



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN IL-21/STAT3 MEDIANTE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA STAT3 EN PACIENTE MEXICANOS CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**HAYDEÉ MARGARITA RAQUEL**

**HUERTA ROBLES**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**LAURA BERRÓN RUÍZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

**VOCAL: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**

**SECRETARIO: LAURA BERRÓN RUÍZ**

**1er. SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARIN**

**2° SUPLENTE: ALBERTO GARCÍA LOZANO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNODEFICIENCIAS, TORRE DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP)**

**ASESOR DEL TEMA**

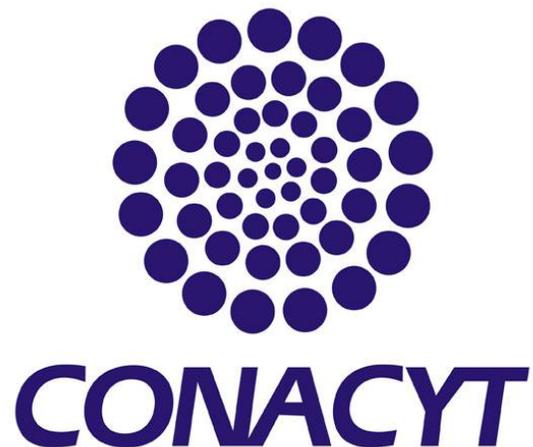
**DRA. LAURA BERRÓN RUÍZ**

**SUSTENTANTE**

**HAYDEÉ MARGARITA RAQUEL HUERTA ROBLES**

Este proyecto se realizó en la Unidad de Investigación en  
Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

Con financiamiento de CONACyT bajo el registro de proyecto  
BASICA-2015-0256471.



# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABLAS.....	4
LISTA DE ECUACIONES .....	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
Sistema Inmunológico .....	8
Inmunodeficiencias .....	9
Inmunodeficiencias primarias.....	9
Desórdenes predominantemente de anticuerpos.....	11
Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV). .....	13
Cuadro clínico .....	13
Epidemiología.....	14
Células B .....	18
Desarrollo de la célula B. ....	18
Clasificación de pacientes con IDCV según su población de células B .....	20
Interleucina 21 (IL-21). ....	21
Proteínas JAK (JAK3). ....	23
Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STAT´S).....	24
Proteína STAT3.....	24
Vía de señalización IL-21/STAT3 .....	25
Mutaciones en STAT3.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS .....	30
OBJETIVO GENERAL .....	30
OBJETIVOS PARTICULARES .....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
Reactivos.....	31

Equipos.....	32
Software.....	33
Características de la población a estudiar.....	33
Criterios de inclusión.....	33
Criterios de exclusión. ....	33
Recolección de muestras sanguíneas.....	33
Determinación de subpoblaciones leucocitarias.....	34
Conteo de leucocitos totales.....	35
Obtención de células PBMCS.....	35
Activación de la fosforilación de STAT3.....	36
RESULTADOS y ANÁLISIS.....	40
Características clínicas de los pacientes con IDCV .....	40
Análisis de gráficos de puntos para las poblaciones leucocitarias.....	43
Análisis de las poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y células NK. ....	45
Análisis de subpoblaciones de células B. ....	52
Análisis estadístico de subpoblaciones de células B.....	57
Resultados del análisis funcional de pSTAT3. ....	62
DISCUSIÓN .....	75
CONCLUSIONES.....	82
PERSPECTIVAS.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83
ANEXOS.....	88
1. Valores de referencia .....	88
2. Citometría de flujo .....	91
3. Preparación de reactivos.....	93
4. Foros de participación.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS.

**Ab:** Anticuerpo.

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico, siglas en inglés *DNA*.

**AHA:** Anemia hemolítica autoinmune.

**APC:** Aloficocianina.

**CMV:** Citomegalovirus.

**EBV:** Virus de Epstein-Barr, siglas en inglés *Epstein-Barr Virus*.

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.

**IDCV:** Inmunodeficiencia Común Variable, siglas en inglés *Commun Variable Innmunodeficiency (CVID)*.

**IDP:** Inmunodeficiencias Primarias.

**IL-21:** Interleucina-21.

**IL-21r:** Interleucina-21 recombinante.

**IMF:** Intensidad Media de Fluorescencia.

**IVRS:** Infecciones en vías respiratorias superiores.

**IVU:** Infecciones en vías urinarias.

**Kb:** Kilobase.

**KDa:** Kilodaltones.

**L:** Linfocitos.

**LASID:** Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias, siglas de inglés: *Latin America Society of Immunodeficiency*.

**LT:** Leucocitos totales.

**mAb:** Anticuerpo monoclonal, siglas en inglés *monoclonal antibody*.

**MO:** Monocitos.

**ng:** nanogramo.

**PBA:** Agente bloqueante de proteína, siglas en inglés *Protein Blocking Agent*.

**PBMCS:** Células mononucleares de sangre periférica, siglas en inglés *peripheral blood mononuclear cells*.

**PBS:** Buffer fosfato salino, siglas en inglés *Phosphate-Buffered Saline*.

**PE:** Ficoeritrina.

**PerCP:** Proteína compleja de peridinin clorofila.

**PMN:** Polimorfonucleares.

**pSTAT3:** Proteína STAT3 fosforilada.

**PTI:** Púrpura trombocitopénica idiopática.

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute; medio de cultivo celular.

**Ser:** Serina.

**SFB:** Suero fetal bovino.

**STAT3:** Transductor de señal y activación de transcripción 3, siglas en inglés *signal transducer and activator of transcription*.

**Sx:** Síndrome.

**Trp:** Triptófano.

**µL:** microlitro.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Línea del tiempo, historia de las Inmunodeficiencias Primarias en el siglo XX. .... 10
- Figura 2 Porcentaje de pacientes con inmunodeficiencias registrados en países en Latinoamérica hasta 2018..... 15
- Figura 3 Genes con mutación asociada a IDCV..... 17
- Figura 4 Desarrollo de la célula B ..... 19
- Figura 5 Células blanco de la IL-21 y sus efectos en diferentes líneas celulares. 22
- Figura 6 Vía de señalización IL-21/STAT3 ..... 26
- Figura 7 Manifestaciones clínicas y moléculas o células blanco afectadas por mutaciones de GOF y LOF en STAT3..... 28
- Figura 8 Metodología general de trabajo..... 39
- Figura 9 Análisis de gráfico de puntos para las poblaciones de linfocitos, monocitos y PMN ..... 43
- Figura 10 Análisis poblacional de células NK. ....45
- Figura 11 Análisis de gráfico de puntos para las células B y T ..... 46
- Figura 12 Análisis de gráfico de puntos para las subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+.. ..... 47
- Figura 13 Análisis de gráfico de puntos para la determinación de los porcentajes de las poblaciones de células T CD4+ me memoria y naive..... 49
- Figura 14 Gráfica de desviación de datos de poblaciones CD45RA+ y CD45RO+ entre testigos y pacientes. .... 52
- Figura 15 Análisis de gráfico de puntos para la determinación del porcentaje subpoblaciones de células B. .... 53
- Figura 16 Análisis del gráfico de puntos correspondiente a las poblaciones de células B transicionales y plasmablastos..... 54
- Figura 17 Análisis del gráfico de puntos para la determinación de células B CD21low..... 55
- Figura 18 Gráficas del estadístico de porcentajes de subpoblaciones de células B entre testigos (n=20), pacientes con memoria(n=15) y sin memoria (n=8). ..... 58
- Figura 19 Análisis de gráfico de puntos para la determinación de T regs... ..... 59

➤ Figura 20 Gráfica de dispersión de porcentajes de células CD127low en testigos (n=14) y pacientes con IDCV (n=23). .....	62
➤ Figura 21 Análisis de gráfico de puntos y obtención de histogramas de IMF de pSTAT3. ....	63
➤ Figura 22 Gráficas de los datos promedios de pSTAT3 en los testigos a diferentes tiempos y en cada una de las poblaciones de células B evaluadas.....	65
➤ Figura 23 Gráficas de datos de IMF pSTAT3 de testigos y pacientes.. .....	67
➤ Figura 24 Casos propuestos para la clasificación de los pacientes a partir del patrón de fosforilación de pSTAT3 y sus criterios.. .....	69
➤ Figura 25 Gráficas de los resultados promedio de pSTAT3 clasificados de acuerdo a los criterios de Freiburg.....	71
➤ Figura 26 Gráficas de los resultados promedio de pSTAT3 clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de manifestaciones autoinmunes.....	73
➤ Figura 27 Frecuencia pacientes con manifestaciones autoinmunes en los diferentes patrones de fosforilación propuestos.....	74
➤ Figura 28 Esquemización de la composición de la citometría de flujo. ....	93

---

## LISTA DE TABLAS

➤ Tabla 1 Subcategorías de IDP de deficiencias predominantemente de anticuerpos, diagnóstico y genes. _____	12
➤ Tabla 2 Listado de anticuerpos monoclonales empleados _____	31
➤ Tabla 3 Combinaciones de anticuerpos para la tinción de poblaciones leucocitarias. _____	34
➤ Tabla 4 Características clínicas de la población de pacientes empleada en el estudio _____	40
➤ Tabla 5 Manifestaciones clínicas de los 20 pacientes estudiados. _____	41
➤ Tabla 6 Niveles de inmunoglobulinas reportados en los historiales clínicos de los pacientes. _____	42
➤ Tabla 7 Porcentajes y número absoluto de poblaciones leucocitarias en sangre periférica intervalo de referencia y en azul los que se encuentran por arriba del intervalo de referencia correspondiente a la edad mostrados en el anexo 2. _____	44

➤ Tabla 9 Valores porcentuales de células T CD45RA+ y células T CD45RO+ de los 14 testigos. _____	50
➤ Tabla 10 Valores porcentuales de células T CD45RA+ y CD45RO+ de los 23 pacientes _____	51
➤ Tabla 11 Valores porcentuales de subpoblaciones de células B. _____	56
➤ Tabla 12 Valores porcentuales de células T reguladoras CD127 low en testigos __	60
➤ Tabla 13 Valores porcentuales de células T reguladoras CD127 low en pacientes. _____	61
➤ Tabla 14 Valores de IMF pSTAT3 de testigos en células B (totales, naive y memoria). _____	64
➤ Tabla 15 Valores de IMF pSTAT3 de pacientes en células B (totales, naive y memoria). _____	66
➤ Tabla 16 Intervalos de referencia de leucocitos totales de acuerdo a la edad y al sexo. _____	89
➤ Tabla 17 Intervalos de referencia de neutrófilos, linfocitos y monocitos de acuerdo a la edad (valores porcentuales). _____	89
➤ Tabla 18 Intervalos de referencia de poblaciones de células B, subpoblaciones de células T y NK en valores porcentuales. _____	90
➤ Tabla 19 Intervalos de referencia de memoria de células T y T reguladoras (valores porcentuales). _____	90
➤ Tabla 20 Intervalos de referencia de subpoblaciones de células B de acuerdo a la edad (valores porcentuales). _____	91
➤ Tabla 21 Intervalos de referencia de inmunoglobulinas en suero. _____	91

## **LISTA DE ECUACIONES**

➤ Ecuación 1 Cálculo de leucocitos totales en sangre periférica mediante la cámara de Newbauer _____	35
➤ Ecuación 2 Cálculo de número absoluto de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica. _____	35

## RESUMEN

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) comprende un grupo heterogéneo de condiciones clínicas, las cuales se caracterizan principalmente en la deficiencia de al menos dos isotipos de anticuerpos (IgG, IgA y/o IgM). El desarrollo de la enfermedad es muy variado, además de incluir diversas anormalidades en las poblaciones leucocitarias y diversos cuadros clínicos. Las manifestaciones frecuentes son infecciones recurrentes en vías respiratorias altas (IVRS), trastornos gastrointestinales, trastornos autoinmunes y enfermedades neurológicas.

Cabe mencionar que los defectos genéticos más notorios asociados con IDCV se han encontrado en genes implicados en el desarrollo, supervivencia y activación de las células B. En los últimos años se ha descrito el papel esencial de IL-21 en la maduración y diferenciación de la célula B humana a célula plasmática.

La interleucina 21 (IL-21) es una citocina que actúa sobre esta célula al unirse al receptor IL-21R induciendo la fosforilación de JAK3 (este a su vez fosforila a STAT3 ocasionando su dimerización), traslocarse y unirse al ADN con el fin de iniciar la transcripción de genes involucrados en la diferenciación de células B hacia células plasmáticas.

Se han hecho varios estudios relacionados a las mutaciones en STAT3, las cuales se han detectado principalmente defectos de pérdida y ganancia de función. Estos últimos han sido relacionados a la aparición de neoplasias y manifestaciones autoinmunes.

De las causas estudiadas de la IDCV poco se sabe respecto al papel del eje IL-21/STAT3, de lo que se ha descubierto hasta el momento es su participación en la diferenciación de células naive a células de memoria.

En el presente trabajo se analizó la vía de señalización de IL-21/STAT3 mediante la fosforilación de STAT3 con IL-21r en células B con el fin de evaluar posibles defectos en esta vía en los pacientes con IDCV.

Se analizaron las poblaciones leucocitarias por citometría de flujo de testigos y 23 pacientes diagnosticados previamente con IDCV, a estos mismos pacientes se les realizó un estudio funcional en células B totales, así como en las subpoblaciones de células B naive y de memoria, fueron activadas durante 15 y 60 minutos empleando IL-21r y finalmente se realizó la tinción intracelular dirigida hacia p-STAT3 con un anticuerpo monoclonal (mAb).

Los análisis comparativos entre testigos y pacientes de las poblaciones leucocitarias mostraron diferencias significativas, con un decremento en los pacientes de sus subpoblaciones de células B, principalmente en las células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, plasmablastos y con un aumento en las células B CD21low. También las subpoblaciones de células T colaboradoras vírgenes mostraron un decremento significativo. Se analizó células T reguladoras y se vio un decremento de 56% en los pacientes. En el caso del análisis funcional de pSTAT3 se obtuvieron diferencias entre testigos y pacientes, la baja fosforilación de STAT3 en estos pacientes correlaciona con baja expresión de células B de memoria y manifestaciones autoinmunes.

Se pudo concluir que se identificaron pacientes con IDCV y defectos en la vía IL-21/STAT3, estos pacientes tienen una predisposición a un porcentaje bajo de células B de memoria y manifestaciones autoinmunes.

# INTRODUCCIÓN

## Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico es el conjunto de células y moléculas encargadas de montar una respuesta hacia agentes y sustancias ajenas al organismo, esto mediante el reconocimiento de macromoléculas (principalmente proteínas y polisacáridos) presentes en microorganismos infecciosos (son denominados patrones moleculares asociados a patógenos ó PAMPs), mediante la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. (1)

La inmunidad innata es la primer línea de defensa ante los patógenos que ingresan al organismo; se caracteriza por el reconocimiento de las principales moléculas presentes en los microorganismos sin distinguir de forma específica similitudes entre uno y otro. Existen barreras físicas y químicas (como células epiteliales y sustancias con efecto antimicrobiano presentes en superficie). Además de células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, células NK conocidos también como linfocitos citotóxicos naturales, proteínas del complemento, mediadores de la inflamación y citocinas. (1)

Por su parte, la inmunidad adaptativa presenta una alta especificidad de reconocimiento de una gran cantidad de moléculas microbianas y no microbianas. Se compone principalmente de linfocitos T (los cuales median la inmunidad adaptativa celular que promueve la destrucción de patógenos fagocitados o células infectadas) y linfocitos B ( los cuales son los que encargados de la producción de anticuerpos involucrados en la defensa contra microorganismos extracelulares) (1) .

## **Inmunodeficiencias**

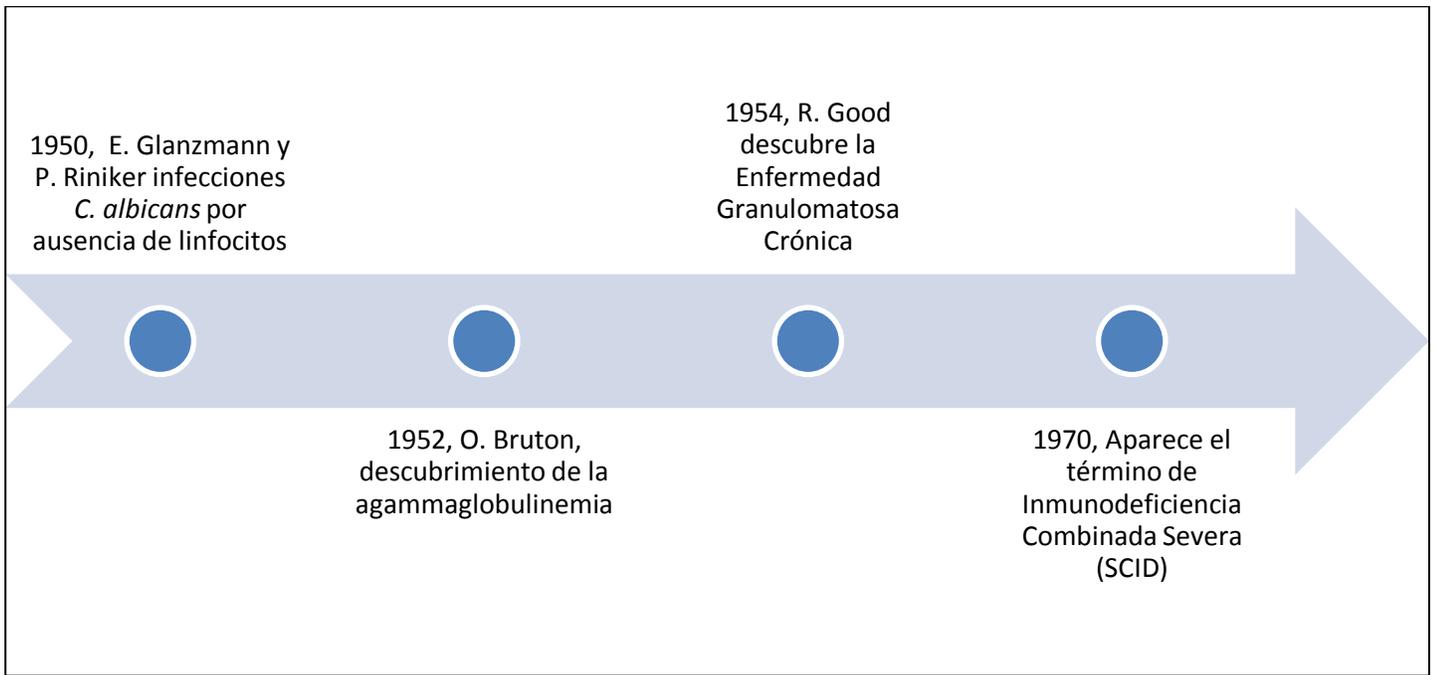
De forma general son llamadas inmunodeficiencias al conjunto de enfermedades causadas por un déficit en los componentes del sistema inmune; estas se clasifican en dos grandes grupos: primarias (cuya causa se debe a un defecto inherente en el sistema inmune asociado a un defecto genético) y secundarias las cuales se originan por algún factor extrínseco como una enfermedad, infección o tratamientos (2).

### **Inmunodeficiencias primarias**

Anteriormente eran descritas como enfermedades ocasionadas por uno ó más defectos en el sistema inmune, cuyas consecuencias traen consigo una alta susceptibilidad a infecciones. Actualmente se sabe que son un grupo de desórdenes heterogéneos con anormalidades en el sistema inmunológico caracterizado por presentar infecciones recurrentes, autoinmunidad, linfoproliferación, procesos granulomatosos, atopía (predisposición al desarrollo de alergias) y procesos cancerosos (2).

Fue hasta principios del siglo XX cuando empezaron a darse los primeros indicios de la presencia de estos padecimientos, siendo el descubrimiento de la agammaglobulinemia por O. Bruton en 1952 lo que marcó la pauta para el enfoque en la investigación en esta línea de la Inmunología.

En la figura 1 se muestran algunos de los sucesos más relevantes para el campo de las inmunodeficiencias primarias que hasta el día de hoy han sido de los padecimientos con mayor campo de investigación.



**Figura 1 Línea del tiempo, historia de las Inmunodeficiencias Primarias en el siglo XX. (Raje N. 2015).**

Desde 1990 la Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas ha venido publicando una clasificación de las inmunodeficiencias primarias, la cual hasta el día de hoy se han categorizado 354 enfermedades asociadas a 344 defectos genéticos localizados. Esto se ha logrado gracias a la expansión de la secuenciación, de la cual ha permitido reconocer varios trastornos de manera rápida (3); dichos padecimientos se agrupan en 9 diferentes grupos basándose en el defecto que se presenta:

- I. Inmunodeficiencias que afectan la inmunidad celular y humoral.
- II. Inmunodeficiencias combinadas con características asociadas o sindrómicas.
- III. Deficiencias predominantemente de anticuerpos.
- IV. Enfermedades de desregulación inmune.
- V. Defectos congénitos del número y/o función de fagocitos.
- VI. Defectos de la Inmunidad Innata.
- VII. Trastornos auto inflamatorios.

VIII. Deficiencias del complemento.

IX. Fenocopias de errores innatos de la inmunidad.

En el grupo de las deficiencias predominantemente de anticuerpos se encuentran las de mayor incidencia Agammaglobulinemia e Inmunodeficiencia Común Variable, siendo esta última la que se trabaja en la presente tesis.

### **Desórdenes predominantemente de anticuerpos**

Estas deficiencias comprenden desde la ausencia completa de anticuerpos en circulación hasta su deficiencia selectiva de un isotipo ó subclase de isotipo de anticuerpo. Se caracterizan por una predisposición a contraer infecciones bacterianas en las vías respiratorias altas y bajas (presentándose por lo general otitis, sinusitis y neumonía); también se pueden presentar abscesos en la piel u otros órganos, meningitis, infecciones en las vías urinarias y artritis. Infecciones virales y por parásitos como algunas especies de *Giarda* que causan diarrea prolongada pueden estar presentes (2), (4).

De las inmunodeficiencias de mayor relevancia en este grupo son la agammaglobulinemia (XLA) (la cual se caracteriza por la baja concentración de inmunoglobulinas en suero y de células B) y la Inmunodeficiencia Común Variable.

Para el caso de la XLA de los principales genes que se han visto afectados son *BLNK* y *BTK*. Se caracteriza por tener una mayor frecuencia en varones dado a que la mayoría de los casos se debe por herencia ligada al X (5).

En la Tabla 1 se enlistan las inmunodeficiencias que agrupan esta categoría, así como su subclase y genes asociados. Por mencionar en el caso de IDCV de los

principales genes que se han visto afectados son para *CD19*, *LRBA*, *BAFFR* y *CD21* (3).

**Tabla 1 Subcategorías de IDP de deficiencias predominantemente de anticuerpos, diagnóstico y genes (Picard, 2018).**

Categoría	Subcategoría	Diagnóstico de IDP	Genes	
Deficiencia predominantemente de anticuerpos	Agammaglobulinemia	Agammaglobulinemia	<i>BLNK, BTK, CD79A, CD79B, IGHM, IGLL1, PIK3R1, TCF3</i>	
		Defectos de recombinación de cambio de clase / Síndromes HIGM	Defectos de recombinación de cambio de clase y Síndromes Hiper IgM	<i>AID, CD40, CD40L, PMS2, UNG</i>
	Hipogammaglobulinemia		Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV)	<i>ATP6AP1, BAFFR, CD19, CD20, CD21, CD81, ICOS, IKFZ1, IRF2BP2, LRBA, MOGS, NFKB1, NFKB2, PTEN, TACI, TRNT1, TTC37, TWEAK</i>
			Deficiencia específica de IgG (SPAD)	--
			Deficiencia de IgG e IgA	<i>TACI</i>
			Deficiencias de la cadena de inmunoglobulina	Cadena pesada, cadena ligera kappa, cadena ligera lambda
			Deficiencias de subclases de IgG	<i>BAFFR, CD19, CD21, CD81, ICOS, TACI</i>
			Deficiencia selectiva de IgA	<i>TACI</i>
			Deficiencia selectiva de IgM	--
			Timoma con inmunodeficiencia	--
			Deficiencia de Trascobalamina II	Trascobalamina II
			Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia	--
		Deficiencia de anticuerpos no clasificada	Deficiencia de anticuerpos no clasificada	<i>11q23, LRBA, NFKB1, NFKB2, PIK3CD, PRKCD</i>

## **Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV).**

Fue descrita por primera vez por Janeway et al. en 1953 pero no fue hasta 1973 que Cooper et al. acuñó el término de Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV)(6). Comprende un grupo heterogéneo de condiciones clínicas, las cuales se caracterizan principalmente en la deficiencia de anticuerpos de al menos dos isotipos (IgG, IgA y/o IgM), esto debido a que el principal defecto inmunológico es la deficiencia de células B productoras de inmunoglobulinas; aunque también se han estudiado otros componentes del sistema inmunológico asociados a la enfermedad, tales como las células T (7).

Es la inmunodeficiencia de mayor incidencia en adultos; su sello distintivo son las infecciones bacterianas recurrentes en el tracto respiratorio en la mayoría de los pacientes. Además el 40% de estos puede presentar desórdenes gastrointestinales, linfoproliferativos, fenómenos autoinmunes (como la púrpura trombocitopénica idiopática y anemia hemolítica autoinmune) e inflamación granulomatosa. También se ha hecho la asociación con otras complicaciones como cánceres, principalmente el linfoma de No Hodgkin(8, 9).

