



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN IL-21/STAT3 EN PACIENTES CON
INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB. VELÁSQUEZ ORTIZ MARÍA GUADALUPE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA BERRÓN RUIZ
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO
COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, UNAM



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/238/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **VELÁSQUEZ ORTIZ MARÍA GUADALUPE** con número de cuenta **311213612** con la tesis titulada **“ESTUDIO FUNCIONAL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN IL-21/STAT3 EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA BERRÓN RUIZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
Vocal: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
Vocal: DR. OSCAR MEDINA CONTRERAS
Vocal: DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA
Secretario: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de marzo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por proporcionarme las herramientas para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca 762483 para la realización de la Maestría.

Al proyecto CONACyT 256471 titulado “Análisis de los defectos funcionales en las vías de IL-21/STAT3 en pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable” lo cual permitió la realización de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Pediatría y al proyecto 027/2016 “Análisis de los defectos funcionales en las vías de IL-21/STAT3 en pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable” por aportar fondos para esta investigación.

Así mismo quiero agradecer a mi tutora principal la Dra. Laura Berrón Ruiz y a los miembros de mi comité tutorial la Dra. Sara Frías Vázquez y el Dr. José Luis Maravillas Montero por su apoyo y asesoría durante estos años.

Agradecimientos personales

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la posibilidad de continuar con mi formación.
- A la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría por permitirme realizar este proyecto.
- A la Dra. Laura Berrón Ruiz por todas sus enseñanzas, apoyo y por haber confiado en mí a lo largo de estos años, es una persona a la cual admiro no sólo en el ámbito profesional sino en el personal.
- A la Dra. Gabriela López Herrera por tomarse el tiempo para escucharme, realmente agradezco cada uno de sus consejos.
- Al Dr. José Luis Maravillas Montero y a la Dra. Sara Frías Vázquez por guiarme a lo largo de este proyecto, realmente fueron parte importante de mi formación.
- A los miembros del jurado por sus sugerencias y pertinentes correcciones del presente trabajo.
- A la Dra. Patricia O'Farril Romanillos por su incondicional apoyo para la obtención de las muestras.
- A cada paciente y testigo por la disposición al donar sus muestras para que este trabajo fuera posible.
- A la QFB Raquel Huerta Robles y a Abigail Saldaña Solano por su aportación experimental en este proyecto.
- A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y por hacer más llevadera la estadía durante este tiempo.
- A mi familia porque a pesar de todo son parte importante en mi vida, sin ustedes esto no habría sido posible, gracias por siempre estar ahí.
- A cada uno de mis amigos, compañeros, profesores y a todas las personas con las que me he cruzado en este camino ya que cada momento me ha ayudado para llegar hasta este punto.
- Este proyecto transcurrió en un momento muy complicado, en el que ocurrieron infinidad de adversidades, pero hubo una persona que siempre estuvo ahí y me motivó a continuar es por ello por lo que quiero externarle mi eterno agradecimiento ya que sin saberlo durante estos años ha sido mi más grande apoyo :)

“ . . . Para todo se halla prueba
y razón en que fundarlo;
y no hay razón para nada,
de haber razón para tanto . . . ”

Sor Juana Inés de la Cruz

A la memoria de mi madre.



Índice

Índice de figuras

Índice de tablas

Índice de ecuaciones

Índices de abreviaturas

Resumen	1
Abstract	2
Introducción y antecedentes	3
Errores Innatos de la Inmunidad	3
Deficiencias predominantemente de anticuerpos	3
Inmunodeficiencia Común Variable.....	5
Sintomatología asociada a la IDCV	8
Defectos celulares en pacientes con IDCV	10
Defectos genéticos asociados a IDCV	12
La importancia de la reacción de centro germinal para las células B.....	13
Vía de señalización IL-21/STAT3 en células B.....	14
Planteamiento del problema	21
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares	23
Metodología	24
Esquematización de la metodología empleada	24
Tipo de investigación	24
Criterios de inclusión.....	25
Criterios de exclusión.....	25
Determinación del score de gravedad	25
Clasificación de los pacientes	26
Obtención de muestra sanguínea.....	26
Fenotipificación celular en sangre periférica.....	26
Conteo de leucocitos totales.....	27
Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's).....	28

