activation and Loss of Eomes and PLZF. *ImmunoHorizons.* 1 de septiembre de 2017;1(7):142-55.
307. Gao Y, Rae W, Ramakrishnan KA, Barcenás-Morales G, Döffinger R, Eren E, et al. Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells Are Impaired in Th17 Associated Primary and Secondary Immunodeficiencies. Sandberg JK, editor. *PLOS ONE.* 11 de mayo de 2016;11(5):e0155059.
308. Hetemäki I, Kaustio M, Kinnunen M, Heikkilä N, Keskitalo S, Miettinen S, et al. Loss-of-function mutation in *IKZF2* leads to immunodeficiency with dysregulated germinal center reactions and reduction of MAIT cells [Internet]. *Allergy and Immunology*; 2021 ago [citado 2 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.08.25.21262015>
309. Avery DT, Kane A, Nguyen T, Lau A, Nguyen A, Lenthall H, et al. Germline-activating mutations in PIK3CD compromise B cell development and function. *J Exp Med.* 6 de agosto de 2018;215(8):2073-95.
310. Keles S, Charbonnier LM, Kabaleeswaran V, Reisli I, Genel F, Gulez N, et al. Deducator of cytokinesis 8 regulates signal transducer and activator of transcription 3 activation and promotes TH17 cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol.* noviembre de 2016;138(5):1384-1394.e2.
311. Klinken EM, Gray PE, Pillay B, Worley L, Edwards ESJ, Payne K, et al. Diversity of XMEN Disease: Description of 2 Novel Variants and Analysis of the Lymphocyte Phenotype. *J Clin Immunol.* febrero de 2020;40(2):299-309.
312. Wang Y, Ma CS, Ling Y, Bousfiha A, Camcioglu Y, Jacquot S, et al. Dual T cell- and B cell-intrinsic deficiency in humans with biallelic RLTPR mutations. *J Exp Med.* 17 de octubre de 2016;213(11):2413-35.
313. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, et al. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic *RORC* mutations. *Science.* 7 de agosto de 2015;349(6248):606-13.
314. Liu J, Brutkiewicz RR. The Toll-like receptor 9 signalling pathway regulates MR1-mediated bacterial antigen presentation in B cells. *Immunology.* octubre de 2017;152(2):232-42.

315. Martínez-Barricarte R, Markle JG, Ma CS, Deenick EK, Ramírez-Alejo N, Mele F, et al. Human IFN- γ immunity to mycobacteria is governed by both IL-12 and IL-23. *Sci Immunol*. 14 de diciembre de 2018;3(30):eaau6759.
316. 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. p. 2537-47.
317. Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, et al. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun*. septiembre de 2014;5(1):4172.
318. Thierry GR, Kuka M, De Giovanni M, Mondor I, Brouilly N, Iannaccone M, et al. The conduit system exports locally secreted IgM from lymph nodes. *J Exp Med*. 3 de diciembre de 2018;215(12):2972-83.
319. Bhattacharya D, Lee DU, Sha WC. Regulation of Ig class switch recombination by NF- κ B: retroviral expression of RelB in activated B cells inhibits switching to IgG1, but not to IgE. *Int Immunol*. septiembre de 2002;14(9):983-91.
320. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. junio de 2008;8(6):421-34.
321. Schipp C, Nabhani S, Bienemann K, Simanovsky N, Kfir-Erenfeld S, Assayag-Asherie N, et al. Specific antibody deficiency and autoinflammatory disease extend the clinical and immunological spectrum of heterozygous NFKB1 loss-of-function mutations in humans. *Haematologica*. 1 de octubre de 2016;101(10):e392-6.
322. Péron S, Pan-Hammarström Q, Imai K, Du L, Taubenheim N, Sanal O, et al. A primary immunodeficiency characterized by defective immunoglobulin class switch recombination and impaired DNA repair. *J Exp Med*. 14 de mayo de 2007;204(5):1207-16.
323. Kotnis A, Du L, Liu C, Popov SW, Pan-Hammarström Q. Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 12 de marzo de 2009;364(1517):653-65.
324. Saha T, Sundaravinayagam D, Di Virgilio M. Charting a DNA Repair Roadmap for Immunoglobulin Class Switch Recombination. *Trends Biochem Sci*. marzo de 2021;46(3):184-99.
325. Wang W, Min Q, Lai N, Csomos K, Wang Y, Liu L, et al. Cellular Mechanisms Underlying B Cell Abnormalities in Patients With Gain-of-Function Mutations in the PIK3CD Gene. *Front Immunol*. 21 de junio de 2022;13:890073.