Se estima una incidencia entre 1:10,000 y 1:50,000, habiendo diferencias regionales ya que no es un diagnóstico muy frecuente en la población asiática y afro-americana, debido a falta de desarrollo en esos países. No hay predisposición por género o edad, ya que por lo general empieza a presentarse en la segunda o tercera década de vida, no obstante no excluye los casos donde se manifiesta desde la infancia (10).

## **Cuadro clínico**

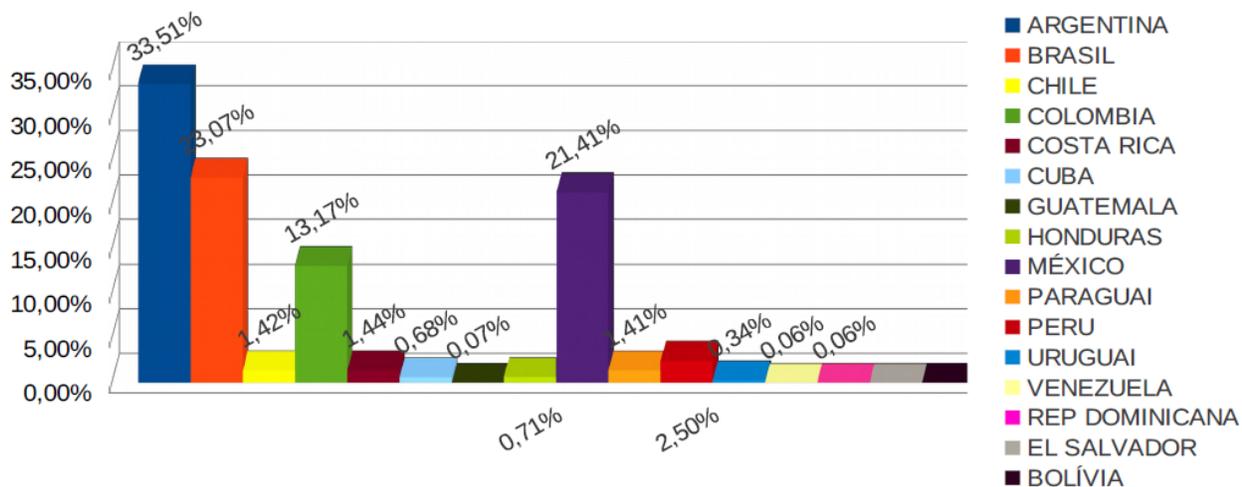
El desarrollo de la enfermedad es muy variado al incluir diversos tipos de anomalías en las subpoblaciones de linfocitos y diferentes cuadros clínicos. Entre ellos los trastornos gastrointestinales como giardiasis crónica, desórdenes de mala absorción y diarrea; también enteropatías por infecciones por *Campylobacter sp.* y *Yersinia sp.*(11).

Es frecuente el hallazgo de trastornos autoinmunes en pacientes con IDCV, tales como artritis reumatoide, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia perniciosa, endocrinopatías autoinmunes relacionadas con la tiroides, enfermedades neurológicas (Sx de Guillain-Barré) y hepatitis C(11). Se estima que más del 20% de los pacientes diagnosticados con IDCV presentan complicaciones autoinmunes los cuales son difíciles de entender y a veces de manejar (12).

Otras afecciones relacionadas son la otitis media, sinusitis crónica, neumonía recurrente que por lo general lleva a la presencia de bronquiectasia (inflamación irreversible de los bronquios), así como infecciones inusuales por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*(11).

## **Epidemiología**

Hasta finales de 2018, de acuerdo con la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID) México ocupa el tercer lugar con mayor número de registros de pacientes con inmunodeficiencias primarias (1744 casos); de esta forma es posible confirmar la relevancia del estudio de estas enfermedades en nuestro país, así como las aportaciones que ha sumado en este campo de la ciencia. En la figura 2 se observa la gráfica de los países y su frecuencia de registro ante LASID.



**Figura 2 Porcentaje de pacientes con inmunodeficiencias registrados en países en Latinoamérica hasta 2018. [https://registrolasid.org/docs/Estadisticas\\_LASID-2018\\_Dezembro.pdf](https://registrolasid.org/docs/Estadisticas_LASID-2018_Dezembro.pdf). Consultado el 15 de enero de 2019.**

En 2014 se realizó un estudio con 43 pacientes mexicanos diagnosticados con IDCv de siete diferentes puntos del país los cuales fueron analizados por edad, sexo, manifestaciones clínicas y niveles de inmunoglobulinas. Se obtuvieron como resultados una distribución de sexo masculino del 53.5% y 43.5% femenino, una media de edad para los principios de la enfermedad de 13.7 años y una media de edad del diagnóstico de 19 años. Las manifestaciones clínicas de mayor frecuencia fueron infecciones (sinusitis, neumonía, infecciones gastrointestinales y otitis media) (13).

El 23.2% de los pacientes presentaron trastornos autoinmunes, los cuales fueron: anemia hemolítica autoinmune, vitíligo, tiroiditis, artritis, vasculitis, enfermedad de Behcet (inflamación de los vasos sanguíneos a nivel sistémico), fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica y esplenomegalias (dilatación del bazo).

La media concentración de inmunoglobulinas en suero fueron 175 mg/dL para IgG (rango de 160-253) 18.0 mg/dL para IgM (rango 20.8-57.5) y 17.8 mg/dL

para IgA (rango de 13.8-23.1), lo cual indica que los pacientes analizados en este trabajo presentaban bajos niveles de inmunoglobulinas.

Gracias a esto, es posible dimensionar una distribución del perfil que presenta el paciente mexicano, el cual no dista demasiado con los casos reportados en otras partes del mundo. Cabe mencionar que para el diagnóstico de un paciente IDCV se emplean los criterios de Conley (37) los cuales establecen tres puntos importantes a considerar:

\*Concentraciones de inmunoglobulinas bajas (dos desviaciones estándar por debajo de la media del rango de edad) de al menos dos subtipos (IgA, IgG o IgM).

\*Ausencia de isohemaglutininas y/o baja respuesta a vacunas.

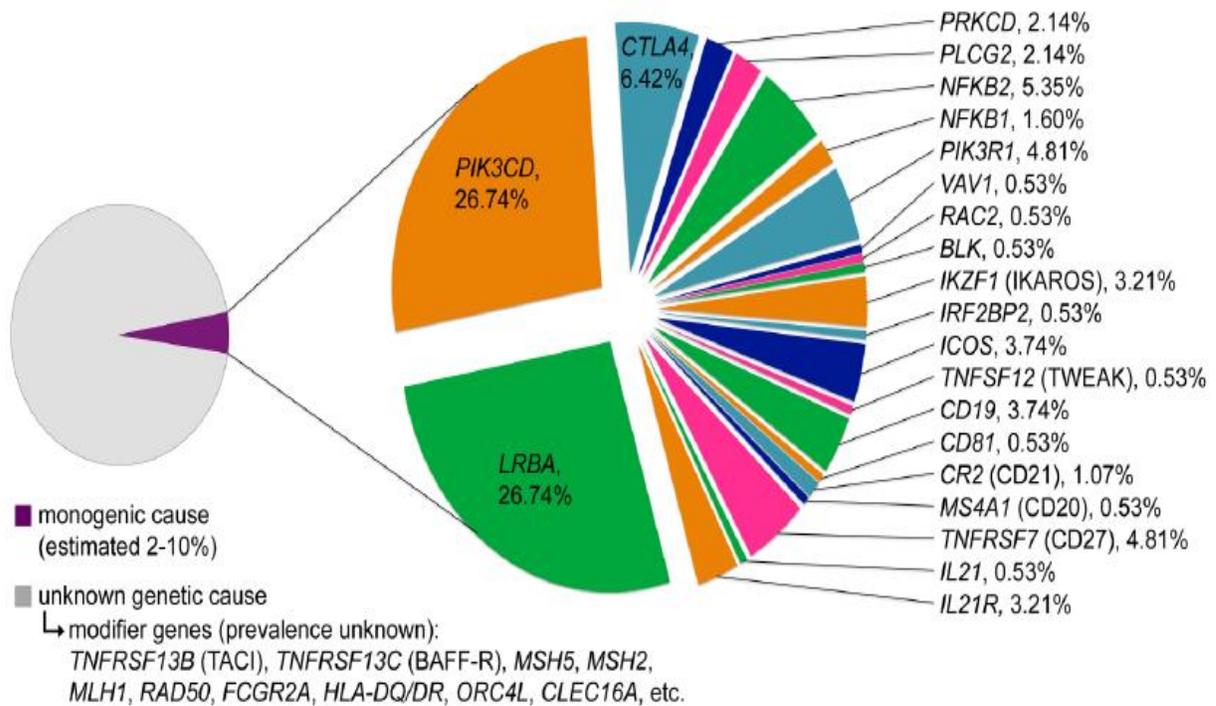
\*Baja cantidad de células B.

### **Etiología de IDCV**

La mayoría de los casos de IDCV ocurre de forma esporádica, no obstante entre el 5-25% de los casos se reporta una historia familiar positiva, de los cuales la mayoría muestra una herencia autosómica dominante. Por el momento de todos los pacientes estudiados se ha identificado la causa monogénica en un porcentaje bajo (2-10%).

Hoy en día gracias al uso de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva ha sido posible identificar más genes asociados a la enfermedad. Entre estos genes encontramos: *ICOS*, *CD19*, *CD81*, *IL-21*, *IL-21R*, *CD20*, *etc...*; se han encontrado que dichos genes tienen funciones importantes en las células del sistema inmune, además de una participación importante en la activación de la célula B directa e indirectamente (14).

En la figura 3 se muestran los genes en los que se han encontrado mutaciones en pacientes con IDCV, la mayoría se encontraron gracias a la secuenciación masiva, no obstante más del 80% de los pacientes con IDCV aún no tienen un diagnóstico molecular; esto se puede deber a la heterogeneidad enorme que existe en los pacientes con IDCV.



**Figura 3 Genes con mutación asociada a IDCV. Los genes con una mayor frecuencia de mutación asociada a la enfermedad son LRBA y PIK3CD; también se han encontrado mutaciones en los genes de IL-21 (0.53%) y IL-21R (3.21%). (Boileau J. 2011)**

Para poder entender el defecto molecular que con lleva a un fenotipo de IDCV, es necesario comprender el desarrollo y la diferenciación terminal de la célula B en los órganos linfoides secundarios.

## **Células B**

Las células B y los anticuerpos son conocidos como parte fundamental de la inmunidad humoral y su función principal es defendernos contra un gran número de patógenos; esto mediante la diferenciación, en los órganos linfoides secundarios, de células B naive a células B de memoria o células plasmáticas formadoras de anticuerpos, lo cual se logra a través, pasos esenciales que llevan a la formación del centro germinal donde se va a desarrollar los fenómenos de la mutación somática y recombinación de cambio de clase (15).

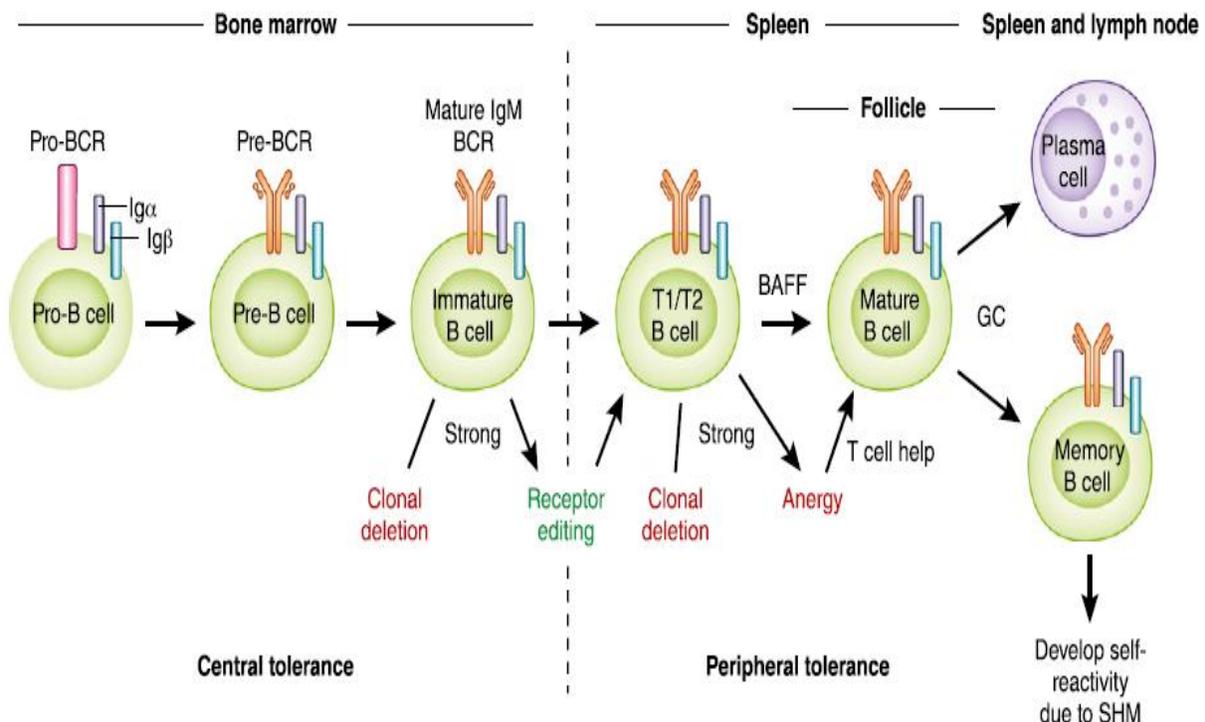
### **Desarrollo de la célula B.**

El desarrollo de las células B empieza en médula ósea, donde pasa por una serie de diferentes estadios: pro-B, pre-B y célula B inmadura (presenta en su superficie IgM); estos estadios se caracterizan por el reordenamiento exitoso de de la cadena pesada y ligera del receptor de antígeno (BCR), tal como se muestra en la figura 4. Cuando una célula B inmadura presenta un receptor de antígeno funcional son seleccionadas para sobrevivir y salir a los órganos linfoides secundarios. (16).

Una vez que son seleccionadas salen de médula ósea hacia sangre periférica dirigiéndose hacia algún órgano linfoide secundario (como el bazo), es en este proceso son denominadas células B transicionales. Estas células dependen del factor activador de células B (BAFF, por sus siglas en inglés) para la supervivencia, posteriormente se diferencian en células B maduras en el bazo (células B independientes). Algunas células B de transición con fuerte reactividad autoinmune experimentan una eliminación clonal ó permanecen fuera de los folículos esplénicos como células B anérgicas de baja respuesta; dichas células al interactuar con alguna célula T le permite pasar al estadio de célula B madura activada (célula T dependiente), y entran en las reacciones del centro germinal (GC) dan lugar a células B de memoria y células plasmáticas de larga vida(16)

secretoras de IgG, IgA ó IgE de larga vida; si esta célula B es activada por pared celular de bacteria (como polisacáridos), su activación se lleva a cabo en la zona marginal de los folículos primarios, donde formaran células B de memoria y células plasmáticas de corta vida y en su mayoría secretoras de IgM (16).

En la figura 4 se muestra un esquema sencillo de todo el proceso de desarrollo que es sometido la célula B desde el estadio de pro-B hasta célula B de memoria ó célula plasmática.



**Figura 4 Desarrollo de la célula B (Hoffman, 2015) Proceso de desarrollo de célula B partiendo desde el estadio de célula Pro-B, posteriormente pasa al estadio de Pre-B donde empieza a darse la formación del BCR, después pasa a la fase de célula B inmadura la cual posee un BCR maduro, en esta fase es sometida a una selección clonal para posteriormente salir a circulación sanguínea (célula transicional), de esta forma llegar a un tejido linfode secundario y ser activada para pasar a célula B madura y de ahí diferenciarse a célula B de memoria o célula B plasmática.**

## **Clasificación de pacientes con IDCV según su población de células B**

Como bien ya se ha descrito anteriormente, la IDCV es una enfermedad cuyas causas y signos característicos son muy heterogéneos, por ende se han propuesto varias forma de clasificar a los pacientes correlacionando sus manifestaciones clínicas con su fenotipo inmunológico. Partiendo del hecho que hay pacientes con células B, pero sin células B de memoria y otros que sí tienen células B de memoria; se empezaron a agrupar a los pacientes dependiendo del porcentaje de expresión de sus células B de memoria en sangre periférica(8).

Para este trabajo se empleó la Clasificación de Freiburg debido a la practicidad de sus criterios para clasificar a los pacientes a partir de la información recopilada y el número de pacientes que se emplearon.

### **Clasificación de Freiburg**

Se basa en la expresión de IgM, IgD, CD27 y CD21, lo cual llevó a la división de tres grupos(18):

- **Grupo I:** Se caracteriza por presentar una reducción severa de células B de memoria con cambio de isotipo, (IgM-/IgD-/CD27+ y menos de 0.4% de linfocitos); este grupo a su vez se divide en dos subgrupos:
  - **Ia:** Presentan un alto porcentaje de células B con baja expresión de CD21bajo (más del 20%), además de una alta incidencia de esplenomegalias en los pacientes.
  - **Ib:** El porcentaje de células B con baja expresión de CD21bajo es menor al 20%.
  
- **Grupo II:** Los pacientes presentan un porcentaje mayor a 0.4% de células B de memoria con cambio de isotipo con respecto al total de linfocitos.

## **La función de las citocinas en la diferenciación de la célula B**

La memoria inmunológica esta mediada por células plasmáticas de larga vida y la generación de células B de memoria, a partir de las células B vírgenes (naive) después de la exposición con el antígeno. Las células T proveen ayuda a las células B, a través de moléculas coestimuladoras ó por la secreción de citocinas durante reacciones en el centro germinal. (20).

Recientemente se ha descrito el papel de las citocinas al modular la diferenciación de la célula B, como el modular la expresión de factores de transcripción que llevan a la traducción de genes involucrados en la diferenciación terminal de la célula B a célula plasmática secretora de inmunoglobulinas (19)

En los últimos años se ha descrito el papel esencial de IL-21 en la maduración y diferenciación de la célula B humana a célula plasmática. Las células T foliculares en centro germinal secretan IL-21 y con ello, activan la vía de señalización, la cual conlleva a la fosforilación de STAT3, la activación de factores de transcripción importantes para proliferación y diferenciación de la células B (21).

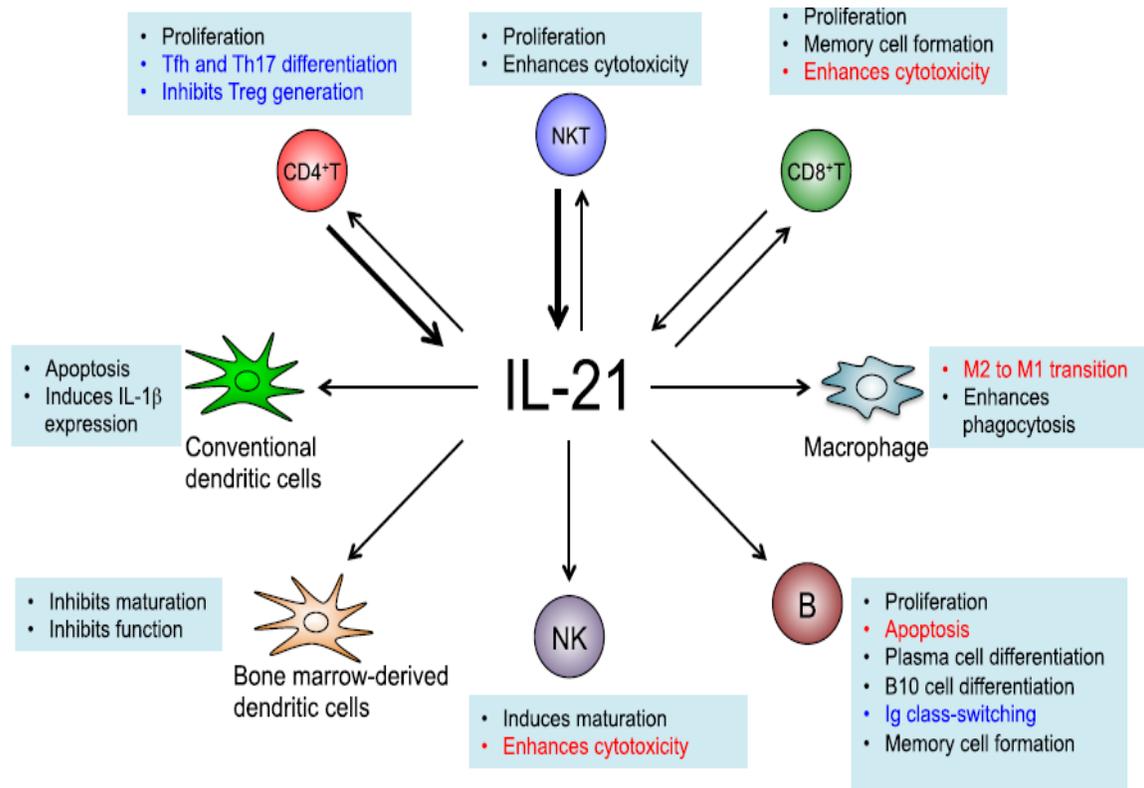
### **Interleucina 21 (IL-21).**

La interleucina 21 es una citocina pleiotrópica de tipo 1 cuyo receptor es parte de la familia de receptores que comparte la cadena "gamma común" ( $\gamma_c$ ) con las citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15; una vez que IL-21 se une a su receptor activando a las proteínas JAK1 y JAK3, así como a STAT1, STAT3 y STAT5.

Esta citocina es secretada por las células T CD4+ activadas y células NKT, teniendo diversos efectos sobre distintas células: células B, células T CD4+ y CD8+, macrófagos, monocitos y células dendríticas principalmente (23, 24).

Basta como ejemplo el mencionar su actividad sobre células NK, la cual índice si maduración; para el caso de las células T CD4+ ejercen un efecto autócrino donde además de inducir su proliferación, permite la diferenciación de células Th foliculares y Th17. No obstante, inhibe la generación de células T reguladoras (25).

En la siguiente figura se aprecia un esquema sobre el tipo de célula que actúa dicha citocina, así como el efecto sobre ella:



**Figura 5 Células blanco de la IL-21 y sus efectos en diferentes líneas celulares. La IL-21 ejerce activada sobre células T CD4+, NKT, T CD8+, células dendríticas convencionales y en médula ósea, NK, macrófagos y en células B, siendo sobre esta última mayor cantidad de efectos como son: proliferación, apoptosis, diferenciación hacia célula plasmática, cambio de clase de inmunoglobulinas y la formación de las células de memoria principalmente.**

La IL-21 ha sido identificada como la citocina que ejerce una fuerte activación sobre las células B humanas, junto con CD40L induce una fuerte proliferación y diferenciación, que se ve reflejada en la secreción de IgM, IgG e IgA, por parte de

las células plasmáticas y formación de subpoblaciones de células B de memoria(22).

El gen que codifica para la IL-21 se localiza en el cromosoma 4 (*4q27*); es una proteína cuya secuencia se compone de 162 aminoácidos, teniendo un péptido señal de 31 aminoácidos, un dominio de citocina de 4 hélices homólogo a las citocinas IL-2, IL-4 e IL-15, además de un par de residuos de cisteína en las mismas posiciones de IL-15(26).

En cambio, el gen de IL-21R se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (*16p11*), se compone de nueve exones abarcando aproximadamente 20 Kb de ADN genómico; dicha secuencia codifica para un receptor de citocina de 538 aminoácidos con un dominio extracelular (Trp-Ser-X-Ser-Trp)(24, 27).

### **Proteínas JAK (JAK3).**

Las proteínas JAK (Janus kinase) son una familia de cuatro proteínas (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) las cuales están presentes en los mamíferos caracterizadas por ser un subgrupo de tirosin-quinasas no receptoras intracelulares asociadas a membrana.

Su función es la mediación de señales de receptores de citocinas y factores de crecimiento; son proteínas grandes de más de 1100 aminoácidos y cuyo peso molecular va desde 120 a 140 kDa, en el caso de JAK3 su expresión está restringida para células de linaje hematopoyético(28).

A partir de la secuencia primaria se han podido identificar siete dominios homólogos JH (JH1-JH7, dichos dominios son conservados entre especies); la actividad cinasa depende de la fosforilación en los residuos de tirosina, cabe mencionar que solo JAK3 se une a la cadena  $\gamma_c$ , siendo la única que responde a la señalización de citocinas(29).

## **Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STAT´S).**

Los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) son una familia de siete factores de naturaleza proteica (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) cuya localización genética se encuentra distribuida en tres cromosomas en humanos.

Se caracterizan por presentar un dominio SH2 de unión a fosfotirosina, lo que le permite la interacción con varias moléculas implicadas en varias vías de señalización.

Posterior a la fosforilación se lleva a cabo una dimerización entre los dominios de SH2 y de fosfotirosina; ocurre su translocación al núcleo. Esto es posible ya que poseen un dominio único de unión al ADN el cual guarda cierta similitud con el dominio de unión al ADN de NFkB, no obstante no se conocen con exactitud los dominios de STAT involucrados en la translocación.(30).