Conteo de células totales	28
Determinación de la fosforilación de STAT3.....	28
Ajuste del número de células B para activación posterior	29
Activación <i>in vitro</i> para cultivo celular	29
Determinación de la proliferación de células B.....	30
Cuantificación de anticuerpos mediante ELISA.....	31
Análisis estadístico.....	31
Análisis de frecuencias de manifestaciones clínicas de pacientes con IDCV que tuvieron respuesta anormal a la activación con IL-21.....	32
Resultados	33
1. Fenotipificación celular	35
2. Cohorte 1	38
• Resultados clínicos de la cohorte 1	38
• Resultados fenotípicos de la cohorte 1.....	39
• Estrategia de análisis de la determinación de la proliferación de células B	40
• Estandarización de la técnica de proliferación de células B.....	41
• Resultados de proliferación de células B.....	41
3. Cohorte 2	46
• Resultados clínicos de la cohorte 2	46
• Resultados fenotípicos de la cohorte 2.....	48
• Estandarización de la técnica de ELISA	49
• Resultados de la cuantificación de inmunoglobulinas.....	50
4. Cohorte 3	55
• Resultados clínicos de la cohorte 3	55
• Resultados fenotípicos de la cohorte 3.....	57
• Estrategia de análisis de la determinación de la fosforilación de STAT3	57
• Estandarización de la determinación de la fosforilación de STAT3.....	58
• Resultados de la determinación de la fosforilación de STAT3	59
Discusión	66
Conclusiones	76
Perspectivas	76
Referencias bibliográficas	77
Anexo I	86

Diagnóstico diferencial de hipogammaglobulinemia.....	86
Anexo 2	87
Datos clínicos del cálculo del score.....	87
Anexo 3	90
Análisis de la cohorte 3 agrupada de acuerdo con la clasificación de Freiburg.....	90
Anexo 4	92
Preparación de reactivos	92
Anexo 5	95
Fenotipificación celular	95
Anexo 6	98
Difusión del trabajo en congresos y artículo publicado	98

Índice de figuras

Figura 1. Prevalencia de los grupos de IEI's en reportados por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID)	4
Figura 2. Prevalencia de inmunodeficiencias humorales reportado por la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID)	5
Figura 3. Genes asociados a la Inmunodeficiencia Común Variable.....	13
Figura 4. Señales T-dependientes.....	14
Figura 5. Vía de señalización IL-21/STAT3.....	15
Figura 6. Esquema de la estrategia general empleada.....	24
Figura 7. Agrupación de los pacientes.....	34
Figura 8. Esquema general de la fenotipificación	36
Figura 9. Comparación de poblaciones y subpoblaciones celulares cohorte 1.....	40
Figura 10. Estrategia de análisis para determinar el porcentaje de división de células B..	41
Figura 11. Resultados muestra de proliferación de un testigo sano	41
Figura 12. Comparación de la proliferación de células B entre pacientes y testigos	43
Figura 13. Comparación de la proliferación entre testigos y pacientes clasificados	44
Figura 14. Comparación de la proliferación de las distintas condiciones en cada uno de los grupos de estudio	45
Figura 15. Comparación de poblaciones y subpoblaciones celulares cohorte 2	49
Figura 16. Estandarización de la técnica de ELISA.....	50
Figura 17. Resultados de la cuantificación de anticuerpos	52
Figura 18. Inmunoglobulinas en suero vs inmunoglobulinas <i>in vitro</i>	52
Figura 19. Resultados de la cuantificación de anticuerpos	53
Figura 20. Resultados de la cuantificación de anticuerpos clasificación de pacientes	54
Figura 21. Comparación de poblaciones y subpoblaciones celulares cohorte 3	57
Figura 22. Análisis de la fosforilación de STAT3.....	58
Figura 23. Estandarización de la fosforilación de la proteína STAT3	59
Figura 24 Resultados de la fosforilación de STAT3.....	62
Figura 25. Resultados de la fosforilación de STAT3 en células B de memoria comparación entre grupos	62
Figura 26. Resultados de la fosforilación de STAT3 en células B de memoria comparación intragrupo.....	63