326. Gallo V, Cirillo E, Prencipe R, Lepore A, Del Vecchio L, Scalia G, et al. Clinical, Immunological, and Functional Characterization of Six Patients with Very High IgM Levels. *J Clin Med*. 17 de marzo de 2020;9(3):818.
327. Chou J, Hanna-Wakim R, Tirosh I, Kane J, Fraulino D, Lee YN, et al. A novel homozygous mutation in recombination activating gene 2 in 2 relatives with different clinical phenotypes: Omenn syndrome and hyper-IgM syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. diciembre de 2012;130(6):1414-6.
328. Chang AD, Tachdjian R, Gallagher K, McCurdy DK, Lassman C, Stiehm ER, et al. Type III Mixed Cryoglobulinemia and Antiphospholipid Syndrome in a Patient With Partial DiGeorge Syndrome. *Clin Dev Immunol*. 2006;13(2-4):261-4.
329. Montin D, Marolda A, Licciardi F, Robasto F, Di Cesare S, Ricotti E, et al. Immunophenotype Anomalies Predict the Development of Autoimmune Cytopenia in 22q11.2 Deletion Syndrome. *J Allergy Clin Immunol Pract*. septiembre de 2019;7(7):2369-76.

330. Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, Bosompem A, Wang YD, Coustan-Smith E, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85 α subunit of PI3K. *J Exp Med*. 12 de marzo de 2012;209(3):463-70.
331. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet*. junio de 2019;20(6):341-55.
332. de Jesus AA, Hou Y, Brooks S, Malle L, Biancotto A, Huang Y, et al. Distinct interferon signatures and cytokine patterns define additional systemic autoinflammatory diseases. *J Clin Invest*. 24 de febrero de 2020;130(4):1669-82.
333. Berger K, Arafat D, Chandrakasan S, Snapper SB, Gibson G. Targeted RNAseq Improves Clinical Diagnosis of Very Early-Onset Pediatric Immune Dysregulation. *J Pers Med*. 1 de junio de 2022;12(6):919.
334. Wetzstein N, Kessel J, Bingold TM, Carney J, Graf C, Koch BF, et al. High overall mortality of Mycobacterium genavense infections and impact of antimycobacterial therapy: Systematic review and individual patient data meta-analysis. *J Infect*. enero de 2022;84(1):8-16.
335. 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*. abril de 2015;135(4):988-997.e6.
336. Compagno M, Wang Q, Pighi C, Cheong TC, Meng FL, Poggio T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase δ blockade increases genomic instability in B cells. Vol. 542, *Nature*. 2017. p. 489-93.
337. Yagasaki H, Hirai M, Kanezawa K, Ueno M, Hao H, Masuda S, et al. Successful treatment for diffuse large B-cell lymphoma in a Japanese adolescent with PIK3CD germ-line mutation: stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning. *Ann Hematol*. julio de 2022;101(7):1617-9.
338. Volk T, Warnatz K, Marks R, Urbach H, Schluh G, Strohmeier V, et al. Pembrolizumab for treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy in primary immunodeficiency and/or hematologic malignancy: a case series of five patients. *J Neurol*. febrero de 2022;269(2):973-81.
339. Wentink MWJ, Mueller YM, Dalm VASH, Driessen GJ, van Hagen PM, van Montfrans JM, et al. Exhaustion of the CD8+ T Cell Compartment in Patients with Mutations in Phosphoinositide 3-Kinase Delta. *Front Immunol*. 2018;9:446.
340. Klocperk A, Unger S, Friedmann D, Seidl M, Zoldan K, Pfeiffer J, et al. Exhausted phenotype of follicular CD8 T cells in COVID. *J Allergy Clin Immunol*. octubre de 2020;146(4):912-915.e13.
341. Kumar R, Chan A, Bandikatla S, Ranjan S, Ngo P. Safety of immune checkpoint inhibitors in patients with preexisting autoimmune disorders. *Curr Probl Cancer*. agosto de 2022;46(4):100864.
342. Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Gerner MY, Casazza JP, Pegu A, Deleage C, et al. Follicular CD8 T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies. *Sci Transl Med*. 18 de enero de 2017;9(373):eaag2285.
343. Tak Manesh A, Azizi G, Heydari A, Kiaee F, Shaghghi M, Hossein-Khannazer N, et al. Epidemiology and pathophysiology of malignancy in common variable immunodeficiency? *Allergol Immunopathol (Madr)*. diciembre de 2017;45(6):602-15.