### **Proteína STAT3**

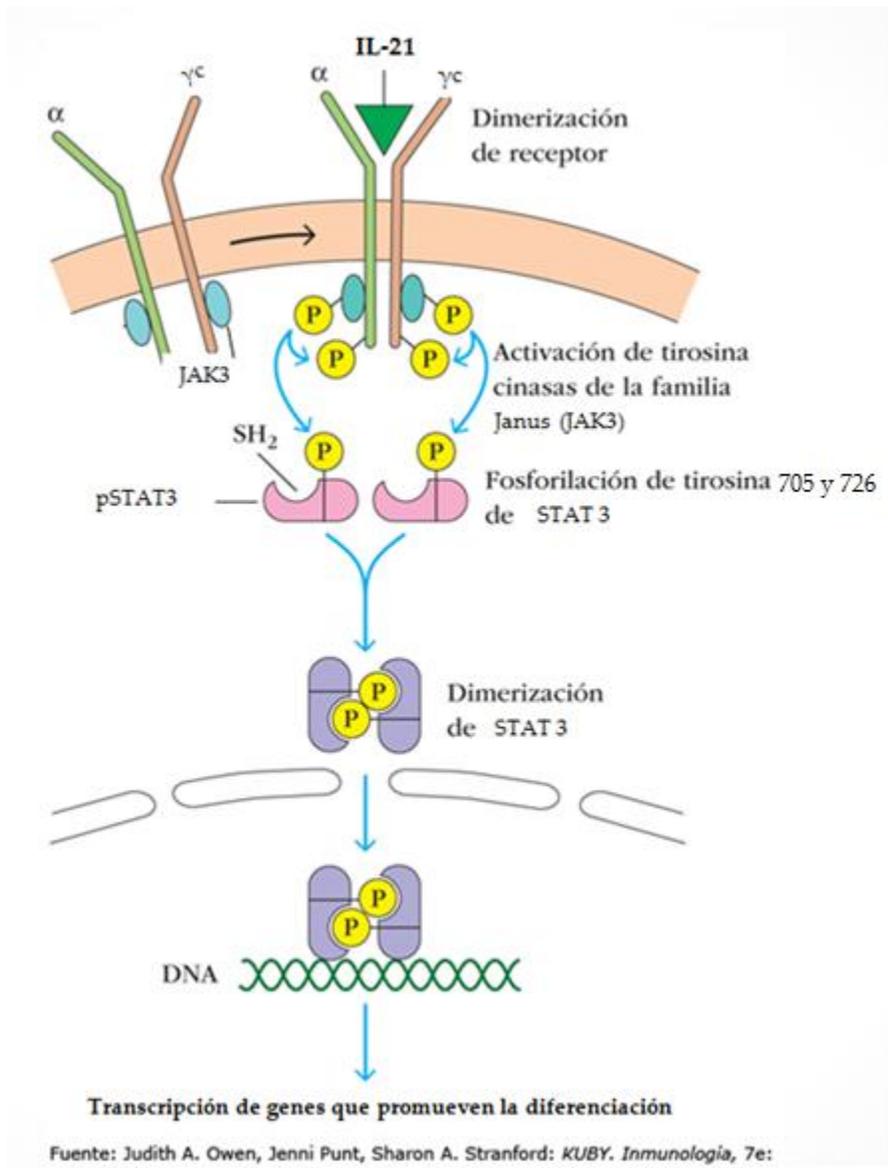
Existen dos isoformas de STAT3: STAT3 $\alpha$  y STAT3 $\beta$  la cual se genera por *splicing* alternativo, siendo STAT3 $\alpha$  la forma prevaleciente en la célula durante circunstancias normales. La proteína STAT3 existe en el citoplasma como forma inactiva hasta la fosforilación por las cinasas asociadas al receptor. La cinasa JAK3 activada fosforila STAT3 a través de la unión del dominio SH2 a un residuo tirosina fosforilado, mediante el cual el extremo C de p-STAT3 desencadena su liberación del receptor y forma una homo ó hetero-dimerización de p-STAT3; una vez dimerizada se traslada al núcleo y se une a los promotores teniendo secuencias afines de unión al ADN(31).

STAT3 promueve y regula la transcripción de genes implicados en la proliferación, diferenciación y apoptosis, además de ser importante en la modulación de la respuesta innata y adaptativa mediante varias citocinas incluyendo interferones e interleucinas (IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IL-23 e IL-27).

### **Vía de señalización IL-21/STAT3**

En las células B el mecanismo por el cual se da la vía de señalización empieza una vez que IL-21 se une al receptor IL-21R presente en la superficie de la célula, una vez se une promueve un cambio conformacional que induce la fosforilación de JAK3, posteriormente esta a su vez lleva a cabo la fosforilación de STAT3 ocasionando la dimerización de esta, de esta forma permite la translocación al núcleo y la unión al ADN con el fin de iniciar la transcripción de genes involucrados en la diferenciación de células B hacia células plasmáticas(22).

En la figura 6 se ilustra dicha vía:



**Figura 6 Vía de señalización IL-21/STAT3 (KUBY. *Inmunología* 7° ed. modificado).**

Esquema del proceso de activación de la vía de señalización de IL-21 en células B. La IL-21 se une al receptor IL-21R, el cual se compone de la cadena  $\gamma$ c a la cual está anclada la proteína JAK3, al unirse a su receptor IL-21 induce un cambio conformacional que genera la fosforilación de JAK3 la cual a su vez fosforila a STAT3, de esta forma ocurre su dimerización y se da la translocación de los dímeros hacia el núcleo de la célula, de esta forma se unen al ADN con el fin de comenzar la transcripción de genes involucrados en la diferenciación y proliferación de la célula B.

## **Mutaciones en STAT3.**

Se han hecho varios estudios relacionados a las mutaciones en esta proteína, las cuales se han detectado principalmente negativas de pérdida de función (LOF, *lost of function*), ocasionando el Síndrome de Hiper IgE autosómico dominante (AD-HIES) ó Síndrome de Job. Dicho síndrome se caracteriza por infecciones bacterianas recurrentes en pulmones y piel, formación de abscesos por frío, erupción eccematoidea severa, candidiasis muco-cutanea crónica, anormalidades tisulares y tortuosidad arterial. Cabe mencionar que dicha LOF no corresponde a una ausencia completa de la proteína o de su función (32).

Otros estudios han revelado otro tipo de mutación con ganancia de función (GOF, *gain of function*) a STAT3, la cual está asociada a neoplasias. Además de reportes de mutaciones somáticas específicas en pacientes con "leucemia linfocítica granular".

Se han descrito pacientes con mutaciones con GOF que desarrollan fenómenos autoinmunes, baja frecuencia de células T reguladoras, hipogammaglobulinemia y defectos en la diferenciación de las células B(33, 34).

En 2019 se realizó un estudio comparativo empleando los resultados de 42 pacientes reportados con mutaciones de GOF en STAT3 en 18 artículos publicados desde 2014 hasta 2018 (58). En su mayoría, los pacientes presentaban autoinmunidad y síndromes linfoproliferativos, además de diversos padecimientos en distintos órganos.

Estos pacientes tienen un fenotipo clínico parecido a IDCV. Por esta razón es importante hacer estudios funcionales de pSTAT3 a los pacientes con IDCV, esto con el fin de corroborar la presencia de una mutación con ganancia de función en esta proteína lo que pudiera explicar su fenotipo clínico, así como el dirigir un tratamiento adecuado para su padecimiento.

En la figura 7 se muestra un resumen de los principales cuadros clínicos que presentan las mutaciones que confieren GOF o LOF, así como su hallazgo observado en el laboratorio (32):

	Inheritance	Clinical presentation	Laboratory findings
STAT3 LOF	Germline AD	Mucocutaneous candidiasis Pneumonia ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> ) Pneumatoceles Dermatitis Connective tissue and bone abnormalities	IgE Th17  T follicular help B-cell maturation and function Mast cell degranulation  NK cell activation CD8 <sup>+</sup> function
STAT 3 GOF	Germline AD	ALPS-like IPEX-like STAT5b deficiency-like Multiorgan autoimmunity Infections Immune deficiency: hypo-IgG, reduced memory B cells	IL-6 signaling SOCS3 pSTAT5 pSTAT1 Tregs

**Figura 7 Manifestaciones clínicas y moléculas o células blanco afectadas por mutaciones de GOF y LOF en STAT3 (Milner JD. 2015).** Dentro de los hallazgos más relevantes para LOF se destaca el Sx de Hiper IgE. Por lo que refiere a mutaciones del tipo GOF se destacan en su mayoría los sucesos asociados a autoinmunidad.

## **JUSTIFICACIÓN**

La IDCV se cataloga como una de las inmunodeficiencias primarias de mayor frecuencia en la actualidad, tanto a nivel mundial como a nivel nacional; si bien es también es una de las más estudiadas, ha sido difícil su investigación y tratamiento debido a la heterogeneidad de los pacientes que la padecen.

Varios grupos de investigación han realizado estudios en diferentes poblaciones del sistema inmune, con hallazgos muy importantes. Entre ellos, las vías de activación en la célula B como las vías de señalización de TLR's, sobre todo TLR-9, para buscar posibles defectos en las vías de señalización T independientes ó innatas de la células B.

En los últimos años se ha visto que las citocinas, en la célula B, tienen un papel fundamental para la formación y mantenimiento del centro germinal y las respuestas T dependientes de las células B. Entre ellas, la IL-21 se ha descrito como uno de las citocinas con más importancia para la diferenciación terminal de la célula B. Sin embargo, hay pocos estudios de la vía de señalización IL21/STAT3 en pacientes con IDCV.

Dado que los pacientes con IDCV, tienen un defecto en la diferenciación de la célula B en los órganos linfoides periféricos, al verse disminuida la concentración de inmunoglobulinas en suero, predisposición a infecciones y complicaciones clínicas; es importante estudiar esta vía de señalización en pacientes con IDCV con el fin de entender y explicar la causa de su fenotipo lo que le permita acceder a un tratamiento adecuado y dirigido.

## **HIPÓTESIS**

-Las células B de los pacientes con IDCV van a tener una alteración en la fosforilación de la proteína STAT3 mediada por defectos en la vía de IL-21/STAT3.

## **OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar la relación de distintas poblaciones de leucocitos en pacientes con IDCV y analizar la vía de señalización IL21/STAT3 mediante la fosforilación de la proteína STAT3, utilizando IL21r en pacientes mexicanos con IDCV.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

-Obtener el fenotipo de diferentes poblaciones leucocitarias: monocitos, linfocitos, PMN, células T CD4+ (naive, memoria reguladoras) y CD8+ y células NK, mediante citometría de flujo en pacientes diagnosticados con IDCV.

-Comparar el fenotipo de subpoblaciones de células B: células B naive, células B (con y sin cambio de isotipo), células B doble negativa, células B transicionales, plasmablastos y células B CD21low en pacientes y testigos sanos.

-Determinar pSTAT3 en células B totales, B naive y B memoria en pacientes con IDCV al ser activadas con IL-21r.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos

- \*Anticuerpos monoclonales:

**Tabla 2 Listado de anticuerpos monoclonales empleados (nombre del reactivo, casa comercial y número de lote).**

Reactivo	Casa comercial	Lote
BD Tritest™ CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP con BSA y 0.1% azida de sodio	BD Bioscience	70187
BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD14		2220800
BD Tritest™ CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP en buffer con 0.1% azida de sodio.		43687
BD Tritest™ CD3 FITC/ CD16+56 PE/ CD45 PerCP en buffer con 0.1% azida de sodio		13596
BD Multitest™ CD45RA FITC/CD45RO PE/ CD3 PerCP /CD4 APC con BSA y 0.1% azida de sodio		63506
BD Pharmingen™ APC Mouse Antihuman CD19		7108612
BD Pharmingen™ PE Mouse Antihuman CD27		5195553
BD Pharmingen™ PE Mouse Antihuman CD24		5313689
BD Pharmingen™ FITC Mouse Antihuman IgD		7261947
BD Pharmingen™ FITC Mouse Antihuman CD38		6328698
BD Pharmingen™ PE Mouse Antihuman CD21		3186971
BD Pharmingen™ FITC Mouse Antihuman CD27		36520
BD Pharmingen™ FITC Mouse Antihuman CD127		5286750
BD Pharmingen™ PerCP Mouse Antihuman CD4		6175655
PE Mouse anti-human CD25	BioLegend	B237183
PE anti-STAT3 Phospho (Tyr705) Clone: 13A3-1		B208734

- PBS (buffer de fosfatos) estéril\*
- Solución de lisis BD FACS Lysing Solution ® BD Bioscience Lote: 41092
- Solución fijadora 16%\*
- Solución fijadora 1% \*
- Medio RPMI 1640 (1x) + L-Glutamina glibco® Lote:1868632
- Interleucina 21 recombinante humana (R&D SYSTEM rhIL-21 Interleukin 21 recombinant human) derivada de *E. coli* 10 µg (se empleó una concentración de 80ng/µL), pureza >95%. Lote: ELF051711
- PBA (buffer de fosfatos y albúmina)\*
- Metanol
- Etanol
- Agua Milli-Q
- Paraformaldehído
- SFB (suero fetal bovino)
- Albúmina sérica bovina (*Albumin Bovine Fraction V MP*) Lote:9525K
- Solución Ficoll-Histopaque (*Lymphoprep TM Produced by Fresenius Kabi Norge AC for Axis Shield PoC AC*) Lote: 12ID508.
- Solución Turk\*

\*Para ver la preparación de estas soluciones, consultar Anexo 3.

## Equipos

- Citómetro de Flujo FACS Aria®BD
- Campana de flujo laminar marca Nuaire modelo 47922
- Incubadora Nuaire modelo NW-S500
- Centrífuga Beckman Coulter modelo Allegra X-122
- Cámara de Newbauer

## **Software**

- FlowJo 7.6.2
- GraphPad Prism versión 5.01

## **Características de la población a estudiar.**

Se hizo el estudio usando 23 pacientes diagnosticados con IDCV, 15 femeninas y 8 masculinos con una media de edad de 29 años. Haciendo la revisión del historial clínico de cada uno se obtuvo la recopilación de las manifestaciones clínicas las cuales caen dentro del cuadro clínico característico de IDCV.

## **Criterios de inclusión.**

- Hombre o mujer de cualquier edad (en el caso de los menores de edad se obtuvo el consentimiento firmado del padre o tutor).
- Bajos niveles de IgG e IgA (menor a dos desviaciones estándar del límite inferior en los parámetros correspondientes a su edad).

## **Criterios de exclusión.**

- Pacientes cuyas causas de hipogammaglobulinemia se debe a razones secundarias.
- Pacientes bajo tratamiento con inmunosupresores.

## **Recolección de muestras sanguíneas.**

Se obtuvieron muestras de sangre venosa usando tubos de vidrio al vacío de 16x100 mm, tapón convencional amarillo con volumen de drenado de 8.5 mL con 1.5 mL ACD solución A, que contiene 22.0 g/L de citrato trisódico, 8.0 g/L de

ácido cítrico y 24.5 g/L de dextrosa, estéril y desechable (sistema Vacutainer®) tanto en pacientes diagnosticados con IDCV y voluntarios sanos.

### **Determinación de subpoblaciones leucocitarias.**

Se realizó la determinación de subpoblaciones de leucocitos mediante una tinción superficial usando sangre venosa y 2 µL de cada uno de los anticuerpos en las siguientes combinaciones:

**Tabla 3 Combinaciones de anticuerpos para la tinción de poblaciones leucocitarias.**

<b>Combinación de anticuerpos monoclonales</b>	<b>Tipo de célula</b>	<b>Volumen de sangre (µL)</b>
CD19-PE/CD45-PerCP/CD3-FITC + CD14-APC	Células B, monocitos, linfocitos y polimorfonucleares	15
CD16+56-PE/CD3-FITC/CD45-PerCP	Células NK	15
CD3-PerCP/CD4-FITC/CD8-PE	Linfocitos T (cooperadores y citotóxicos)	15
CD3-PerCP/CD4-APC/CD45RA-FITC/CD45RO-PE	Linfocitos T CD4+ (naive y memoria)	15
CD127 FITC, CD25 PE, CD4 PerCP	Linfocitos T reguladores	50
CD19-APC+CD27-PE+IgD-FITC	Células B naive, memoria con y sin cambio de isotipo y doble negativas	30
CD19-APC+ CD38-FITC+ CD24-PE	Células B transicionales y plasmablastos	30
CD19-APC+ CD38-FITC+ CD21-PE	Células B 21bajo	30

Se dejaron en incubación a oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 500µL de solución de lisis *BD Lysing Solution*® por

10 minutos, posteriormente se realizó el lavado empleando PBS centrifugando por 5 minutos a 1500 rpm y finalmente se fijaron con 200 µL de solución fijadora 1%.

### **Conteo de leucocitos totales.**

Se realizó el conteo de leucocitos totales (LT) de las muestras sanguíneas de los 23 pacientes mediante una dilución empleando solución de Turk (1:10); se realizó en conteo en la cámara de Neubauer, se sacó el promedio del número de células en cada uno de los cuadrantes. A continuación se describe el cálculo realizado:

**Ecuación 1** Cálculo de leucocitos totales en sangre periférica mediante la cámara de Neubauer: El primer 10 corresponde al factor de dilución y el segundo debido al factor que corresponde al espacio entre la cámara y el hematocrito; el valor obtenido corresponde al número de leucocitos por mm<sup>3</sup>

$$LT: \textit{promedio de células} \times 10 \times 10$$

Con base en los resultados de los porcentajes obtenidos en las gráficas de puntos y con los datos de la cantidad de leucocitos por mm<sup>3</sup> en sangre calculados a partir de la ecuación 1, se pudo calcular el número absoluto de cada una de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica usando el siguiente cálculo:

**Ecuación 2 Cálculo de número absoluto de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica.**

$$\#L, MO \text{ ó } PMN (mm^3) = \frac{\textit{Número de LT (mm}^3\text{)} * \% L, MO \text{ o } PMN}{100}$$

### **Obtención de células PBMCS.**

A partir del resto de sangre venosa obtenida y Solución Ficoll-Histopaque en una proporción de 2:1 se hizo la separación por gradiente centrifugando en tubos falcon a 1500 rpm por 30 minutos, se separaron la fracción correspondiente a PBMCS y se lavaron con PBS centrifugando a 1500 rpm 5 minutos. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar.

### **Activación de la fosforilación de STAT3.**

Una vez que se obtuvieron las células PBMCS se les realizó una tinción superficial con 3µL de anticuerpos αCD19-APC y αCD27-PE y 200 µL de RPMI, dejándose en incubación por una hora a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, en oscuridad. Transcurrido el tiempo se bloquearon usando 500 µL de PBS-SFB al 4% por 10 minutos; se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se re-suspendieron en el sobrenadante.

Posteriormente se repartieron en 3 tubos falcon de 5mL para citometría estériles identificados como: sin estímulo, 15 minutos y 60 minutos; una vez ya distribuidas se añadió 300µL de RPMI a cada tubo y 4 µL de IL-21r (80 ng/µL) a los tubos de 15 y 60 minutos. Se dejaron en incubación a 37°C 5%CO<sub>2</sub> sus respectivos tiempos (cabe mencionar el tubo "sin estímulo" se dejó 15 minutos).

Se paró la activación usando 100µL de solución fijadora al 16% de formaldehído por 10 minutos, se lavó usando 2 mL de PBA a 1500 rpm 5 minutos. Después, bajo condiciones normales se agregó 500 µL de metanol frío a cada tubo y se dejó incubando en hielo por 30 minutos, se lavó usando 2 mL de PBA a 1500 rpm 5 minutos.

Posteriormente se añadió 1.1µL de anticuerpo α-pSTAT3-PE diluido 1:10 con PBS 1x a cada tubo, dejándose en incubación 1 hora en hielo a oscuridad. Finalmente se lavaron con 2mL de PBA a 1500 rpm por 5 minutos y se fijaron con 200 µL de solución fijadora 1% de formaldehído para ser leídas en el Citómetro de flujo.

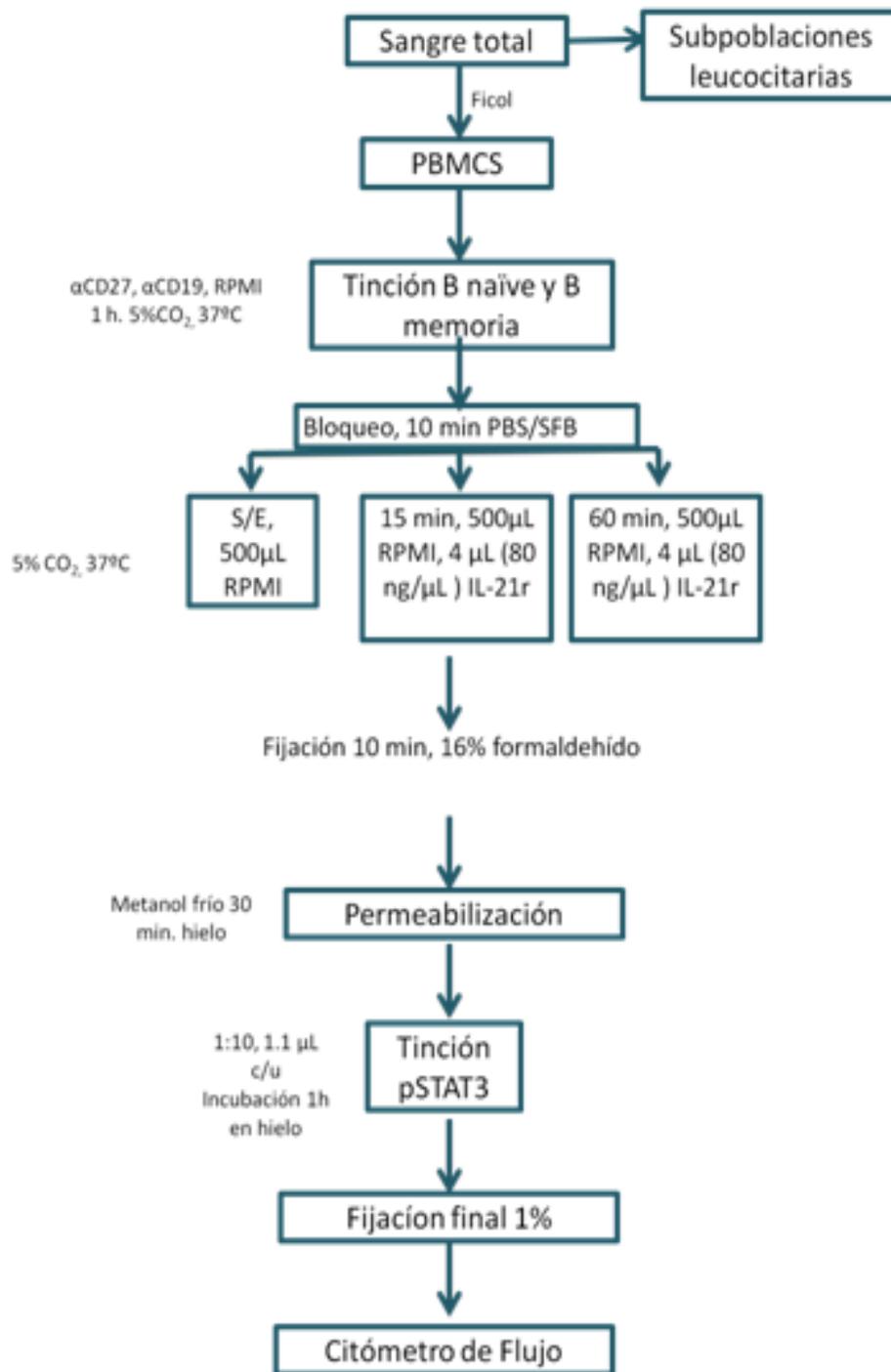
### **Lectura en el Citómetro de Flujo.**

Se empleo el Citómetro de Flujo FACS Aria de BD para realizar la lectura de las muestras. Durante la lectura se obtuvieron de 10,000 a 200,000 eventos en el clitómetro de flujo por cada una de las tinciones realizadas en cada paciente.

### **Análisis estadístico.**

Los datos demográficos, clínicos y de laboratorio importantes se resumen para las variables numéricas con mediana, mínimo y máximo o media y desviación estándar dependiendo del tipo de distribución; en el caso de las variables categóricas con frecuencias y porcentajes. El fenotipo de los pacientes se resumió con frecuencias y porcentajes. Las comparaciones de dos grupos se realizaron mediante una prueba de Mann-Whitney. Los resultados se expresan con la media y los valores de  $p$  inferior a 0.05 se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

## **Diagrama de flujo del protocolo de investigación**



**Figura 8 Metodología general de trabajo**

## RESULTADOS y ANÁLISIS.

### Características clínicas de los pacientes con IDCV.

A los 23 pacientes con los que se contó en este estudio se revisaron sus historiales clínicos con el fin de observar las condiciones en las que se encontraban cada uno, así como las características generales de sexo y edad. En la tabla 4 se enlistan los principales padecimientos hallados en la revisión así como su frecuencia en número y porcentaje de cada uno de los padecimientos. Para el caso de las inmunoglobulinas solo se muestra el promedio de cada tipo.