Figura 27. Correlaciones entre la fosforilación de STAT3 y el score de gravedad.....	63
Figura 28. Diagrama de relación entre las cohortes	65
Figura 29. Resultados de los estudios funcionales de la vía IL-21/STAT3.....	75
Figura 30. Resultados de la cuantificación de anticuerpos clasificación por memoria	91
Figura 31. Población de linfocitos	95
Figura 32. Poblaciones de células B	96
Figura 33. Subpoblaciones de células B de memoria, naive y dobles negativas	96
Figura 34. Subpoblaciones de células B transicionales y plasmablastos	97
Figura 35. Subpoblaciones de células B CD21 bajo.....	97

Índice de tablas

Tabla 1. Criterio para determinar el score de gravedad de IDCV	26
Tabla 2. Resultados clínicos de todos los pacientes	35
Tabla 3. Resultados de subpoblaciones de células B de todos los pacientes	37
Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con IDCV de la cohorte 2.....	39
Tabla 5. Resultados del porcentaje de división de células B de los pacientes	42
Tabla 6. Resultados del porcentaje de división de células B de los testigos.....	43
Tabla 7. Frecuencias de manifestaciones clínicas y la proliferación de células B.....	46
Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con IDCV	48
Tabla 9. Concentraciones de inmunoglobulinas de las curvas de referencia.....	49
Tabla 10. Cuantificación de inmunoglobulinas. Resultados de pacientes	50
Tabla 11. Cuantificación de inmunoglobulinas. Resultados de testigos.....	51
Tabla 12. Frecuencias de manifestaciones clínicas y la concentración de anticuerpos	55
Tabla 13. Características clínicas de los pacientes con IDCV	56
Tabla 14. Resultados de IMF de pSTAT3 de las muestras de los pacientes	60
Tabla 15. Resultados de IMF de pSTAT3 de las muestras de los testigos	61
Tabla 16. Frecuencia de manifestaciones clínicas y pSTAT3 en células B de memoria. ...	64
Tabla 17. Score desglosado	87
Tabla 18. Continuación de score desglosado.....	88
Tabla 19. Continuación de score desglosado 2.....	89
Tabla 20. Resultados clínicos de la cohorte 2 de pacientes	90
Tabla 21. Resultados de poblaciones y subpoblaciones leucocitarias.....	91

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de leucocitos totales en sangre periférica.....	28
Ecuación 2. Cálculo de PBMC's	28
Ecuación 3. Cálculo de células B.....	29
Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de división celular.....	31

Índice de abreviaturas

°C	Grados celsius
µg	Microgramo
ACD	Ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Alofococianina
BAFF	Factor activador de linfocitos B
Bcl-6	Factor 6 de linfoma de células B
BCR	Receptor de células B
Blimp-1	Proteína 1 de maduración inducida por linfocitos B
CB	Cantidad de células B
cbp	Cuanto baste para
CCI	Con cambio de isotipo
CD	Cluster de diferenciación
CD40L	Ligando de CD40
CDD	Dominio en espiral
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG ODN	CpG oligodesoxinucleótidos
CFSE	Carboxi-fluoresceína diacetato, succinimidyl ester
CT	Número de células totales
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CV	Variación de fluorescencia
CVID ICON	Consenso internacional de IDCV
DBD	Dominio de union al DNA
dL	Decilitro
DN	Dobles negativas
EBV	Virus de Epstein-Barr
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ELISpot	Ensayo de inmunoadsorbente de puntos ligado a enzimas
ESID	Sociedad Europea de Inmunodeficiencias
FD	Factor de dilución
FDC	Células dendríticas foliculares
FERM	Dominio conformado por ezrina, radixina y moesina
FITC	Fluorescenina
FSC	Tamaño celular (Forward scatter)
GOF	Ganancia de función
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