**Tabla 4 Características clínicas y demográficas de los pacientes con IDCV población de pacientes empleada en el estudio**

<b>Característica (n=23)</b>	<b>Frecuencia</b>	
Femeninos	15	67%
Masculinos	8	33%
Media de edad (años)	29	
Sinusitis	8	18%
Neumonía	10	23%
Bronquiectasias	4	9%
IVRS	13	30%
Otitis	6	14%
Esplenomegalias	1	2%
Linfadenopatías	3	7%
Autoinmunidad	8	18%
IVU	3	7%
Gastrointestinales	3	7%
Granulomas	1	2%
Otros	12	28%
Media IgA (mg/dL)	54.2	
Media IgG (mg/dL)	334.9	
Media IgM (mg/dL)	65.7	

En la tabla 5 se muestra un desglose detallado de las características clínicas que presentó cada paciente de acuerdo al número que le fue asignado para su identificación (con el fin de proteger su integridad):

**Tabla 5 Manifestaciones clínicas de los 20 pacientes estudiados. Otros: manifestaciones neurológicas (neuropatía, convulsiones, neuroinfección), infecciones virales (herpes, EBV, CMV), tuberculosis, diabetes, Sx de Raynaud, Sx de Sicca, asma, anemia, candidiasis (1= presenta).**

No. Paciente	Edad	Sexo	Sinusitis	Neumonía	Bronquiectasias	Infecciones en vías respiratorias superiores	Otitis	Esplenomegalia	Linfadenopatías	Enfermedades Autoinmunes	Infecciones en vías urinarias	Granulomas	Gastrointestinales	Otra
1	2	F			1									
2	5	F								1				1
3	10	F				1	1							1
4	13	F	1	1		1				1				
5	15	F	1			1			1					
6	16	F	1	1			1					1	1	1
7	16	M				1				1				1
8	17	F	1	1		1	1				1			1
9	18	M	1	1	1	1	1				1			
10	19	M				1				1			1	
11	19	F		1	1				1					
12	29	F				1				1	1			
13	34	F	1	1		1	1							1
14	35	M												1
15	36	F	1	1	1			1	1	1				
16	37	F				1				1				1
17	37	F		1		1								
18	43	M	1	1										
19	45	M			1					1			1	
20	49	M												1
21	50	F												1
22	56	F				1								1
23	67	M		1		1	1							1

Adicional a la revisión de las manifestaciones clínicas, se revisaron los niveles de inmunoglobulinas en suero reportados por el médico en el expediente de cada paciente, dichos datos se muestran a continuación en la tabla 6:

**Tabla 6 Niveles de inmunoglobulinas reportados en los historiales clínicos de los pacientes. En rojo se muestran los valores obtenidos que indican un nivel bajo del intervalo de referencia de acuerdo al grupo de edad de cada paciente. Los valores de referencia se encuentran en la tabla 21 en el anexo 1.**

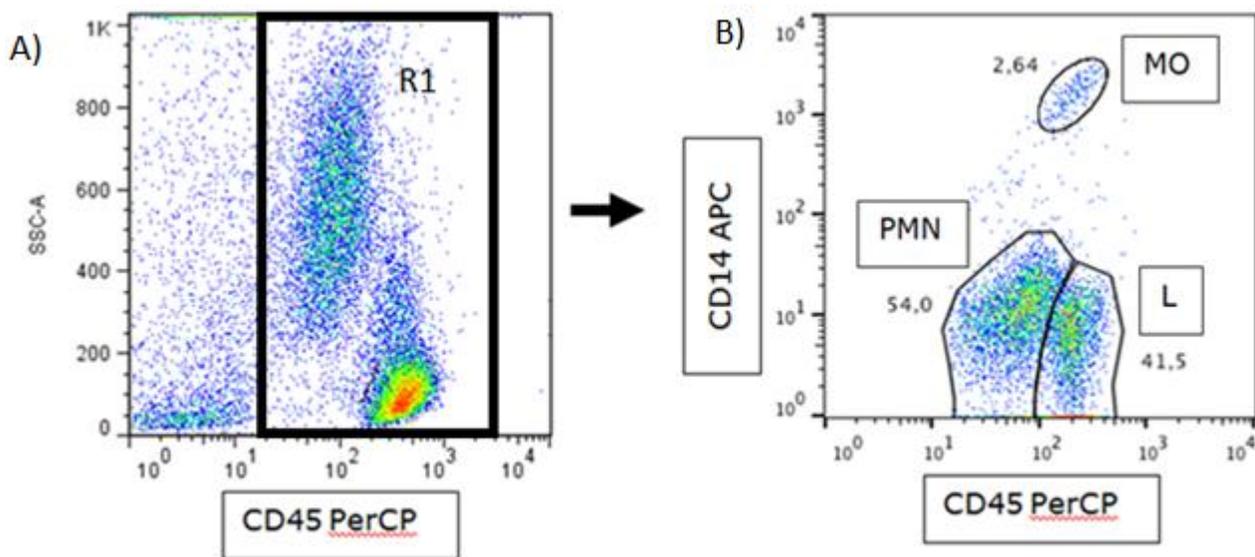
No. Paciente	Edad	Sexo	IgG mg/dl	IgM mg/dl	IgA mg/dl
1	2	F	498	40	100
2	5	F	452	37.4	45
3	10	F	616	<40	<25
4	13	F	106	<5	29
5	15	F	246	16	64
6	16	F	287	<23	36
7	16	M	356	1	2
8	17	F	498	40	100
9	18	M	320	25	25
10	19	M	530	9	10
11	19	F	183	1	3
12	29	F	300	1	28
13	34	F	<134	26	29
14	35	M	575	68	96
15	36	F	43	6.59	1
16	37	F	866	1	69
17	37	F	240	1	4
18	43	M	426	318	4
19	45	M	34	2	68
20	49	M	<200	<25	<40
21	50	F	4	252	7
22	56	F	301	1	5
23	67	M	152	402	7

Los resultados obtenidos al realizar la correlación de las manifestaciones clínicas muestran que la población de pacientes usados presenta un cuadro característico de IDCIV.

## Análisis de gráficos de puntos para las poblaciones leucocitarias.

Una vez que se tuvieron las lecturas del Citómetro de cada tinción se procedió a realizar el análisis de cada subpoblación empleando el programa FlowJo 7.6.2

Para la determinación del porcentaje de linfocitos (L), monocitos (MO) y polimorfonucleares (PMN), se partió de la tinción de CD45 Y CD14, tomando en el primer plano (A) la expresión de CD45 vs granularidad (SSA), se tomó una región R1 la cual se analizó en un segundo plano (B) mediante la expresión de CD45 vs CD14, dando como resultados tres regiones, tal como se muestra en la figura 9:



**Figura 9** Análisis de gráfico de puntos para las poblaciones de linfocitos, monocitos y PMN; se obtuvieron tres regiones a partir de la determinación de la expresión de CD45 y CD14, siendo los de mayor porcentaje de expresión de ambos marcadores los monocitos, los linfocitos expresan mayormente CD45 y los PMN una baja expresión de ambos.

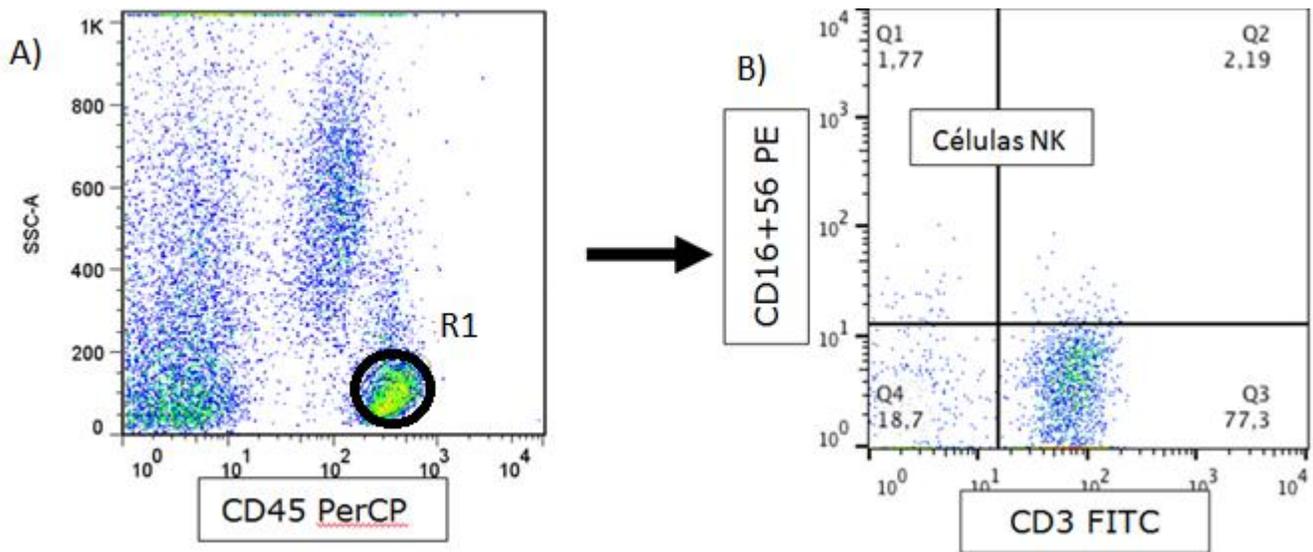
Para los resultados de los pacientes, el 22% presentó bajos niveles de leucocitos totales, el 22% de igual forma presentó porcentajes bajos de linfocitos, 4% mostró porcentajes altos de monocitos y 4% presentó porcentajes bajos en PMN. A continuación en la tabla 7 se muestran los valores de LT, L, MO y PMN en porcentajes y datos absolutos calculados de cada paciente como se describió anteriormente en la ecuación 2 para la obtención de valores totales:

**Tabla 7 Porcentajes y número absoluto de poblaciones leucocitarias en sangre periférica (linfocitos, monocitos y PMN); en rojo se muestran los valores debajo del intervalo de referencia y en azul los que se encuentran por arriba del intervalo de referencia correspondiente a la edad mostrados en el anexo 2.**

No. Paciente	Edad	Sexo	Leucocitos totales (cel/mm <sup>3</sup> )	Linfocitos %	Linfocitos (cel/mm <sup>3</sup> )	Monocitos %	Monocitos cel/m <sup>3</sup>	PMN %	PMN (cel/mm <sup>3</sup> )
1	2	F	9333	52	4853	11	1026	26	2427
2	5	F	2725	21	572	6	164	66	1799
3	10	F	2550	43	1097	11	281	38	969
4	13	F	3350	39	1307	8	268	46	1541
5	15	F	10100	12	1212	4	401	80	8080
6	16	F	10250	21	2153	5	513	72	7380
7	16	M	4900	20	980	6	294	69	3381
8	17	F	6500	26	1690	4	260	64	4160
9	18	M	10050	15	1507	6	603	77	7738
10	19	M	6100	22	1342	6	366	65	3965
11	19	F	9950	26	2587	8	796	62	6169
12	29	F	1225	13	146	5	56	78	878
13	34	F	4350	19	827	8	348	64	2784
14	35	M	4150	20	830	9	374	62	2573
15	36	F	15500	34	5270	7	1085	54	8370
16	37	F	7200	18	1296	8	574	72	5184
17	37	F	9100	30	2730	6	546	62	5642
18	43	M	12900	10	1290	5	645	77	9933
19	45	M	3400	30	1020	18	612	52	1768
20	49	M	9425	35	3299	5	471	57	5372
21	50	F	9300	18	1674	4	372	57	5301
22	56	F	8500	30	2550	3	255	66	5610
23	67	M	8900	50	4450	3	267	43	3827

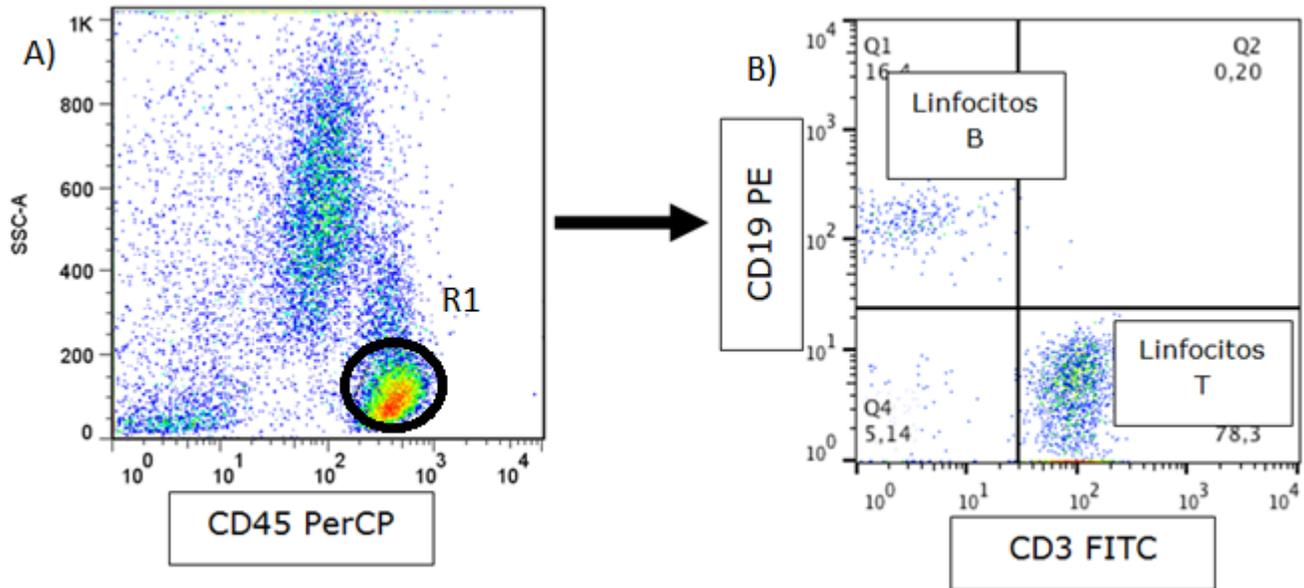
## Análisis de las poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y células NK.

Para el análisis del gráfico de puntos de la tinción para células NK se partió de la expresión de CD45+ vs granularidad (SSA) tomando una región R1 como se muestra en A en la figura 10; posteriormente se hizo la determinación del porcentaje de células NK al medir la expresión de células CD16+56+ (sumando los valores de las regiones Q1 Y Q2) como se muestra en B):



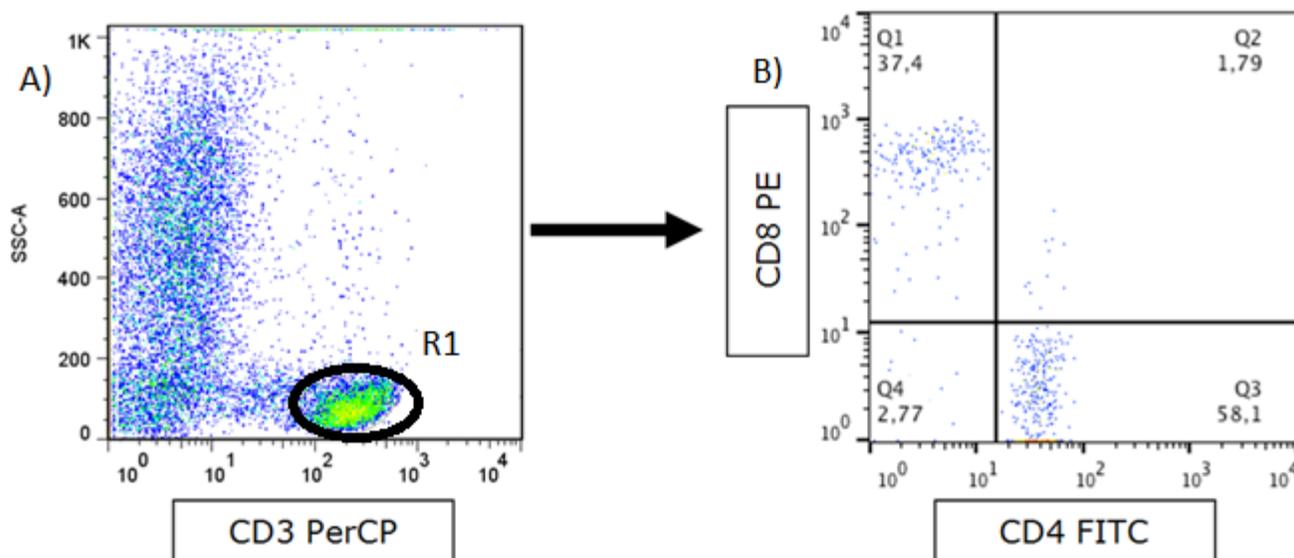
**Figura 10 Análisis poblacional de células NK. Se partió de la expresión de CD45 y de baja granularidad correspondiente a la región de linfocitos, posteriormente en B) se midió la expresión de CD3 VS CD16+56, dando el porcentaje correspondiente de células NK la suma de los cuadrantes Q1 y Q2.**

Para la determinación del porcentaje de células B y células T se partió de la misma forma de un primer plano A mediante la medición de la expresión de CD45 y la granularidad correspondiente a la zona de linfocitos, posteriormente se hizo la separación de ambas poblaciones empleando los marcadores CD19 para células B (población Q1) y CD3 para las células T (población Q3), tal como se muestra en la figura 11.



**Figura 11** Análisis de gráfico de puntos para las células B y T partiendo de la expresión de CD45 y granularidad correspondiente a la zona de linfocitos en la figura A, posteriormente se mide la expresión de CD3 vs CD19 con el fin de separa ambas poblaciones en los cuadrantes Q1 para células B y Q3 para células T.

En el caso de las proporciones de células CD4+ y CD8+ se determinaron dentro de una región R1 de células CD3+, a partir de la cual se calcularon las proporciones de células T CD4+ y CD8+ tal como se muestra en la figura 12:



**Figura 12** Análisis de gráfico de puntos para las subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+. Partiendo de la expresión de CD3+ en el primer plano A) se delimitó una región R1 la cual se evaluó la expresión de CD4 y CD8 para separar ambas poblaciones de células, mostrando a CD4+ en el cuadrante Q3 y a CD8+ en el cuadrante Q1.

Los resultados de los pacientes analizados mostraron una frecuencia de porcentaje baja para los porcentajes de células B (48%), células NK (30%) y células T CD4+ (30%). También se obtuvo un porcentaje de alguna de las poblaciones que presentaron una frecuencia alta en células T (30%) y células T CD8+ (48%).

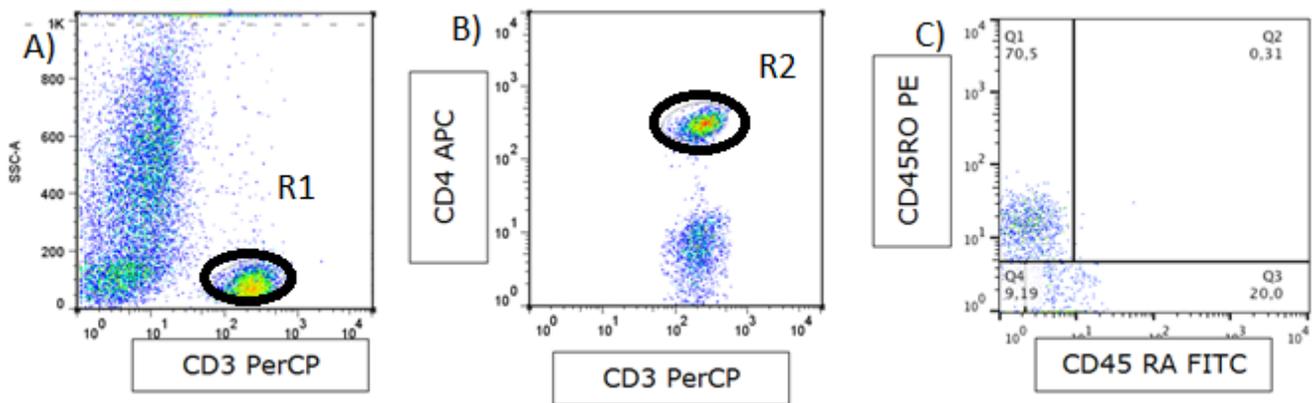
Cabe mencionar que se hizo de igual forma la determinación de la relación de CD4+/CD8+ con el fin de evaluar el equilibrio entre estas dos poblaciones dado a que es un parámetro con el fin de poder explicar algún defecto de su presente enfermedad. Como resultado se obtuvo que el 61% de los pacientes presentaron dicha relación invertida.

En la tabla 8 se presentan los valores en porcentaje de las poblaciones de células T, B y NK de los 23 pacientes analizados, así como la relación porcentual de células T CD4+/CD8+:

**Tabla 8: Valores porcentuales de las poblaciones de células T, B, NK, T CD4+, T CD8+ y la relación CD4+/CD8+. Se muestran en rojo los valores debajo de los intervalos de referencia y en azul los valores por arriba de los intervalos de referencia mostrados en el anexo 2.**

No. Paciente	Edad	Sexo	CD19 %	CD16+56 %	CD3 %	CD4 %	CD8 %	RELACION CD4+/CD8+
1	2	F	1	26	74	83	8	10.4
2	5	F	9	7	87	64	34	1.9
3	10	F	1	8	88	35	50	0.7
4	13	F	7	10	83	45	53	0.8
5	15	F	22	0.5	70	42	53	0.8
6	16	F	2	3	93	64	33	1.9
7	16	M	5	3	64	33	64	0.5
8	17	F	19	3	76	80	18	4.4
9	18	M	16	5	70	16	81	0.2
10	19	M	15	17	68	42	56	0.8
11	19	F	3	23	79	72	26	2.8
12	29	F	21	8	59	45	47	1.0
13	34	F	18	19	66	41	54	0.8
14	35	M	5	14	67	22	60	0.4
15	36	F	8	9	64	62	35	1.8
16	37	F	17	17	71	25	76	0.3
17	37	F	20	8	70	47	47	1.0
18	43	M	3	11	73	35	62	0.6
19	45	M	19	17	54	60	32	1.9
20	49	M	7	12	84	12	86	0.1
21	50	F	11	13	77	25	72	0.3
22	56	F	20	6	75	38	58	0.7
23	67	M	6	6	89	18	80	0.2

Para medir la proporción de células CD4+ de memoria y naive (CD45RO y CD45RA respectivamente) se partió de la región correspondiente a la expresión de CD3 en el primer plano A, posteriormente se hizo la evaluación de la expresión de CD4+ tomando la población positiva para ambos marcadores (CD3 y CD4) tal como se muestra en B. Finalmente en el plano C se hizo la separación de ambas poblaciones de células T CD4 mediante la expresión de CD45RA para las células naive las cuales se aprecian en el cuadrante Q3 y la expresión de CD45RO para las células de memoria, estas se aprecian en el cuadrante Q1 de la figura 13.



**Figura 13** Análisis de gráfico de puntos para la determinación de los porcentajes de las poblaciones de células T CD4+ me memoria y naive. Se partió de la expresión de CD3 en la figura A) tomando a la región R1, posteriormente se tomó la población que corresponde a la región R2 (siendo positiva para CD4) en B), finalmente se obtuvieron las dos poblaciones de memoria y naive al medir la expresión de CD45RO (Q1) y CD45RA (Q3).

Se hizo la determinación de células T CD4+/ CD45RA+ y T CD4+/CD45RO+ en 14 testigos con el fin de tener un parámetro de comparación respecto a los porcentajes determinado en pacientes; a continuación en la tabla 9 se muestran los resultados:

**Tabla 8 Valores porcentuales de células T CD45RA+ y células T CD45RO+ de los 14 testigos.**

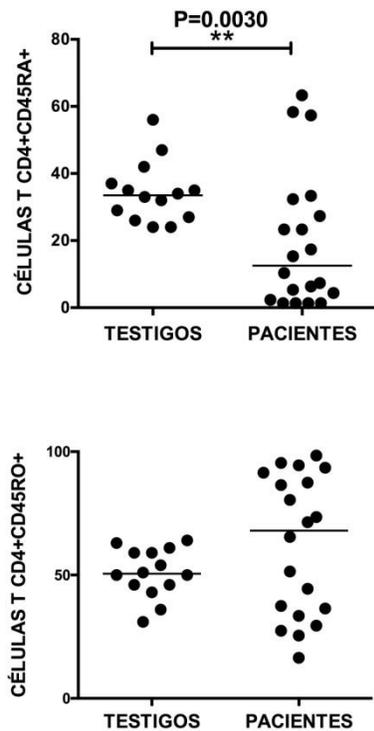
<b>No testigo</b>	<b>%CD45RA</b>	<b>%CD45RO</b>
1	33	59
2	29	54
3	34	50
4	37	46
5	32	43
6	35	50
7	56	31
8	26	61
9	35	51
10	47	46
11	24	64
12	27	63
13	24	59
14	42	36

En la tabla 10 se muestran los valores en porcentajes de las subpoblaciones de células T CD4+/CD45RA+ y T CD4+/CD45RO+ de los 23 pacientes analizados, de los cuales el 65% presentaron valores bajos de células T CD45RA+, el 13% presenta valores de CD45RO+ bajos y el 48% tiene valores de CD45RO+ altos:

**Tabla 9 Valores porcentuales de células T CD45RA+ y CD45RO+ de los 23 pacientes, En rojo se muestran los valores debajo de los intervalos de referencia y en verde los valores por arriba de este, el intervalo se muestra en el anexo 2.NSD: no se determinó.**

No. Paciente	Edad	Sexo	CD45RA %	CD45RO %
1	2	F	2	95
2	5	F	57	25
3	10	F	1	86
4	13	F	1	98
5	15	F	58	37
6	16	F	6	94
7	16	M	5	80
8	17	F	63	16
9	18	M	27	65
10	19	M	33	51
11	19	F	NSD	NSD
12	29	F	NSD	NSD
13	34	F	4	87
14	35	M	7	93
15	36	F	15	36
16	37	F	32	27
17	37	F	23	71
18	43	M	NSD	NSD
19	45	M	17	29
20	49	M	1	73
21	50	F	1	91
22	56	F	23	33
23	67	M	10	44

Teniendo estos dos grupos se realizó un análisis estadístico empleando la prueba U de Mann-Whitney para hacer la comparación de las dos poblaciones entre paciente y testigos; en la figura 14 se muestran los resultados obtenidos:



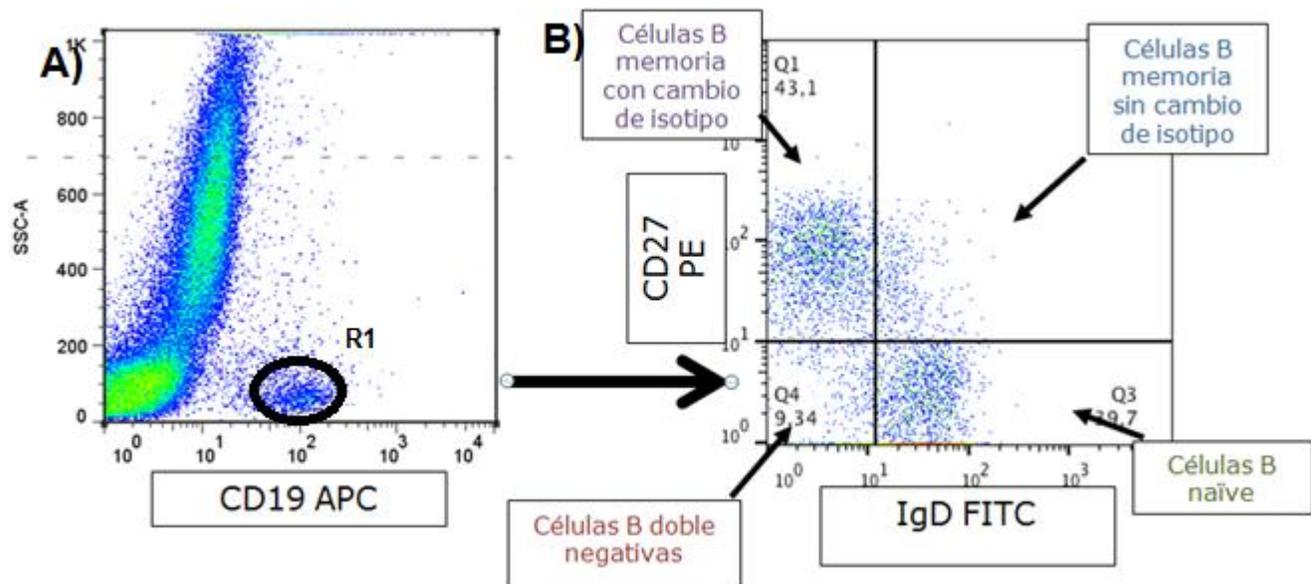
**Figura 14** Gráfica de desviación de datos de poblaciones CD45RA+ y CD45RO+ entre testigos y pacientes. Para las células T CD4+ naive se obtuvo una diferencia significativa ( $p=0.0030$ ) donde se aprecia que los valores de los pacientes son más bajos que los testigos. En cambio en la figura de abajo, correspondiente al análisis entre las células T CD4+ de memoria entre testigos y pacientes, se obtuvo una división de dos poblaciones en el caso de los pacientes.

Una vez que se terminaron de analizar las poblaciones generales de leucocitos, es necesario adentrarse en el análisis de las subpoblaciones de células B, las cuales forman parte fundamental en el desarrollo de este trabajo.

### **Análisis de subpoblaciones de células B.**

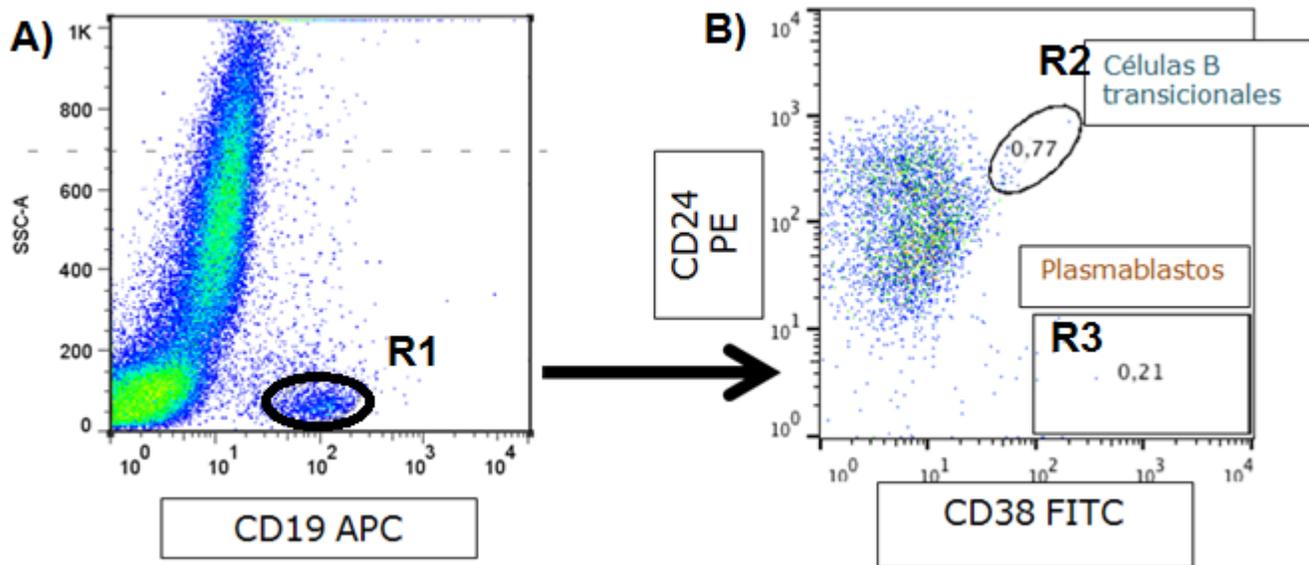
Para el análisis de subpoblaciones de B se realizaron tres tinciones para la cuantificación de 9 poblaciones de células B. En el primer análisis mostrado en la figura 15 se procedió a tomar una región R1, tal como se muestra en el plano A, a partir de esta región se hizo la separación de las células B naive (cuadrante Q3), células B de memoria con cambio de isotipo (cuadrante Q1), sin cambio de isotipo (cuadrante Q2), la suma de ambas poblaciones corresponde al porcentaje

de células B de memoria total. Finalmente el cuadrante Q4 representa a la población de células B doble negativas.



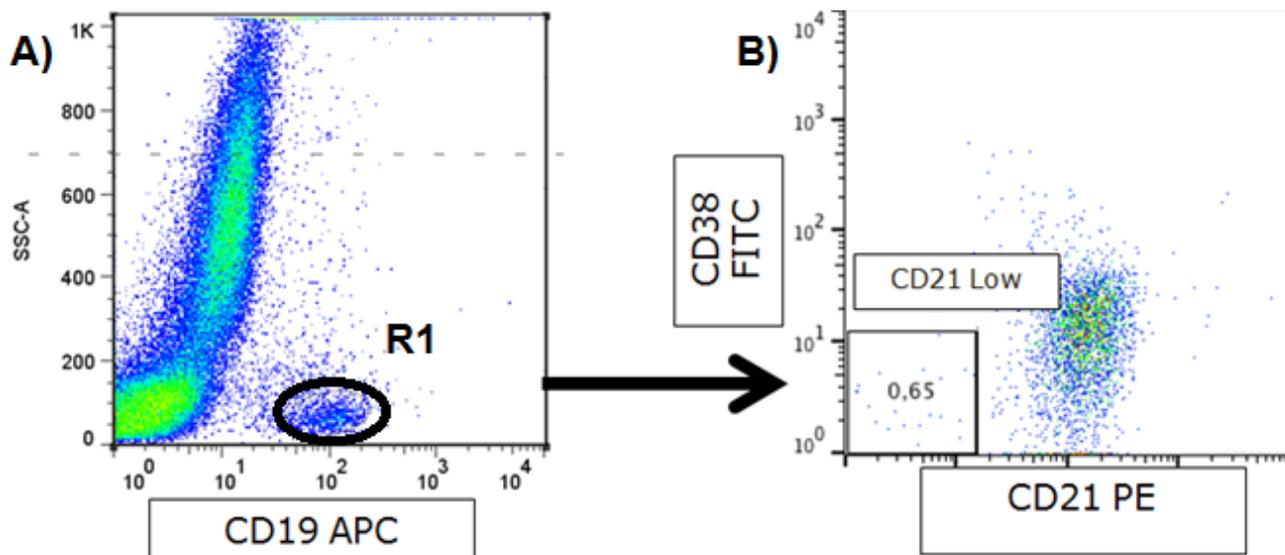
**Figura 15** Análisis de gráfico de puntos para la determinación del porcentaje subpoblaciones de células B: células B naïve, memoria con cambio y sin cambio de isotipo y doble negativas. En el plano A) se delimitó una región R1 a partir de la expresión de CD19 vs granularidad (SSA) correspondiente a la zona de linfocitos, posteriormente en el plano B) se midió la expresión de IgD vs la expresión de CD27. Como resultado se obtuvieron: células B naïve en el cuadrante Q3 las cuales expresan el fenotipo de CD27-/IgD+, células B de memoria con cambio de isotipo en el cuadrante Q1 con el fenotipo CD27+/IgD-, células B de memoria sin cambio de isotipo en el cuadrante Q2 con el fenotipo CD27+/ IgD+ y en el cuadrante Q4 se obtuvo el porcentaje correspondiente a las células B doble negativas con un fenotipo CD27-/IgD-.

En el caso de la determinación del porcentaje de células B transicionales y plasmablastos se empleó la expresión de CD24 y CD38 como marcadores para la obtención de dichas poblaciones. En la figura 16 se aprecia el procedimiento realizado a partir de la expresión de CD19 en el plano A), a partir de ahí se obtuvieron ambas poblaciones en el plano B), siendo la región R2 correspondiente al porcentaje de células B transicionales y R3 para los plasmablastos.



**Figura 16** Análisis del gráfico de puntos correspondiente a las poblaciones de células B transicionales y plasmablastos. A partir del plano A se obtuvo la población de células B empleando el marcador CD19, de esa región se analizó la expresión de CD38 y CD24 en el plano B). En el caso las células B transicionales presentaron un fenotipo de CD38+/CD24++ (región R2), finalmente para el caso de los plasmablastos su fenotipo se representa como CD38+/CD24- (región R3).

En la determinación del porcentaje de CD21bajo o CD21low se empleó como marcador de expresión a CD38 y CD21. Para ello se partió de un primer plano A) correspondiente a las células B, de ahí se procedió a la obtención de células B CD21bajo en el plano B) tal como se muestra en la figura 17:



**Figura 17** Análisis del gráfico de puntos para la determinación de células B CD21low. Se partió de una población correspondiente en el plano A) a las células B mediante el uso del marcador CD19 (R1), pasando al plano B) se obtuvo el porcentaje de células CD21 low mediante el fenotipo de CD38-/CD21-.

Los porcentajes obtenidos de los pacientes analizados mostraron que el 22% de ellos presentaban niveles bajos de células B naive y el 39% niveles altos. El 52% presento porcentajes bajos de células B de memoria total y el 13% niveles altos; para el caso de las células B sin cambio de isotipo el 48% de los pacientes tuvo porcentajes bajos y el 22% porcentajes altos, para el caso de las células B de memoria con cambio de isotipo el 65% de los pacientes estuvo presentó niveles bajos en esta población y solo el 9% niveles altos.

Para el caso de las células B doble negativa el 35% de los pacientes tuvo valores arriba de los intervalos de referencia. Por lo que respecta a las células B transicionales el 39% presentó porcentajes bajos y un 17% porcentajes altos; en lo que concierne a los plasmablastos el 83% de los pacientes presentó valores bajos; finalmente en las células CD21low el 17% tuvo valores bajos y otro 22% tuvo valores altos respecto a los intervalos de referencia.

Cabe mencionar la importancia del análisis de las poblaciones de CD21low y células B doble negativa, ya que se ha visto una relación del aumento de ambas poblaciones en procesos de autoinmunidad.

En la tabla 11 se muestran los valores porcentuales de las subpoblaciones de B de los 23 pacientes analizados, así como la clasificación de Freiburg asignada para cada uno:

**Tabla 10 Valores porcentuales de subpoblaciones de células B. En rojo se muestran los valores debajo de los intervalos de referencia de cada subpoblación y en azul los que están por arriba de este, los intervalos se muestran en el anexo 2.**

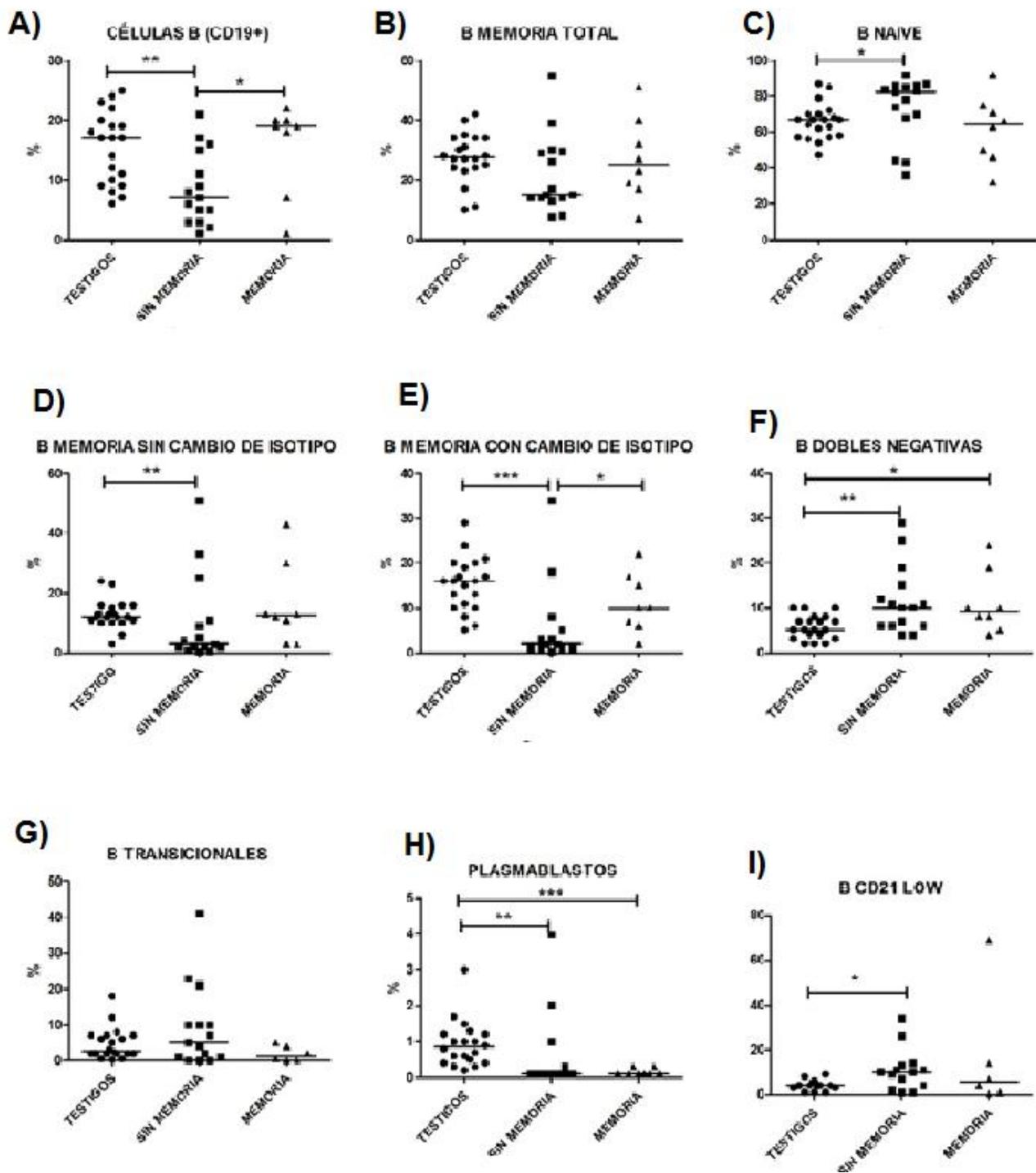
No. Paciente	Edad	Sexo	Célula B naive %	Célula memoria %	Célula B memoria sin cambio de isotipo %	Célula B memoria con cambio de isotipo %	Células B doble negativa%	Célula B transicionales %	Plasmablastos %	CD21 Low %	Clasificación de Freiburg
1	2	F	46	35	13	22	19	<0.1	<0.1	69	2
2	5	F	43	51	33	18	6	7	4	10	1B
3	10	F	70	0.5	0.5	<0.1	29	<0.1	<0.1	11	1B
4	13	F	85	5	4	1	10	10	<0.1	34	1A
5	15	F	63	13	3	10	24	0.5	<0.1	1	2
6	16	F	92	1	0.7	0.3	7	41	2	10	1B
7	16	M	44	53	51	2	4	<0.1	<0.1	14	1B
8	17	F	66	26	11	15	8	2	<0.1	0.5	2
9	18	M	74	1	1	<0.1	25	23	<0.1	1	1B
10	19	M	68	28	25	3	4	2	<0.1	13	1B
11	19	F	36	45	11	34	19	<0.1	<0.1	2	1B
12	29	F	83	12	9	3	6	1	<0.1	4	1B
13	34	F	32	60	43	17	8	<0.1	<0.1	5	2
14	35	M	78	10	2	8	12	10	<0.1	9	1B
15	36	F	82	3	2	1	15	21	<0.1	26	1A
16	37	F	87	3	2	1	11	1	0.3	11	1B
17	37	F	50	40	30	10	10	<0.1	<0.1	14	2
18	43	M	84	7	5	2	10	4	<0.1	7	1A
19	45	M	71	19	13	6	10	4	0.3	4	2
20	49	M	75	19	12	7	5	<0.1	<0.1	21	2
21	50	F	86	4	3	1	11	5	<0.1	13	1B
22	56	F	92	5	3	2	4	5	0.3	7	2
23	67	M	86	7	2	5	6	0.2	1	1	1B

## **Análisis estadístico de subpoblaciones de células B.**

Mediante el uso del programa GraphPad Prism versión 5.01 se realizó el análisis estadístico de las poblaciones leucocitarias determinadas por citometría de flujo mediante la separación de los pacientes en dos grupos de acuerdo a la clasificación de Freiburg: sin memoria que corresponde al grupo 1A y 1B (porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo menor al 0.4% respecto al total de linfocitos) con 8 pacientes y con memoria correspondiente al grupo 2 (porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo mayor al 0.4%) con 15 pacientes.

Adicionalmente se hizo la comparación usando un grupo de 20 testigos como control (10 masculinos y 10 femeninos con una media de edad de 15.6 años). Dichos testigos se tomaron de una base de datos de la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias Primarias del INP (datos no mostrados).

En la figura 18 se muestran los correspondientes gráficos al análisis estadístico de dichas poblaciones:



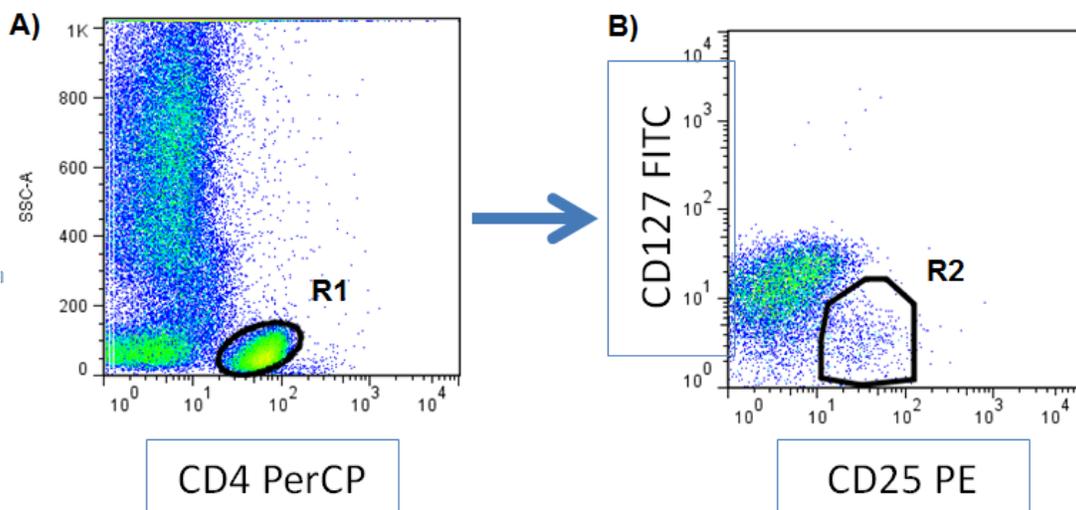
**Figura 18 Gráficas del estadístico de porcentajes de subpoblaciones de células B entre testigos (n=20), pacientes con memoria(n=15) y sin memoria (n=8).** Se empleó el programa GraphPad Prisma 5.01 usando la prueba U de Mann-Whitney para la determinación. **A)** Corresponde a la población de células B donde se obtuvo diferencia significativa entre testigos y pacientes sin células B de memoria ( $p < 0.001$ ) y entre ambos grupos de pacientes ( $p < 0.05$ ). **B)** Corresponde a la población de memoria total, no hubo diferencias significativas. **C)** Corresponde a la población de células B naive, se obtuvo diferencia significativa entre testigos y pacientes sin células B de memoria ( $p < 0.05$ ). **D)** Corresponde a la subpoblación de células B de memoria sin cambio de isotipo, aquí se obtuvo diferencia significativa entre el grupo testigo y los pacientes sin células B de memoria ( $p < 0.05$ ). **E)** Corresponde a la subpoblación de células B de memoria con

cambio de isotipo, en este caso se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo testigo y pacientes sin células B de memoria ( $p < 0.0001$ ) y entre ambos grupos de pacientes ( $p < 0.05$ ). **F**) Población de células B doble negativas, en este caso se obtuvieron diferencias significativas en ambos grupos de pacientes respecto al grupo testigo ( $p < 0.001$  para el grupo de pacientes sin células B de memoria y  $p < 0.05$  para el grupo de pacientes con células B de memoria). **G**) Representa la subpoblación de células B transicionales. **H**) Se presenta la población de plasmablastos; de igual forma se presentaron diferencias significativas de ambos grupos de pacientes respecto al testigo ( $p < 0.001$  para el grupo de pacientes sin células B de memoria y  $p < 0.0001$  para el grupo de pacientes con células B de memoria). **I**) Representa la subpoblación de CD21low donde se obtuvo diferencia significativa ente el grupo testigo y los pacientes sin células B de memoria.

### **Análisis de linfocitos T reguladores.**

Dado a que en el grupo de pacientes con IDCV existe un porcentaje de ellos que presentan alguna manifestación autoinmune, se analizó la población de células T reguladoras (T regs) mediante el marcador de CD127low, el cual es un indicador de la proporcionalidad de células T regs presentes en sangre.

Para la obtención del porcentaje de células T regs se partió de la expresión del marcador CD4+ vs granularidad en un plano A), de esa región se procedió a seleccionar a la población R2 en un plano B) la cual corresponde a T regs. Tal como se muestra en la figura 19:



**Figura 19** Análisis de gráfico de puntos para la determinación de T regs. Se partió de una región CD4+ (R1) en el plano A), de esa población se midió la expresión de CD127

**VS CD25, de la cual se obtuvo la población de células T regs (R2) cuyo fenotipo corresponde a CD25+/CD127.**

Se hizo la determinación de CD127low a partir de la población de células T CD4+/CD25+ en 14 testigos con el fin de tener una referencia. En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de dichos testigos, de los cuales se obtuvo un promedio de 3.8%.

**Tabla 11 Valores porcentuales de células T reguladoras CD127 low en testigos(n=14, 12 femeninas y 2 masculinos) NSD: No se determinó.**

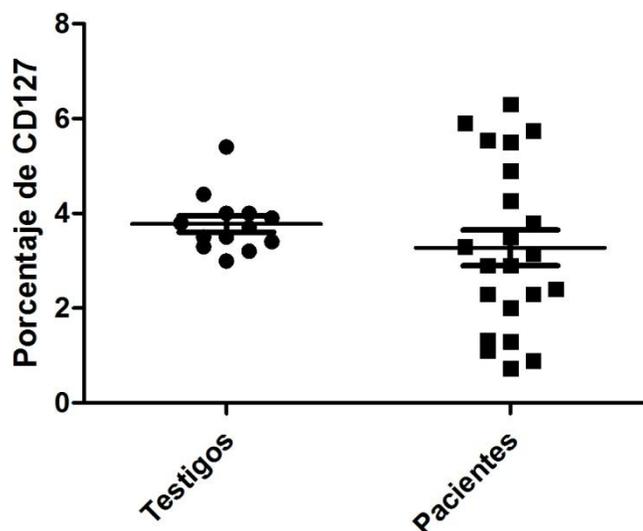
<b>No. testigo</b>	<b>Sexo</b>	<b>CD4+/CD25+/CD127low</b>
1	F	4
2	F	3.5
3	F	3.4
4	M	3
5	F	3.3
6	F	3.5
7	F	3.7
8	F	4.4
9	F	3.9
10	F	5.4
11	F	NSD
12	F	4
13	F	3.2
14	M	3.8
<b>Promedio:</b>		<b>3.8</b>

En la tabla 13 se muestran los datos porcentuales de células T reguladoras (CD4+/CD25+/CD127Low) de los pacientes analizados, de los cuales se obtuvo como resultado un porcentaje de 56% de los pacientes con bajos niveles de células T CD127low basándose en el porcentaje promedio obtenido del grupo de testigos:

**Tabla 12 Valores porcentuales de células T reguladoras CD127 low en pacientes, en rojo se muestran los valores que están por debajo del promedio de referencia determinado en los testigos (3.8%);**

No. Paciente	CD127 low %
1	5.75
2	3.8
3	NSD
4	0.73
5	5.9
6	0.9
7	2
8	2.3
9	2.9
10	1.1
11	4.9
12	3.3
13	1.33
14	5.55
15	2.4
16	1.3
17	2.3
18	3.5
19	2.9
20	3.15
21	4.26
22	5.5
23	6.3

Adicionalmente se realizó un análisis comparativo usando de igual forma la U de Mann-Whitney para la comparación de ambos grupos, no se obtuvo diferencia significativa. En la figura 20 se observa la gráfica de dispersión de datos de ambos grupos, la cual muestra una distribución muy amplia en el caso de los pacientes respecto a los testigos, los cuales se llegan a concentrar en una sola población.