HIES	Síndrome de hiper-IgE
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
ICOS	Coestimulador inducible de células T
IDCV	Inmunodeficiencia común variable
IDP	Inmunodeficiencias primarias
IEI	Errores innatos de la inmunidad
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IL-21R	Receptor de interleucina 21
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IRF2BP2	Proteína 2 unida al factor 2 regulador de interferon
IRF4	Factor 4 regulador del interferon
IUIS	Unión Internacional de la Sociedades Inmunológicas
JAK	Cinasa de Janus
JH	Dominio de homología de Janus
LASID	Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias
LD	Dominui conector
LOF	Pérdida de función
LRBA	Proteína de anclaje similar al beige que responde a LPS
LT	Leucocitos totales
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NBT/BCIP	Cloruro de nitro-azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato
NFκB	Factor nuclear kappa B
NK	Asesinas naturales
NKT	Asesinas naturales T
nm	Nanometros
NTD	Dominio amino-terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Ortofenilendiamino
PAGID	Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias
Pax5	Caja emparejada 5
PBA	Buffer de fosfatos con albúmina sérica bovina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer de fosfatos
PC	Célula plasmática
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Peridina-Clorofilina
PI3K	Cinasa fosfatidilinositol 3

PIAS	Inhibidor de de proteínas de STAT activado
PKW	Pokeweed
pSTAT3	STAT3 fosforilada
PTI	Púrpura trombocitopénica idiopática
RPMI	Medio Instituto Conmemorativo Roswell Park
S	Serina
S1PR	Receptor de esfingosina
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
SD	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
SH	Dominio Src con homología 2
SOCS	Supresor de señalización de citocina
SPIB	Factor de transcripción Spi-B
SSC	Complejidad o granularidad celular (Side scatter)
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
TACI	Activador transmembranal e interactor de CAML
TAD	Dominio de transactivación
TD	Antígenos T dependientes
TI	Antígenos T independientes
TLR	Receptor tipo Toll
Tyr	Tisorina
V	Valina
W	Triptofano
X	Cualquier aminoácido
XBP-1	Proteína 1 unida a caja X
XLA	Agammaglobulinemia ligada al X

Resumen

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) es el síndrome sintomático diagnosticado con más frecuencia entre los Errores Innatos de la Inmunidad, está caracterizado por presentar bajos niveles de inmunoglobulinas en suero, principalmente de tipo IgG e IgA. Aún no se conocen todos los defectos genéticos causantes de dicho fenotipo clínico, aunque se sabe que existe una deficiente diferenciación terminal de la célula B. La IL-21 es el inductor más potente de la diferenciación, mediante la activación de la vía de STAT3, es una de las señales que llevan a las células B a diferenciarse hacia célula plasmática productora de anticuerpos, por lo que en este trabajo se planteó que algunos de los pacientes con IDCV podrían tener defecto en la vía IL-21/STAT3, por tal motivo se realizaron distintos estudios funcionales que permitieron evaluar la vía en distintas cohortes de pacientes (n=43) y testigos sanos con los cuales se realizaron comparaciones estadísticas. En el presente trabajo se realizaron ensayos de proliferación de células B, si bien, los pacientes en conjunto no presentaron una proliferación disminuida con IL-21 se observó que los pacientes que presentaban la disminución eran aquellos que poseían células B de memoria en porcentajes normales. Además, se cuantificó la concentración de inmunoglobulinas tras la inducción de la diferenciación de células B, de lo cual no se observó ninguna diferencia en la producción de IgG o IgA, sólo una disminución de IgM tras la activación con IL-21, tras clasificar a los pacientes por su gravedad clínica se encontró que aquellos que tienen una menor gravedad son los que presentaron valores disminuidos de IgM. También se encontró que los pacientes presentan un patrón anormal de fosforilación de la proteína STAT3 en las células B totales, naive y de memoria, en el cual a los 60 minutos dicha proteína se encuentra fosforilada, evento que no debería ocurrir, este hallazgo fue más evidente en los pacientes con bajo porcentaje de células B de memoria, además se correlacionó con la gravedad clínica. Al analizar a los pacientes que presentaban estos resultados anormales en la vía de señalización estudiada se observó que los principales padecimientos eran manifestaciones inflamatorias y enteropatías lo

cual indica que algunos de los pacientes tienen defecto funcional en la vía de señalización IL-21/STAT3.