**Figura 20 Gráfica de dispersión de porcentajes de células CD127low en testigos (n=14) y pacientes con IDCV (n=23).**

### **Resultados del análisis funcional de pSTAT3.**

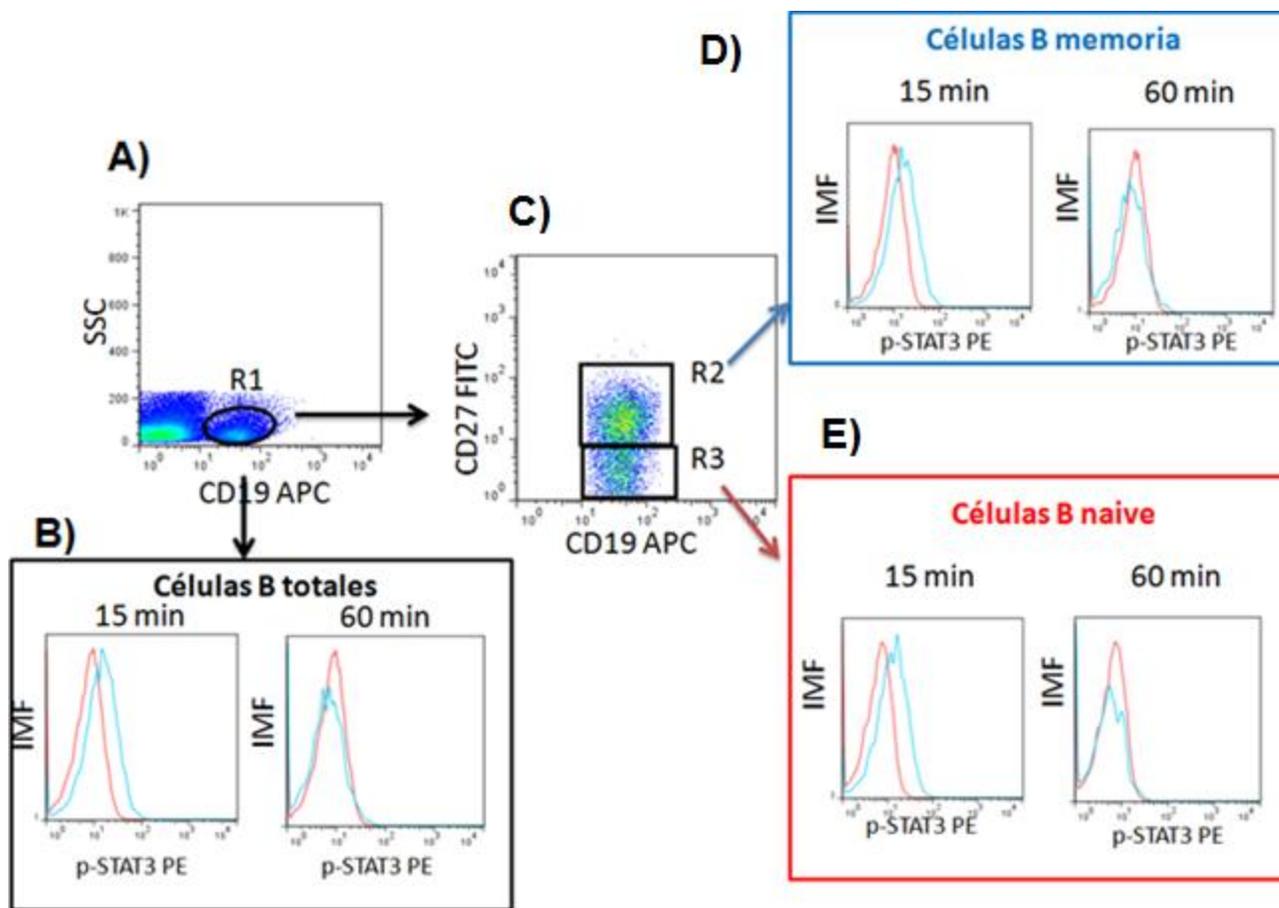
Se hizo la determinación de fosforilación de STAT3 a partir de la obtención de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de pSTAT3 en testigos y pacientes a diferentes tiempos (15 y 60 minutos) teniendo como control un "sin estímulo".

Como se muestra en la figura 21 se partió mediante la selección de una región R1 CD19+ (plano A) de ahí se derivaron a dos planos diferentes. En el plano B se da la realizó la determinación de IMF de pSTAT3 en células B totales a las tres condiciones establecidas (sin estímulo, 15 y 60 minutos).

En el plano C) se obtuvieron las poblaciones de células B de memoria (R2) y células B naive (R3). A partir de la región R2 se analizó el plano D) del cual se evaluó la IMF de pSTAT3 en células B de memoria en las tres condiciones establecidas.

Por último a partir de la región R3 se analizó un plano E) del cual se obtuvo la IMF de pSTAT3 en células B naive en las tres condiciones planteadas.

Este proceso se realizó tanto en testigos como en pacientes con IDCV.



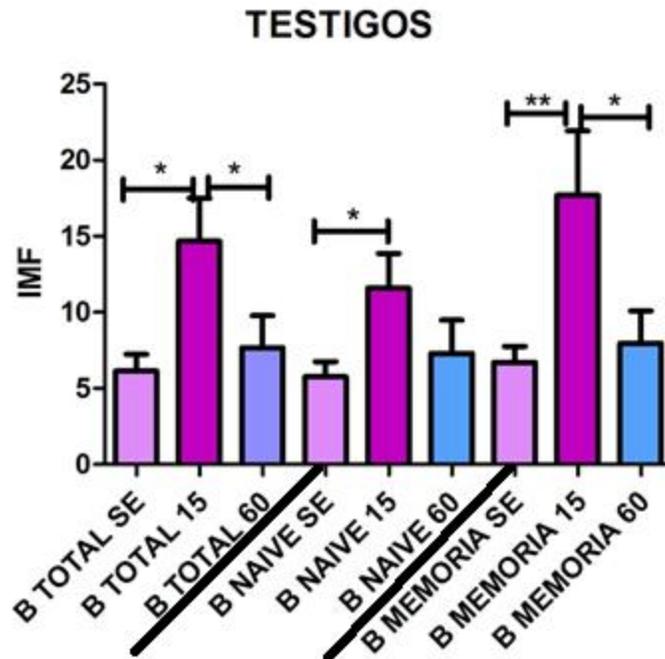
**Figura 21** Análisis de gráfico de puntos y obtención de histogramas de IMF de pSTAT3 en condiciones de sin estímulo, 15 y 60 minutos de activación con IL-21r (80ng/μL). A) Se hizo el análisis partiendo de la delimitación de la región R1 correspondiente a la población de células B (CD19+) de ahí se deriva a los planos B) ( histogramas de IMF de pSTAT3 en células B totales) y C) delimitación de las regiones R2 (células B de memoria CD27+) y R3 (células B naive CD27-). D) Histogramas de IMF de pSTAT3 en células B de memoria. E) Histogramas de IMF de pSTAT3 en células B naive.

En la tabla 14 se muestran los valores de IMF-pSTAT3 en células B total, naive y memoria de los 10 testigos analizados:

**Tabla 13 Valores de IMF pSTAT3 de testigos en células B (totales, naive y memoria).**

No testigo	B total			B naive			B memoria		
	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min
1	7.64	8.52	6.53	6.75	7.98	6.18	8.78	10.4	7.58
2	2.71	4.81	2.49	2.54	4.39	2.77	3.18	5.99	2.43
3	3.42	30.4	4.18	2.71	5.67	2.98	5.07	46.5	6.13
4	12.8	19.3	17.2	12.5	19.1	18.1	NA	NA	NA
5	9.82	27.6	22.2	9.34	27.3	21.9	10.8	27.7	24.1
6	9.13	17.6	7.92	7.07	15.5	6.07	10.7	18.9	9.14
7	2.83	14.2	3.46	4.18	12.3	3.01	2.47	18.7	4.82
8	4.83	6.18	4.11	4.76	5.91	3.54	8.05	10.2	6.61
9	3.29	8.33	6.01	2.93	7.96	5.84	4.05	9.18	6.49
10	4.89	9.92	2.74	4.74	9.81	2.6	7.34	11.7	4.46
Promedio	6.14	14.69	7.68	5.75	11.59	7.30	6.72	17.70	7.97

Como parte de un control se hizo un análisis estadístico empleando la prueba de Mann-Whitney entre los testigos comparando los diferentes tiempos entre sí en cada una de las tres poblaciones, esto con el fin de tener una aseguración de la fosforilación y desfosforilación en testigos empleados. Esto se muestra en la figura 22.



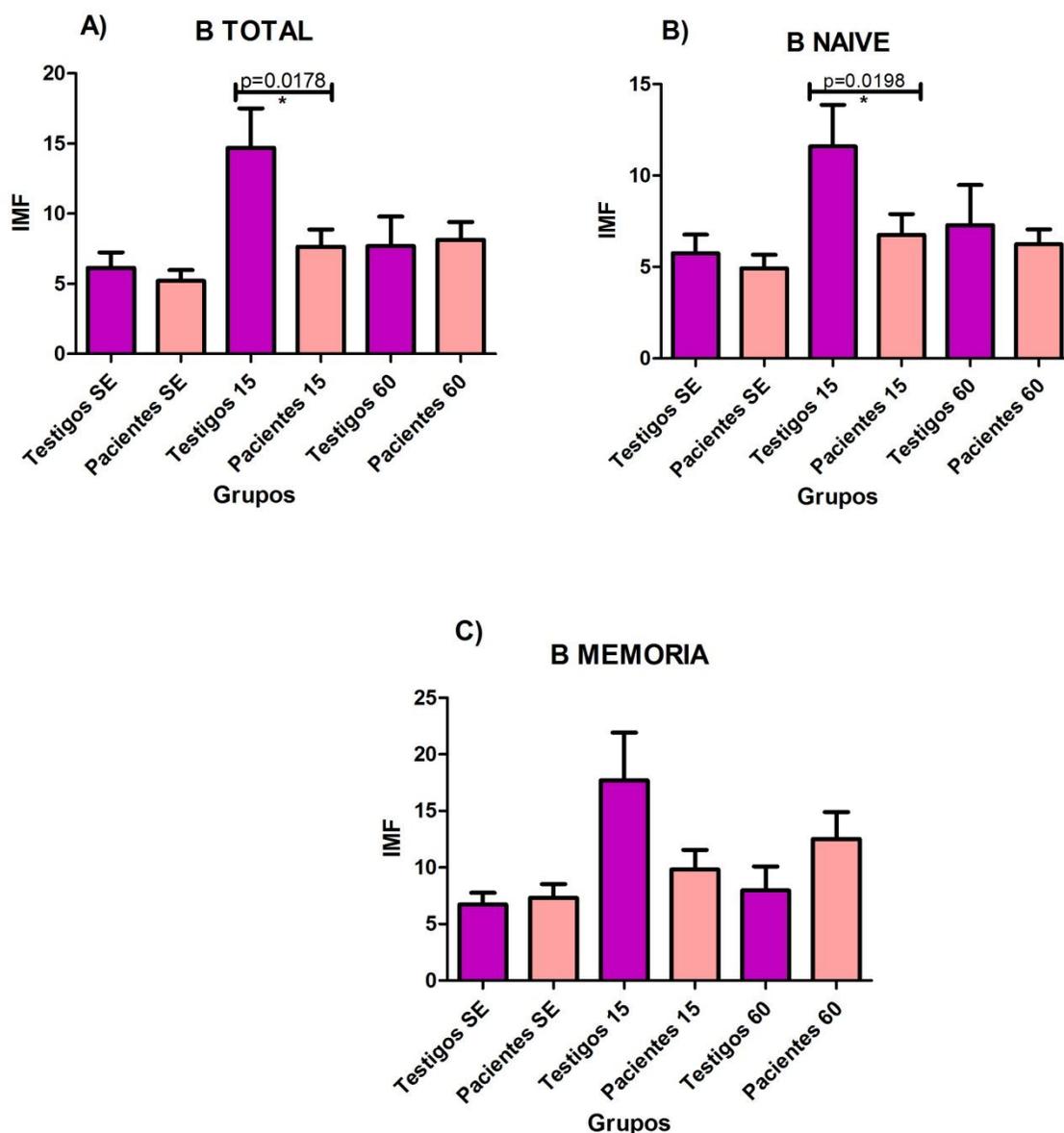
**Figura 22** Gráficas de los datos promedios de pSTAT3 en los testigos a diferentes tiempos y en cada una de las poblaciones de células B evaluadas. (n=10). Las diferencias significativas obtenidas ( $p < 0.05$ ) se dieron principalmente entre las condiciones de 15 minutos y sin estímulo, no obstante en el caso de la subpoblación de células B de memoria, fue más marcada la diferencia entre estas condiciones ( $p < 0.001$ ).

En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de IMF de pSTAT3 en células B total, naive y memoria de los 23 pacientes analizados, cabe mencionar que debido al bajo porcentaje de memoria de algunos de ellos (pacientes 3, 7, 8 y 9) el análisis solo se pudo realizar el células B totales y naive:

**Tabla 14** Valores de IMF pSTAT3 de pacientes en células B (totales, naive y memoria).

No. Paciente	B total			B naive			B memoria		
	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min
1	3.12	4.97	2.63	2.88	4.12	2.56	3.31	8.64	2.95
2	3.33	11.1	3.9	2.98	3.77	2.94	3.88	6.53	5.28
3	2.93	13	5.11	2.92	12.6	4.33	NSD	NSD	NSD
4	5.55	6.9	9.49	5.06	5.7	9.19	16	15.1	20.2
5	3.35	4.72	3.63	3.24	4.58	3.47	4.26	5.12	4.22
6	1.9	2.63	3.45	1.89	2.61	3.18	2.21	2.89	3.93
7	2.08	2.7	2.11	2.08	3.37	2.11	NSD	NSD	NSD
8	3.45	4.1	2.59	3.18	4.14	2.16	NSD	NSD	NSD
9	9.04	10	12	9.02	9.47	11.8	NSD	NSD	NSD
10	5.9	5.35	4.79	5	4.58	4.43	11.9	15.4	8.21
11	13.7	18.8	10.1	12.7	18.5	7.35	15.1	19.5	13.1
12	12.1	12.9	10.6	12.2	12.5	10	15	15.8	11
13	2.5	4.53	2.59	2.42	4.22	2.37	2.61	5.09	2.67
14	1.39	1.67	1.52	1.37	1.65	1.39	1.74	1.97	3.91
15	2.4	3.15	6.08	2.43	3.16	5.29	3.03	3.82	11.7
16	2.27	2.5	13.5	2.09	2.11	11.9	1.97	4.89	16.5
17	11.9	22.6	16.6	11.1	21.4	15.5	13.1	23.6	19.5
18	10	9.13	4.33	10.1	8.93	4.01	14.08	10.9	5.41
19	3.67	1.9	7.34	3.69	1.89	6.95	3.45	1.4	8.5
20	7.01	14.5	9.85	6.43	13	9.72	9.28	21.5	13
21	6.56	13.605	26.685	5.05	7.51	7.67	8.07	19.7	45.7
22	2.91	2.61	13	2.47	2.61	9.95	6.45	2.91	26.1
23	2.58	2.21	15.2	3.2	3	5.41	3.73	1.68	15.9
Promedio	5.20	7.63	8.13	4.93	6.76	6.25	7.32	9.81	12.51

En la figura 23 se muestran las gráficas de los valores promedios obtenidos de la IMF de pSTAT3 de las tres poblaciones de B evaluadas, así como el resultado de los análisis estadísticos efectuados.



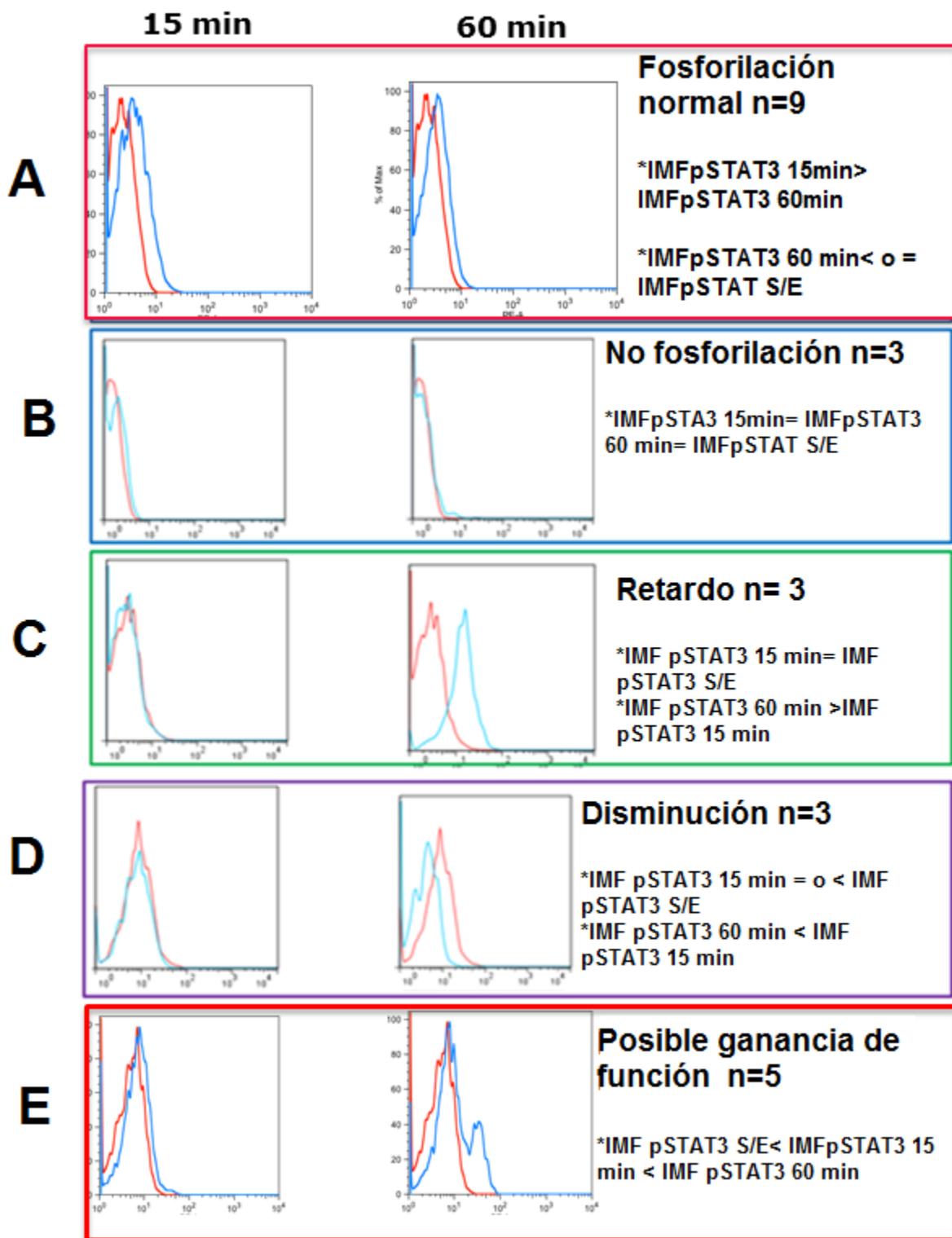
**Figura 23** Gráficas de datos de IMF pSTAT3 de testigos y pacientes. **A)** Población de células B totales donde se obtuvo una diferencia significativa entre los grupos a los 15 minutos ( $p=0.0178$ ). **B)** Población de células B naive, de igual forma se obtuvo diferencia significativa a los 15 minutos ( $p=0.0198$ ). **C)** Población de células B de memoria. No hubo diferencia significativa en esta población.

Al observar las tendencias de las gráficas obtenidas de la figura 23, si bien no hay diferencia significativa entre los grupos, se observó una tendencia de aumento en la IMF del grupo de pacientes.

Debido a esto se decidió analizar el patrón de fosforilación de forma individual de cada paciente en cada una de las oblaciones evaluadas. Una vez realizado esto, se obtuvieron cinco diferentes patrones en el comportamiento de la fosforilación de STAT3, los cuales se nombraron como:

1. Fosforilación normal.
2. No fosforilación.
3. Retardo.
4. Disminución.
5. Posible ganancia de función.

Esta idea surge a partir de la necesidad de poder evaluar y clasificar de manera adecuada a los pacientes empleados en este trabajo. Para ellos se tomó como referencia el trabajo de Ferrer (59). Los criterios de selección para cada grupo se muestran en la figura 24 junto con un ejemplo del patrón de fosforilación-desfosforilación de cada caso.



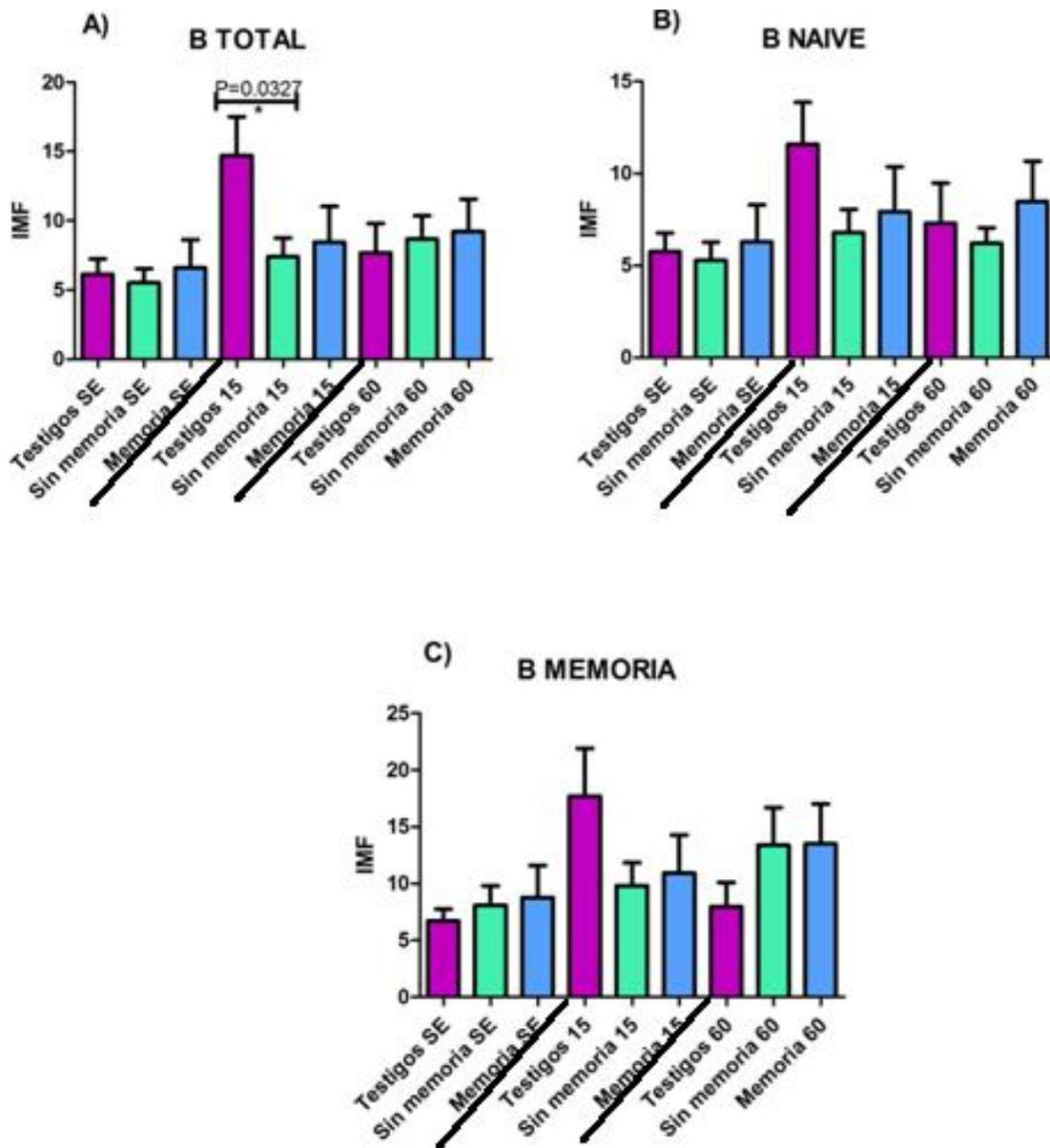
**Figura 24 Casos propuestos para la clasificación de los pacientes a partir del patrón de fosforilación de pSTAT3 y sus criterios. A.** En el primer, fosforilación normal (n=9) la tendencia esperada es similar a la de los testigos (IMF pSTAT3 a los 15 min es mayor que la IMF pSTAT3 S/E y que la IMF pSTAT3 a los 60 min). **B.** En el segundo caso, no fosforilación (n=3) la IMF no cambia en ninguna de las condiciones (IMF pSTAT3 S/E = IMF pSTAT3 15 min = IMF pSTAT3 60 min). **C.** En el tercer caso, retardo (n=3) la tendencia mostrada es de un aumento en

la fosforilación hasta pasado los 60 minutos después de la activación (IMF pSTAT3 60 min mayor que la IMF pSTAT3 15 min, ésta a su vez es igual a la IMF pSTAT3 S/E). **D.** En el cuarto caso (disminución) como su nombre lo indica, el valor de IMF de pSTAT3 va disminuyendo conforme al tiempo. **E.** En el caso de posible ganancia de función la tendencia consiste en un aumento de la IMF conforme al tiempo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los pacientes con IDCV presentan una heterogeneidad de condiciones y signos, lo cual contribuye a la dificultad en el tratamiento y hasta en su diagnóstico.

Es debido a esto que se planteó clasificar los resultados de pSTAT3 de los pacientes mediante la clasificación de Freiburg: sin memoria (pacientes del grupo 1, n= 8) y memoria (pacientes del grupo 2, n=15), tal como se realizó en el análisis de subpoblaciones de células B. Esto con el fin de poder estudiar más a detalle los resultados obtenidos en el estudio funcional.

En la figura 25 se muestran las gráficas de los resultados obtenidos al clasificar los datos mediante esta clasificación en las tres poblaciones de células B en las que se realizó el estudio funcional de pSTAT3. De igual forma que en las subpoblaciones de células B, se realizó un análisis estadístico entre los grupos en las diferentes condiciones (S/E, 15 y 60 minutos). Los resultados mostraron una diferencia únicamente en la población de células B totales entre el grupo testigo y los pacientes del grupo sin memoria a las condiciones de 15 minutos.



**Figura 25 Gráficas de los resultados promedio de pSTAT3 clasificados de acuerdo a los criterios de Freiburg: memoria para las gráficas en azul (n=15) y sin memoria para las gráficas en verde (n=8); el grupo testigo está representado en morado (n=10). La diferencia significativa obtenida al realizar el análisis estadístico fue en la gráfica A) de células B totales entre los grupos testigo y sin memoria a los 15 minutos (p=0.0327).**

Con base en los datos obtenidos de la recopilación de las manifestaciones clínicas de los pacientes estudiados (tabla 4), se planteó la posibilidad de clasificar a los pacientes de acuerdo a la frecuencia de manifestaciones autoinmunes, dando

lugar a dos grupos: pacientes con autoinmunidad (n=8) y pacientes sin autoinmunidad (n=15). De esta forma, al igual que como se planteó en el gráfico de la figura 21, tratar de profundizar en los resultados obtenidos del estudio funcional de STAT3, con el fin de obtener mayor correlación de los datos y posibles defectos en la vía.

En la figura 26 se muestran las gráficas obtenidas de la clasificación de los datos de acuerdo a lo mencionado anteriormente en cada una de las tres poblaciones de células B en las que se analizó pSTAT3. En este caso los grupos que mostraron diferencias significativas fueron el grupo testigo y el grupo de autoinmunidad en las condiciones de 15 minutos en las subpoblaciones de células B totales y células B naive.

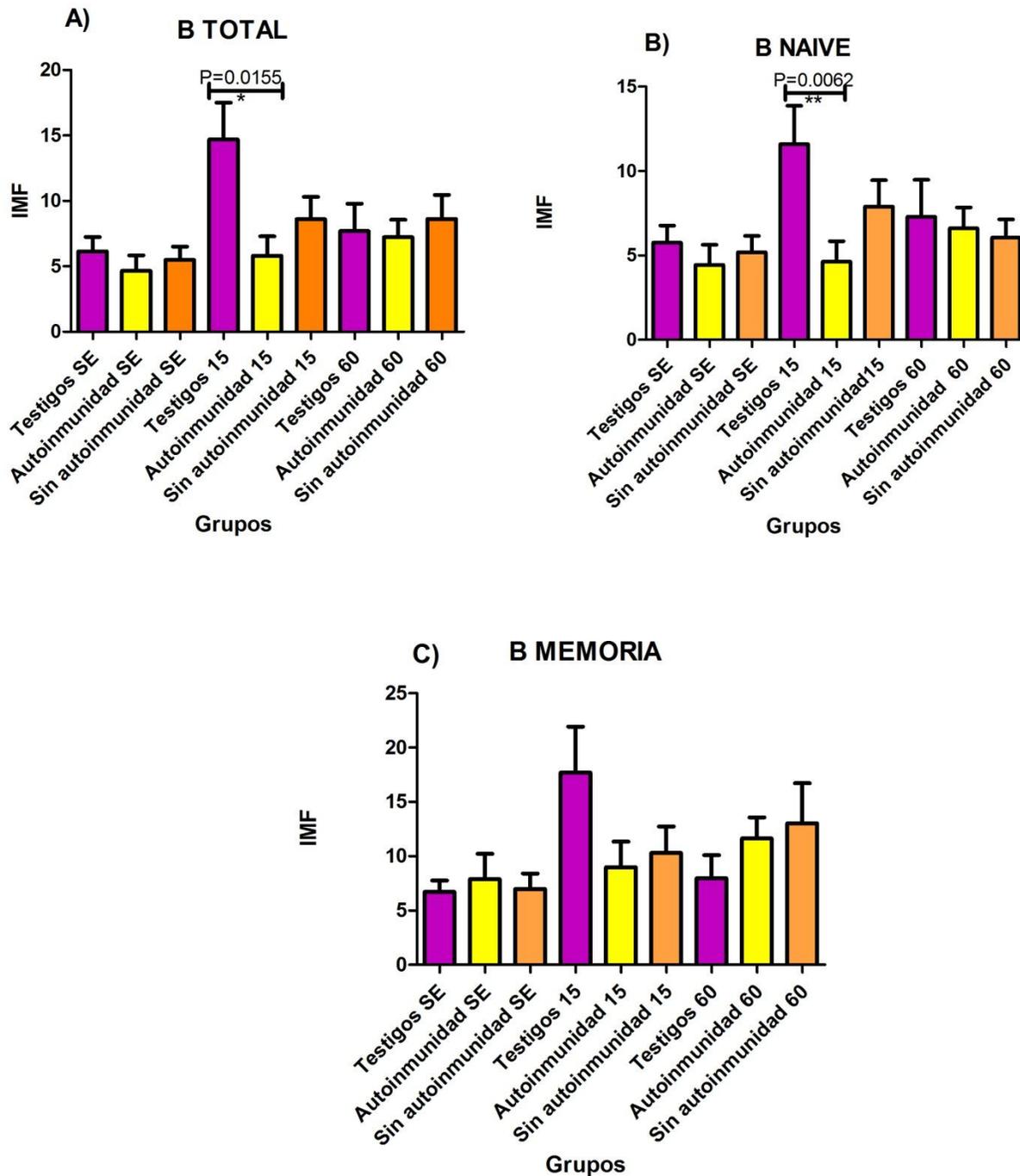
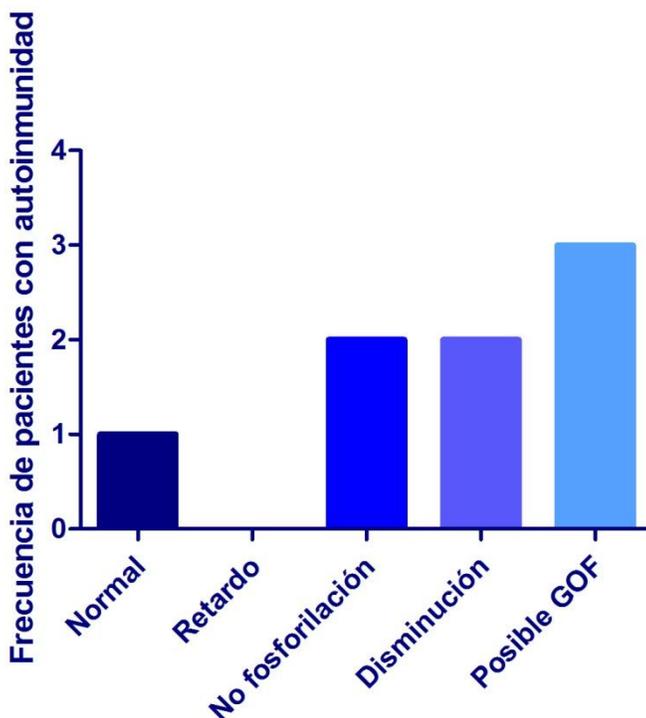


Figura 26 Gráficas de los resultados promedio de pSTAT3 clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de manifestaciones autoinmunes. Se representa en morado el grupo testigo (n=10), en amarillo el grupo con autoinmunidad (n=8) y en naranja el grupo sin autoinmunidad (n=15). En la gráfica A) se representa el análisis comparativo en la población de células B totales, teniendo una diferencia significativa ( $p=0.0155$ ) entre los grupos de testigo y autoinmunidad a los 15 minutos. En la gráfica B) se obtuvo otra diferencia significativa en la población de células B naive entre los grupos de testigo y autoinmunidad a los 15 minutos. En la gráfica C) se muestran los resultados obtenidos en la subpoblación de células B de memoria.

Por último, se hizo la revisión de la frecuencia de manifestaciones autoinmunes en cada uno de los casos de patrón de fosforilación propuestos anteriormente. Dentro del grupo de fosforilación normal (n=9) solo se tuvo a un paciente con dichas manifestaciones, para el caso de retardo (n=3) no hubo pacientes con manifestaciones autoinmunes. En el caso de los grupos de no fosforilación (n=3) y disminución (n=3) cada grupo presentaba dos pacientes con dichas manifestaciones. En el caso del patrón de posible ganancia de función (n=5) tres de los pacientes con este patrón presentaban dichas manifestaciones. Los resultados se ejemplifican en la figura 27.



**Figura 27 Frecuencia pacientes con manifestaciones autoinmunes en los diferentes patrones de fosforilación propuestos. Normal: 1/9, Retardo 0/3, No fosforilación 2/3, Disminución 2/3 y Posible GOF 3/5.**

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo de investigación se trabajó con pacientes con IDCV, la cual, se caracteriza por presentar una baja concentración de inmunoglobulinas séricas y un cuadro muy heterogéneo de manifestaciones clínicas que van desde infecciones en las vías del tracto respiratorio, autoinmunidad y cáncer (35). Al tener una gran variabilidad en las manifestaciones clínicas, por esta razón se les ha realizado muchos estudios a estos pacientes.

El objetivo en este trabajo es hacer un estudio funcional de la vía IL-21/STAT3, por medio de la fosforilación de STAT3, con el fin de correlacionarlo al inmunofenotipo y poder identificar pacientes con probable defecto en esta vía.

Se trabajaron 23 pacientes en este trabajo; se tuvieron 15 femeninos y 8 masculinos; en cuanto a las manifestaciones clínicas presentaron una predisposición alta a neumonía, otitis, neumonías, bronquiectasias, IVRS y autoinmunidad; y en menor frecuencia esplenomegalias, linfadenopatías, IVU, granulomas, padecimientos en el tracto gastrointestinal. Dichos pacientes tienen una gran variabilidad en sus manifestaciones clínicas, lo cual es característico de la enfermedad al ser reportada en otras cohortes de pacientes con IDCV estudiadas (36).

Los pacientes empleados cubren los criterios de inclusión para la enfermedad de IDCV (37); un criterio decisivo para diagnosticar IDCV es tener los niveles de inmunoglobulinas en suero por debajo de dos desviaciones estándar. La concentración de inmunoglobulinas de cada paciente se encontró en niveles bajos de acuerdo al grupo de edad.

Con la citometría de flujo se estudiaron las poblaciones leucocitarias de los pacientes con IDCV de sangre periférica. Cabe destacar que un 22% de estos pacientes tuvieron un número absoluto disminuido de leucocitos totales y

linfocitos totales. Solo un bajo porcentaje de pacientes (6%) tuvo una disminución de la población de neutrófilos. En otras cohortes de pacientes estudiadas se ha visto pacientes que tienen un bajo número de linfocitos totales, tanto en porcentajes como en números absolutos. Esto se ve reflejado en una disminución de sus leucocitos totales (38, 39). Esta disminución puede deberse a las constantes infecciones que los pacientes padecen, así como la pérdida de la homeostasis inmunológica que afecta la diferenciación de los linfocitos y la alteración de los tejidos linfoides donde realizan sus funciones efectoras.

En cuanto al análisis fenotípico de las subpoblaciones linfocitarias que son las células NK CD16+56; células T CD3+ (células T) y las células B CD19+, se compararon con los valores de referencia que existen en la literatura (40). Casi la mitad de los pacientes con IDCV tuvieron un bajo porcentaje de células B (48%) y de células NK (30%). En estudios en otras cohortes de pacientes con IDCV, de acuerdo con los hallazgos obtenidos en este trabajo, también las células B son las más afectadas (38, 41, 42). No se ha estudiado mucho a las células NK en los pacientes con IDCV pero hay reportes de grupos de pacientes con estas células afectadas en porcentaje y número(43).

La mayoría de los pacientes con IDCV tienen defectos en las células B que se ven reflejado en un porcentaje de estas células en sangre periférica y tejidos. En los pacientes donde se han encontrado los defectos que causan su enfermedad, se ha estudiado que estas mutaciones afectan a proteínas que están involucradas en la diferenciación de las células B en los órganos linfoides secundarios. Como consecuencia un gran porcentaje de las células B se van a apoptosis y no pueden terminar su diferenciación a células plasmáticas. Por lo que concierne al bajo porcentaje de células NK no se sabe tiene aún una respuesta.

Al igual que las células B, las células T CD4+ han sido muy estudiadas en los pacientes con IDCV. Se ha concluido que en esta inmunodeficiencia la afectación en esta población determina que los pacientes tengan más complicaciones infecciosas con microorganismos oportunistas (41, 44). En nuestra cohorte de pacientes un porcentaje importante presenta una disminución en esta población.

El estudio de las células T cooperadoras es de relevancia dado en algunos pacientes se han descrito defectos moleculares. De esta forma al haber un defecto en célula T, circunstancialmente habrá un defecto en las poblaciones de células B al no haber una diferenciación completa, lo cual se verá reflejado en un fenotipo clínico de IDCV. Es por ello que en este trabajo se analizaron las subpoblaciones de células T colaboradoras, mediante la determinación de células T cooperadoras naive y células T cooperadoras de memoria.

En el análisis estadístico se vio reflejada una diferencia significativa de los pacientes y testigos; donde las células T cooperadoras naive tuvieron un porcentaje bajo en los pacientes respecto a los testigos, mientras las células T colaboradoras de memoria un porcentaje muy alto.

En los últimos años, se ha estudiado fenotípicamente y funcionalmente a las subpoblaciones de células T cooperadoras y se ha concluido: pacientes con IDCV y un alto porcentaje de células T cooperadoras de memoria, correlaciona con manifestaciones clínicas graves como procesos auto-inflamatorios, esplenomegalia y autoinmunidad. Hay estudios que concluyen estos fenómenos debido a un aumento en la apoptosis de las células T cooperadoras (45, 46).

El principal defecto estudiado en IDCV ha sido en las células B, debido a su papel en la secreción de inmunoglobulinas. Desde el 2000 se sabe que la mayoría de los pacientes con IDCV tienen un bajo porcentaje de células B de memoria, lo cual correlaciona con manifestaciones clínicas graves.

Ahondando en las subpoblaciones de células B y al ser esta la población de células de mayor interés en este trabajo, se decidió llevar a cabo la clasificación de los pacientes de acuerdo al criterio de Freiburg basándose en el porcentaje de células B memoria de los pacientes con IDCV (el porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo es menor a 0.4% respecto al total de linfocitos totales y son considerados sin memoria, mientras los pacientes con un porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo mayor a 0.4% se clasificaron en el grupo de pacientes con memoria).

Esta clasificación es muy útil, debido a la gran heterogeneidad de las manifestaciones en los pacientes, ya que al dividirlos en grupos, permite dividir a los pacientes en grupos de mayor o menor gravedad, además de permitir un análisis más óptimo (47).

Se obtuvieron dos grupos de pacientes con células B memoria y sin células B de memoria, de acuerdo a los criterios establecidos para la clasificación de Freiburg y un grupo de testigos para los resultados de las poblaciones de células B. Mediante el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas en los pacientes con IDCV sin células B de memoria respecto a los testigos y a los pacientes con células B de memoria.

Los pacientes con IDCV y sin células B de memoria tienen menos células B totales, menos células B de memoria con cambio y sin cambio de isotipo, respecto a los testigos y a los pacientes con IDCV y células B de memoria. No obstante, presentan un mayor porcentaje de células B CD21 low que los testigos y los pacientes con IDCV y células B de memoria. En cuanto al porcentaje de plasmablastos tanto los pacientes con IDCV con células B de memoria y sin células B de memoria tienen un porcentaje muy bajo de plasmablastos con una diferencia significativa respecto a los testigos.

Las anormalidades fenotípicas de las subpoblaciones de células B, ha sido muy estudiada en los pacientes con IDCV(48); en la cohorte de pacientes analizada alrededor un tercio de ellos corresponden a pacientes con células B de memoria, mientras que los restantes dos tercios carecen de ellas, lo cual va de acuerdo con otras cohortes de pacientes con IDCV estudiadas, ya que es característico de ellos la ausencia de estas células (49).

El aumento de células B doble negativas se ha correlacionado en procesos de autoinmunidad, tales como lupus eritromatoso sistémico (50) y en cáncer de pulmón (51); dentro de los pacientes estudiados, se tiene un total de 8 que presentan alguna manifestación autoinmune, lo cual sustenta los resultados obtenidos en el análisis.

Los plasmablastos se encuentran en proporciones muy bajas como es de esperar en pacientes con IDCV, ya que al no haber un cambio de isotipo en estas células es difícil que se lleve a cabo la diferenciación hasta célula plasmática, y por ende, el paciente presente bajos niveles de anticuerpos (52).

Al igual que las células B doble negativas, el aumento de células B CD21<sup>low</sup> se han implicado en procesos de autoinmunidad en pacientes con lupus eritromatoso sistémico (53) y en pacientes con artritis reumatoide y VIH (54). En IDCV se ha descrito que un alto porcentaje de células B CD21<sup>low</sup> correlaciona con manifestaciones autoinmune, esplenomegalia y enfermedad granulomatosa(55).

Con la finalidad de entender más las manifestaciones autoinmunes en los pacientes con autoinmunidad, se realizó la determinación de la expresión de las células T reguladoras (Treg) en todos los pacientes. El 56% de los pacientes tiene un decremento en la expresión de las células Treg y estos datos correlacionan con los pacientes con manifestaciones autoinmunes (datos no mostrados).

Se realizó un análisis estadístico de las poblaciones de las células Treg y los hallazgos encontrados con la pSTAT3; no existió correlación (datos no mostrados). Este resultado concuerda con lo obtenido por Arumugakani et. al (56) en donde vio un porcentaje de células CD127<sup>low</sup> bajo en pacientes con IDCV y alguna manifestación autoinmune.

Con la cohorte de pacientes empleada se hizo un estudio funcional de la fosforilación de STAT3 mediante la activación con IL-21r en células B naive y memoria mediante la técnica de citometría de flujo; se midió la fosforilación en dos tiempos 15 y 60 minutos con el fin de ver la activación de STAT3 máxima, por medio de la fosforilación del residuo Y705; este pico de máxima fosforilación se da los 15 minutos y a los 60 minutos hay una desfosforilación donde STAT3 regresa a su estado de inactivación y el valor de IMF es muy parecido al control sin estimular.

Clemente et. al. (57) muestra en su trabajo el papel de STAT3 para la generación de células plasmáticas al realizar a cabo la fosforilación de dicha proteína. En este

caso se observó que sí existe diferencia en el comportamiento en los pacientes con IDCV, para ahondar más en ello se analizaron cada uno de los comportamientos de fosforilación de cada paciente, de los cuales se obtuvieron 5 patrones: fosforilación normal (9 pacientes), no fosforilación (3 pacientes), retardo (3 pacientes), disminución (3 pacientes) y posible ganancia de función (5 pacientes).

Se concluyó que los pacientes con fosforilación normal y pacientes con retardo en la fosforilación; son los que presentan menos manifestaciones autoinmunes; mientras que los pacientes con anomalías en la fosforilación presentan mayor prevalencia de manifestaciones autoinmunes. Esto se debe corroborar aumentando la cohorte de pacientes; ya que al subdividirse esta cohorte quedaron muy pocos pacientes en cada grupo (figura 24).

Al realizar el análisis de datos de todos los pacientes con el grupo de testigos, se vio una diferencia significativa entre pacientes y testigos; donde las células B totales de los pacientes mostraron un descenso en la fosforilación a los 15 minutos, comparándolos con los testigos. También hubo un patrón igual en las células B naive de los pacientes. En cambio, en las células B de memoria de los pacientes no existió una diferencia significativa respecto a los testigos.

Al dividirse a los pacientes con IDCV en pacientes con células B de memoria y pacientes sin células B de memoria, solo existió una diferencia significativa en la población de células B totales, donde existió una reducción de la fosforilación en los pacientes con IDCV y sin células B de memoria.

Milner et. al. (32) menciona en su trabajo la relación que hay en los pacientes con alguna manifestación autoinmune y ganancia de función en STAT3, por ello se planteó realizar la clasificación de los pacientes con base en las manifestaciones autoinmunes (presentes n=8, ausentes n=15). Una vez realizado en análisis estadístico se observó un comportamiento de aumento de la IMF en las tres poblaciones analizadas (células B totales, células B naive y células B memoria).

Se encontró que los pacientes con IDCV con manifestaciones autoinmunes tiene una reducción de la fosforilación de STAT3 a los 15 minutos, en las poblaciones de células B totales y células B naive respecto a los testigos.

Los hallazgos del análisis funcional de pSTAT3 arrojó conclusiones importantes; en primer lugar, al comparar pSTAT3 entre testigos y todos los pacientes se vio una diferencia significativa de la fosforilación de STAT3 a los 15 minutos.

Cuando se dividieron los pacientes en los que tienen células B memoria y los que no; se encontró una diferencia significativa en los pacientes sin células B de memoria, pero no hubo diferencia significativa entre testigos y pacientes con células B de memoria.

Por último, en el análisis comparativo entre testigos y pacientes con autoinmunidad y sin autoinmunidad, se encontró diferencia significativa entre los testigos y los pacientes que tienen autoinmunidad. Mientras que entre el grupo de testigos y los pacientes con ausencia de manifestaciones autoinmunes no presentaron diferencias significativas.

Estos resultados nos llevan a concluir que hay un grupo de pacientes con IDCV y defectos en la vía IL21/STAT3. Estos pacientes tienen defectos en la diferenciación de la célula B naive a célula B de memoria, lo cual, se traduce en problemas durante la activación de la vía, lo que lleva a la formación deficiente del centro germinal en los folículos primarios, y como consecuencia, un bajo número de células B de memoria en sangre periférica.

Así también, los pacientes con IDCV y manifestaciones autoinmunes, tuvieron una diferencia significativa con un decremento de pSTAT3 respecto a los testigos. Se destaca que los la mayoría de estos pacientes son los que presentan un bajo porcentaje de células B de memoria.

Finalmente, es posible afirmar que la baja fosforilación de pSTAT3 se deber a defectos en el receptor de IL-21 ó en defectos de activación de JAK3; por lo que

es importante en estos pacientes realizar, en un futuro, estudios en estas dos proteínas y verificar si existe un defecto molecular.

## **CONCLUSIONES**

\*Los pacientes más afectados en la vía de señalización de pSTAT3 son aquellos que presentan un bajo porcentaje de células B de memoria, los cuales a su vez en su mayoría son aquellos que presentan alguna autoinmunidad.

\*La determinación de la fosforilación de STAT3 puede ser empleada como un parámetro en la determinación de afecciones en el inicio de la vía de señalización de IL-21/STAT3 en pacientes con IDCV.

## **PERSPECTIVAS**

\*Este trabajo de investigación trata de seleccionar a posibles pacientes que puedan tener alguna afección en esta vía, para que en un futuro sean candidatos al estudio molecular.

\*Se debe aumentar el número de pacientes con el fin de corroborar una posible ganancia de función en la fosforilación de la STAT3.

\*Complementar con otros estudios funcionales y moleculares que ayuden a complementar el estudio de la vía de señalización IL-21/STAT3 para determinar si existen posibles defectos en los pacientes con IDCV.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Travis J. Origins. On the origin of the immune system. *Science*. 2009;324(5927):580-2.
2. Raje N, Dinakar C. Overview of Immunodeficiency Disorders. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2015;35(4):599-623.
3. 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. *Journal of Clinical Immunology*. 2018;38(1):96-128.
4. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S182-94.
5. Schatorje EJ, Gathmann B, van Hout RW, de Vries E, Ped PADc. The PedPAD study: boys predominate in the hypogammaglobulinaemia registry of the ESID online database. *Clinical and Experimental Immunology*. 2014;176(3):387-93.
6. Janeway CA, Apt L, Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1953;66:200-2.
7. Yong PF, Thaventhiran JE, Grimbacher B. "A rose is a rose is a rose," but CVID is Not CVID common variable immune deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Adv Immunol*. 2011;111:47-107.
8. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77-85.
9. Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent Immune Activation in CVID and the Role of IVIg in Its Suppression. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:637.
10. Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency: an update. *Arthritis Research & Therapy* 2012;14(5):223.
11. Reynolds-Wooding A. Common variable immunodeficiency. *British Medical Journal*. 2008;337:a1855.
12. Boileau J, Mouillot G, Gerard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with

lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *Journal of Autoimmunity*. 2011;36(1):25-32.

13. Ramirez-Vargas N, Arablin-Oropeza SE, Mojica-Martinez D, Yamazaki-Nakashimada MA, de la Luz Garcia-Cruz M, Teran-Juarez LM, et al. Clinical and immunological features of common variable immunodeficiency in Mexican patients. *Allergologia et Immunopathologia*. 2014;42(3):235-40.

14. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics*. 2016;53(9):575-90.

15. Kurosaki T. B-lymphocyte biology. *Immunological Reviews*. 2010;237(1):5-9.

16. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2016;11(1):137-54.

17. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20(2):149-57.

18. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002;99(5):1544-51.

19. Moens, L. & Tangye, S. C. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation: IL-21 takes center stage. *Frontiers in Immunology*. 2015. 1-14.

20. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2065-75.

21. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(12):2739-53.

22. Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, et al. IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood*. 2013;122(24):3940-50.

23. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*. 2002;298(5598):1630-4.
24. Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;72(5):856-63.
25. Konforte D, Simard N, Paige CJ. IL-21: an executor of B cell fate. *Journal of Immunology*. 2009;182(4):1781-7.
26. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunological Reviews*. 2004;202:84-95.
27. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *Journal of Immunology*. 2008;181(3):1767-79.
28. Cornejo MG, Boggon TJ, Mercher T. JAK3: a two-faced player in hematological disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009;41(12):2376-9.
29. Wu W, Sun XH. Janus kinase 3: the controller and the controlled. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2012;44(3):187-96.
30. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001;13(2):211-7.
31. Qi QR, Yang ZM. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World Journal of Biological Chemistry*. 2014;5(2):231-9.
32. Milner JD, Vogel TP, Forbes L, Ma CA, Stray-Pedersen A, Niemela JE, et al. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood*. 2015;125(4):591-9.
33. Haapaniemi EM, Kaustio M, Rajala HL, van Adrichem AJ, Kainulainen L, Glumoff V, et al. Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. *Blood*. 2015;125(4):639-48.
34. Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, Caswell R, Allen HL, De Franco E, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nature genetics*. 2014;46(8):812-4.

35. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clinical Immunology*. 1999;92(1):34-48.
36. Haymore BR, Mikita CP, Tsokos GC. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimmunity Reviews*. 2008;7(4):309-12.
37. Conley ME. Diagnostic guidelines--An International Consensus document. *Clinical Immunology*. 1999;93(3):189.
38. Berron-Ruiz L, Lopez-Herrera G, Vargas-Hernandez A, Mogica-Martinez D, Garcia-Latorre E, Blancas-Galicia L, et al. Lymphocytes and B-cell abnormalities in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Allergologia et Immunopathologia*. 2013.
39. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012;170(2):202-11.
40. Schatorje EJ, Gemen EF, Driessen GJ, Leuvenink J, van Hout RW, de Vries E. Paediatric reference values for the peripheral T cell compartment. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2012;75(4):436-44.
41. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *Journal of Immunology*. 2007;178(6):3932-43.
42. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*. 2008;74(5):261-71.
43. Ebbo M, Gerard L, Carpentier S, Vely F, Cypowyj S, Farnarier C, et al. Low Circulating Natural Killer Cell Counts are Associated With Severe Disease in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *EBioMedicine*. 2016;6:222-30.
44. Giovannetti A, Pierdominici M, Aiuti F. T-cell homeostasis: the dark(ened) side of common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;112(2):446; author reply -7.

45. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Carbone J. Immunophenotypic profile of T cells in common variable immunodeficiency: is there an association with different clinical findings? *Allergologia et Immunopathologia*. 2009;37(1):14-20.
46. Oraei M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Bidad K, Gheflati Z, Amirkhani A, et al. Naive CD4+ T cells and recent thymic emigrants in common variable immunodeficiency. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. 2012;22(3):160-7.
47. Ferry BL, Jones J, Bateman EA, Woodham N, Warnatz K, Schlesier M, et al. Measurement of peripheral B cell subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005;140(3):532-9.
48. Berglund LJ, Wong SW, Fulcher DA. B-cell maturation defects in common variable immunodeficiency and association with clinical features. *Pathology*. 2008;40(3):288-94.
49. Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, et al. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Immunology*. 2002;103(1):34-42.
50. Zhu L, Yin Z, Ju B, Zhang J, Wang Y, Lv X, et al. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clinical Rheumatology*. 2018;37(1):205-12.
51. Centuori SM, Gomes CJ, Kim SS, Putnam CW, Larsen BT, Garland LL, et al. Double-negative (CD27(-)IgD(-)) B cells are expanded in NSCLC and inversely correlate with affinity-matured B cell populations. *Journal of Translational Medicine*. 2018;16(1):30.
52. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert review of Clinical Immunology*. 2009;5(5):557-64.
53. Wehr C, Eibel H, Masilamani M, Illges H, Schlesier M, Peter HH, et al. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clinical Immunology*. 2004;113(2):161-71.
54. Rakhmanov M, Gutenberger S, Keller B, Schlesier M, Peter HH, Warnatz K. CD21low B cells in common variable immunodeficiency do not show defects in

receptor editing, but resemble tissue-like memory B cells. *Blood*. 2010;116(18):3682-3.

55. Warnatz K, Wehr C, Drager R, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, et al. Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. *Immunobiology*. 2002;206(5):502-13.

56. Arumugakani G, Wood PM, Carter CR. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21<sup>lo</sup> B lymphocytes. *Journal of Clinical Immunology*. 2010;30(2):292-300.

57. Clemente A, Pons J, Lanio N, Cunill V, Frontera G, Crespi C, et al. Increased STAT3 phosphorylation on CD27(+) B-cells from common variable immunodeficiency disease patients. *Clinical Immunology*. 2015;161(2):77-88.

58. Fabre, A., Marchal, S., Barlogis, V., Mari, B., Barbry, P., Rohrlich, P.-S., Giovannini-Chami, L. (2019). Clinical aspects of STAT3 gain-of-function germline mutations: A Systematic Review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. July/August 2019.

59. Clemente, A., Pons, J., Lanio, N., Cunill, V., Frontera, G., Crespi, C.,... Ferrer, J. M. (2015). Increased STAT3 phosphorylation on CD27 + B-cells from common variable immunodeficiency disease patients. *Clinical Immunology*, 161(2), 77-88.

## **ANEXOS**

## 1. Valores de referencia

**Tabla 15 Intervalos de referencia de leucocitos totales de acuerdo a la edad y al sexo.**

Género	Edad (años)	n	Intervalo calculado
<b>Leucocitos (miles/<math>\mu</math>L)</b>			
Femenino	0-1	141	5.10 – 18.10
	2-5	367	4.04 – 13.10
	6-10	434	3.67 – 10.09
	11-15	512	3.59 – 10.73
	16-20	843	3.98 – 10.80
	> 20	18,723	3.56 – 10.30
Masculino	0-1	178	5.01 – 18.10
	2-5	468	4.29 – 12.40
	6-10	437	3.60 – 10.10
	11-15	469	3.50 – 9.08
	16-20	599	3.45 – 9.12
	> 20	11,280	3.84 – 9.79

**Tabla 16 Intervalos de referencia de neutrófilos, linfocitos y monocitos de acuerdo a la edad (valores porcentuales).**

Género	Edad (años)	n	Intervalo calculado
<b>Neutrófilos (%)</b>			
Ambos	0 - 1	171	12.20 - 53.47
	2 - 5	738	20.00 - 65.70
	6 - 10	829	26.28 - 69.60
	11 - 15	935	32.42 - 71.38
	16 - 20	1402	36.49 - 75.71
	> 20	28,966	39.60 - 76.10
<b>Linfocitos (%)</b>			
Ambos	0 - 1	171	28.20 - 78.66
	2 - 5	738	23.89 - 70.36
	6 - 10	829	18.48 - 62.98
	11 - 15	935	18.30 - 57.07
	16 - 20	1402	16.56 - 51.65
	> 20	28,966	15.50 - 48.60
<b>Monocitos (%)</b>			
Ambos	0 - 1	171	0.21 - 12.30
	2 - 5	738	1.74 - 11.00
	6 - 10	829	2.64 - 10.10
	11 - 15	935	3.10 - 9.80
	16 - 20	1402	3.30 - 9.60
	> 20	28,966	3.40 - 10.10

**Tabla 17 Intervalos de referencia de poblaciones de células B, subpoblaciones de células T y NK en valores porcentuales.**

Lymphocyte subpopulations	Age groups									
	Neonatal (n = 20)	1 wk-2 mo (n = 13)	2-5 mo (n = 46)	5-9 mo (n = 105)	9-15 mo (n = 70)	15-24 mo (n = 33)	2-5 yr (n = 33)	5-10 yr (n = 35)	10-16 yr (n = 23)	Adults (n = 51)
CD19 <sup>+</sup> B lymphocytes	12% (5-22)	15% (4-26)	24% (14-39)	21% (13-35)	25% (15-39)	28% (17-41)	24% (14-44)	18% (10-31)	16% (8-24)	12% (6-19)
CD3 <sup>+</sup> T lymphocytes	62% (28-76)	72% (60-85)	63% (48-75)	66% (50-77)	65% (54-76)	64% (39-73)	64% (43-76)	69% (55-78)	67% (52-78)	72% (55-83)
CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes	41% (17-52)	55% (41-68)	45% (33-58)	45% (33-58)	44% (31-54)	41% (25-50)	37% (23-48)	35% (27-53)	39% (25-48)	44% (28-57)
CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes	24% (10-41)	16% (9-23)	17% (11-25)	18% (13-26)	18% (12-28)	20% (11-32)	24% (14-33)	28% (19-34)	23% (9-35)	24% (10-39)
CD4/CD8 ratio per CD3 <sup>+</sup>	1.8 (1.0-2.6)	3.8 (1.3-6.3)	2.7 (1.7-3.9)	2.5 (1.6-3.8)	2.4 (1.3-3.9)	1.9 (0.9-3.7)	1.6 (0.9-2.9)	1.2 (0.9-2.6)	1.7 (0.9-3.4)	1.9 (1.0-3.6)
CD3 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup> T lymphocytes	2% (1-6)	5% (1-38)	3% (1-9)	3% (1-7)	4% (2-8)	6% (3-12)	6% (3-13)	7% (3-14)	4% (1-8)	5% (2-12)
CD3 <sup>+</sup> /CD16-56 <sup>+</sup> NK cells	20% (6-58)	8% (3-23)	6% (2-14)	5% (2-13)	7% (3-17)	8% (3-16)	10% (4-23)	12% (4-26)	15% (6-27)	13% (7-31)

The relative frequencies are expressed within the lymphocyte population: median and percentiles (5th to 95th percentiles).

**Tabla 18 Intervalos de referencia de memoria de células T y T reguladoras (valores porcentuales).**

T cell population		Reference range
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> of CD4 <sup>+</sup> T cells	CD4 <sup>+</sup> memory T cells	29-63%
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> of CD4 <sup>+</sup> T cells	CD4 <sup>+</sup> naïve T cells	32-73 %
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>+</sup> of CD4 <sup>+</sup> of T cells	T reg	1.4-5.1 %

**Tabla 19 Intervalos de referencia de subpoblaciones de células B de acuerdo a la edad (valores porcentuales).**

Table 4  
Relative Number of B Lymphocyte Subpopulations in Healthy Children and Young Adults in Tested Age Groups

B cell subset	Phenotype										
	Non-memory	Transitional	Naive	Memory	Non-switched memory/marginal zone like	Switched memory	Switched memory	Immature	Activated	Double negative	Plasma-blasts
Age group	CD27 <sup>-</sup> (%B)	IgM <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> (%B)	IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> (%B)	CD27 <sup>+</sup> (%B)	IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (%B)	IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> (%B)	IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> (%PBL)	CD21 <sup>low</sup> (%B)	CD21 <sup>low</sup> CD38 <sup>low</sup> (%B)	IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> (%B)	IgM <sup>-</sup> CD38 <sup>hi</sup> (%B)
Cord blood	93.7 (85.0-96.9)	33.9 (27.2-49.7)	82.7 (52.1-90.6)	6.3 (3.1-15.0)	3.9 (0.7-6.4)	1.8 (0.9-7.0)	0.4 (0.1-1.1)	8.4 (3.3-17.8)	3.8 (0.6-18.5)	11.1 (3.6-40.1)	1.9 (0.4-3.2)
0-7 days	91.2 (85.6-96.4)	29.0 (1.2-41.9)	83.8 (55.0-91.3)	8.8 (3.6-14.4)	6.5 (2.6-12.0)	2.3 (1.0-7.2)	0.3 (0.1-0.7)	9.5 (3.6-26.2)	2.3 (0.5-21.5)	5.3 (2.1-39.3)	0.4 (0.2-3.2)
8 days-2 months	94.3 (89.5-96.9)	24.1 (4.1-43.9)	90.4 (85.7-94.8)	5.7 (3.1-10.5)	2.3 (1.7-6.5)	3.3 (1.5-7.1)	0.6 (0.3-1.5)	13.0 (6.7-23.1)	1.1 (0.4-2.2)	2.9 (1.1-7.9)	0.6 (0.2-2.7)
2-5 months	94.0 (87.6-96.8)	18.7 (11.4-38.4)	92.5 (82.1-95.2)	6.0 (3.2-12.4)	3.7 (2.5-8.7)	1.8 (0.3-9.0)	0.5 (0.1-2.5)	12.3 (7.1-31.1)	1.0 (0.5-2.9)	1.4 (0.7-5.0)	1.2 (0.4-3.3)
5-9 months	92.3 (88.5-94.7)	12.4 (7.2-19.7)	90.6 (85.5-93.4)	7.7 (5.3-11.5)	4.3 (2.8-7.4)	3.5 (1.6-7.0)	0.7 (0.5-2.1)	11.8 (6.2-20.3)	1.0 (0.4-3.3)	1.3 (0.8-4.4)	1.3 (0.2-4.0)
9-15 months	87.1 (79.4-95.9)	8.5 (3.6-12.7)	85.2 (76.5-94.7)	12.9 (4.1-20.6)	6.1 (3.0-10.7)	5.1 (1.4-11.9)	1.0 (0.3-2.1)	10.2 (4.3-23.1)	1.3 (0.5-4.5)	1.3 (0.6-3.0)	1.1 (0.4-5.5)
15-24 months	84.4 (73.5-90.5)	8.4 (3.3-16.5)	81.4 (68.1-89.3)	15.7 (9.5-26.5)	8.0 (4.1-13.9)	7.4 (3.9-13.6)	1.7 (0.7-3.4)	12.1 (5.1-21.3)	1.8 (1.0-5.7)	2.3 (1.1-10.1)	1.7 (0.5-3.0)
2-5 years	78.5 (62.9-92.2)	6.3 (3.1-12.3)	75.3 (54.0-88.4)	21.5 (7.8-37.1)	10.0 (2.7-19.8)	10.9 (4.7-21.2)	2.1 (0.8-5.0)	12.1 (4.1-24.4)	2.7 (1.7-5.4)	3.5 (1.5-12.4)	1.5 (0.6-4.0)
5-10 years	72.9 (53.3-81.4)	6.3 (4.6-8.3)	65.7 (47.3-77.0)	27.1 (18.6-46.7)	11.0 (5.2-20.4)	14.4 (10.9-30.4)	2.7 (1.7-5.4)	11.4 (5.9-25.8)	4.6 (2.3-10.0)	5.8 (2.3-11.0)	1.7 (0.6-5.3)
10-16 years	71.7 (52.1-86.7)	6.8 (1.4-13.0)	65.6 (51.3-82.5)	28.3 (13.3-47.9)	12.2 (4.6-18.2)	16.2 (8.7-25.6)	2.2 (1.5-4.0)	8.1 (2.9-13.2)	5.8 (2.7-8.7)	4.8 (2.7-13.4)	1.5 (0.6-6.5)
>16 years	71.7 (53.5-86.7)	2.5 (0.9-5.7)	65.5 (48.4-79.7)	28.3 (17.5-46.5)	11.1 (7.0-23.8)	16.1 (8.3-27.8)	2.0 (1.1-3.3)	6.2 (3.2-19.6)	4.4 (1.6-10.0)	4.5 (2.2-10.0)	1.1 (0.4-2.4)

Values within parenthesis represent median (5-95 percentile range).

**Tabla 20 Intervalos de referencia de inmunoglobulinas en suero.**

Age Groups	n	IgA (mg/dL)		IgG (mg/dL)		IgM (mg/dL)	
		Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Newborn	43	5.6	0-22	507.6	133-1037	26	5-120
1-3 month	129	18.3	4-79	313.8	55-625	39.6	8-144
4-6 month	45	24.4	7-89	340	49-611	49.8	16-158
7-12 month	132	22.1	4-110	371.8	11-769	48.8	11-221
13-24 month	107	27.4	7-115	481.8	127-907	64.8	20-207
25-36 month	112	35.8	9-148	507.4	216-1010	62.1	17-223
3-5 year	62	73.3	32-178	668.3	280-1108	97.6	42-227
6-8 year	60	84.3	36-204	751.5	443-1095	96.8	39-240
9-11 year	63	96.8	39-246	881.5	422-1406	100.2	40-251
12-18 year	47	122	60-263	886.5	500-1330	85.5	30-228

## 2. Citometría de flujo

Es un método analítico que permite medir múltiples parámetros de células o partículas suspendidas, tales como tamaño, forma, complejidad, intensidad relativa de fluorescencia y algún componente celular o función que pueda ser marcada por un fluorocromo. Dentro de sus aplicaciones en la inmunología se encuentra el uso para el conteo de subpoblaciones de células sanguíneas, esto

con el fin de caracterizar diversas enfermedades como VIH, leucemias agudas y otros síndromes que permiten dar un entendimiento y diagnósticos de estas (28)

Su funcionamiento consiste en la inyección de la suspensión celular a través de un capilar el cual es incidido por un rayo láser, una vez que tiene contacto con una célula la luz de excitación sale hacia los lados y adelante lo cual genera una señal que se traduce en información, tal como tamaño, complejidad y morfología; además si esta es marcada por un fluorocromo la luz fluorescente se procesa y permite la separación de subpoblaciones seleccionadas.

El equipo se compone de tres sistemas: flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz que refleja las células y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica la cual es digitalizada para su análisis por computadora. Se compone de cinco unidades principales: una fuente de luz (lámpara de mercurio ó láser), flujo celular regulado, unidades de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específica, fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos (29).

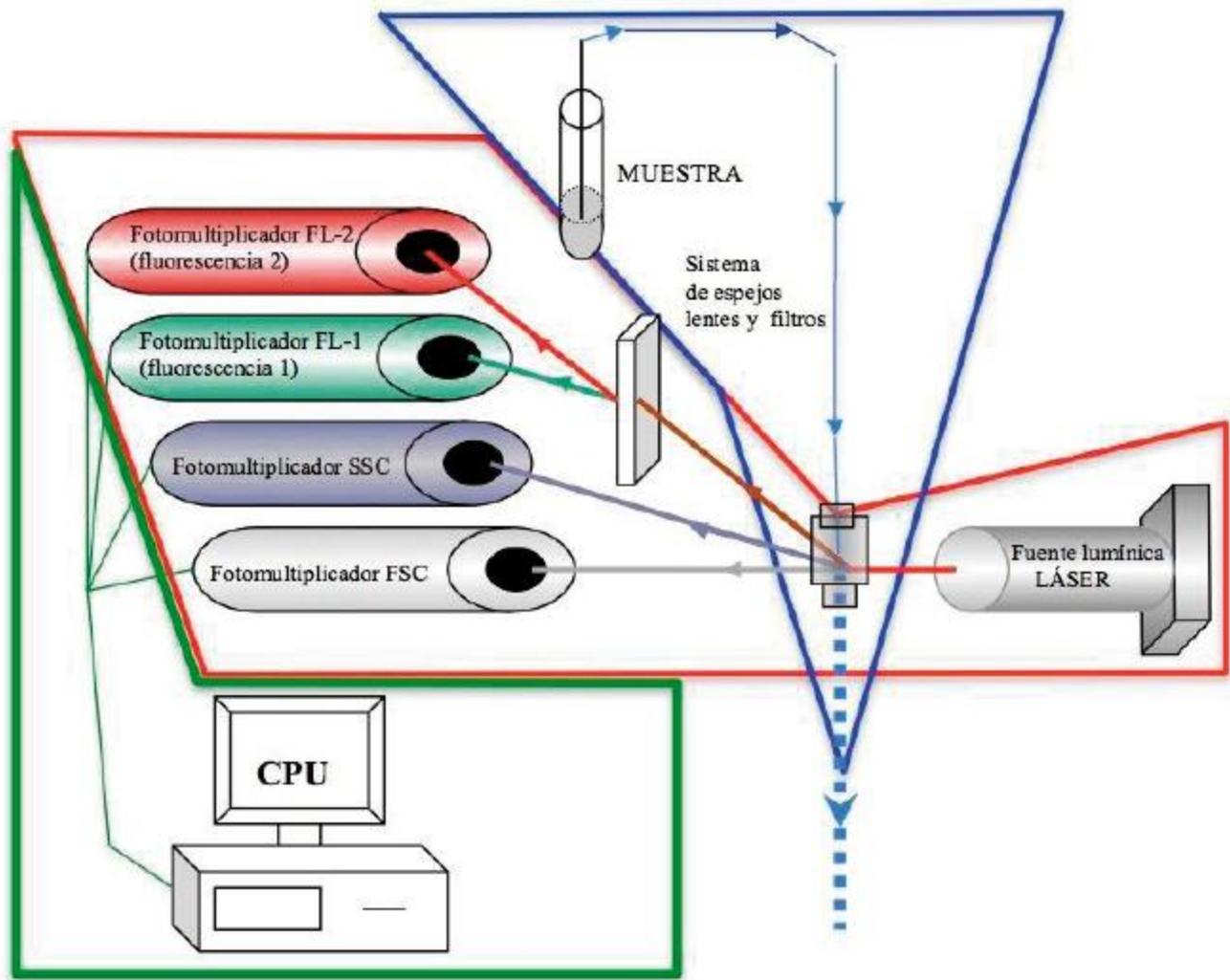


Figura 28 Esquematización de la composición de la citometría de flujo. (30)

### 3. Preparación de reactivos

\*PBS (10X)

80 g NaCl

2.0 g KCl

11.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Agua Milli Q cbp 1L

\*PBS (1X)

Se realizó una dilución de PBS 10X 1:10 usando agua Milli-Q.

\*PBA:

0.5 g albúmina sérica bovina

PBS 1X cbp 100 mL

\*Solución fijadora 1%

1mL paraformaldehído

PBS 1X cbp 100 mL

\*Solución fijadora 16%

16 mL paraformaldehído

PBS 1X cbp 100 MI

\*Solución de Turk:

3.0 mL ácido acético glacial

2 gotas de azul de metileno

Agua destilada cbp 100 mL

#### **4. Foros de participación**

El Centro de Investigación en Dinámica Celular y la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos otorga la presente

**1<sup>er</sup> SIMPOSIO**  
Avances y perspectivas en el estudio genético y molecular de inmunodeficiencias primarias en México

**CONSTANCIA a:**  
Huerta- Robles H.M. Raquel, López-Herrera Gabriela, Segura-Méndez Nora H, O'Farrill-Romanillos P, Mogica-Martínez Dolores, Staines-Bone A Tamara, Yamazaki-Nakashimada Marco A, Berrón-Ruiz Laura.

Quien presentó el trabajo:

***Analysis of functional defects in IL21/STAT3 pathways; through phosphorylation of STAT3 ( pSTAT3) in B cell of Mexican patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID)***

En la modalidad de póster durante el "1er Simposio Avances y perspectivas en el estudio genético y molecular de inmunodeficiencias primarias en México" celebrado el 10 de Septiembre en Cuernavaca, Morelos.

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz  
Comité Organizador

Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez  
Comité Organizador



IV CONGRESO MEXICANO DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

a

**QFB. HAYDEÉ MARGARITA RAQUEL HUERTA ROBLES**

Por su participación como: **CONGRESISTA**

En el IV Congreso Mexicano de Inmunodeficiencia Primarias que se llevó a cabo del 4 al 6 de octubre en el Hotel Hacienda Jurica, Querétaro, Qro, México

Reconocido por el Consejo Nacional de Inmunología Clínica y Alergia con un total de 13 puntos de valor curricular para fines de educación médica continua con la clave conica-a130.

Y por el Consejo Mexicano de certificación en Pediatría con un total de 3 puntos de valor curricular para fines de educación médica continua con la clave CMCP-PED-E20418

Francisco J. Espinosa Rosales  
Presidente  
Fundación Mexicana para niñas y niños

Sara E. Espinosa Padilla  
Jefa de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias.  
Instituto Nacional de Pediatría



El presente trabajo fue premiado con el 1er. Lugar en la presentación de trabajos libres durante la realización de este Simposio.