Abstract

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the most frequently diagnosed symptomatic syndrome among the Inborn Errors of Immunity, characterized by low serum immunoglobulin levels, mainly IgG and IgA. So far, most of the genetic defects causing this clinical phenotype are still unknown, although it has been proposed that a deficient B cell terminal differentiation is induced. IL-21 is the most potent inducer of differentiation, through the activation of the STAT3 pathway, it is one of the signals leading B cells to differentiate into antibody-producing plasma cells, so it was suggested that some of the patients with CVID could have a defect in the IL-21/STAT3 pathway, for this reason different functional studies were performed to evaluate the pathway in different cohorts of patients (n=43) and healthy controls which statistical comparisons were made. It was found that patients present an abnormal pattern of STAT3 protein phosphorylation in total, naïve and memory B cells, in which at 60 minutes this protein is phosphorylated, an event that should not occur, this finding was more evident in patients with low percentage of memory B cells, in addition it was correlated with clinical severity. B cell proliferation assays were also performed, although the patients did not show decreased proliferation with IL-21, it has been noted that the patients who showed a decrease were those who had memory B cells in normal percentages. In addition, immunoglobulins concentrations were quantified after induction of B-cell differentiation, of which no differences were observed in IgG or IgA production, only a decrease in IgM after activation with IL-21, after classifying patients by clinical severity it was found that those with less severity were those who presented decreased IgM values. When analyzing the patients presenting these abnormal results in the signaling pathway, it was observed that the main conditions were inflammatory manifestations and enteropathies, which indicates that some of the patients have a functional defect in the IL-21/STAT3 signaling pathway.

Introducción y antecedentes

Errores Innatos de la Inmunidad

Los errores innatos de la inmunidad (IEI's del inglés Inborn Errors of Immunity) hacen referencia a las inmunodeficiencias primarias (IDP's) (1), son un grupo heterogéneo que comprende distintas enfermedades, las cuales presentan defectos en el desarrollo y/o función del sistema inmunológico (2). Los IEI's están determinados por mutaciones monogénicas en la línea germinal que da como resultado una pérdida de expresión o función (LOF del inglés loss of function) o una ganancia de función (GOF del inglés gain of function) de la proteína codificada, las mutaciones pueden ser dominantes o recesivas, autosómicas o ligadas al cromosoma X y su penetrancia puede ser completa o incompleta. Debido a los papeles críticos de estas proteínas en el desarrollo, mantenimiento y función de las células del sistema inmunológico o células que contribuyen a la inmunidad, durante la homeostasis y en respuesta a agentes externos o agentes internos. Estas enfermedades se caracterizan por presentar manifestaciones tales como susceptibilidad a agentes infecciosos, autoinmunidad, enfermedades autoinflamatorias, linfoproliferación, alergias y/o malignidades (1,3,4) .

Hasta el año 2019 se tenían registrados 406 enfermedades con defectos identificados en 430 genes distintos (3). Los IEI's se consideraban tradicionalmente como enfermedades raras, que afectaban aproximadamente entre 1 de cada 10,000 y 1 de cada 50,000 nacimientos, sin embargo, con el descubrimiento de nuevos IEI's y una mejor definición de los fenotipos clínicos, es más probable que la prevalencia colectiva de dichas afecciones sea al menos de 1:1000-1:5000 (1).

Deficiencias predominantemente de anticuerpos

El comité de Errores Innatos de la Inmunidad de la Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas (IUIS) clasificó dichas enfermedades en 10 grupos de acuerdo al defecto que presenta (1), uno de los grupos a destacar es en el que se encuentran las deficiencias predominantemente de anticuerpos, ya que, de acuerdo a los registros de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID)

entre los años 2004 y 2014 fueron las inmunodeficiencias primarias más diagnosticadas, con un porcentaje mayor al 50% cada año (5).

En la figura 1 se observa la prevalencia de cada grupo de inmunodeficiencia primaria, siendo los desórdenes predominantemente de anticuerpos los más diagnosticados como ya se había mencionado.

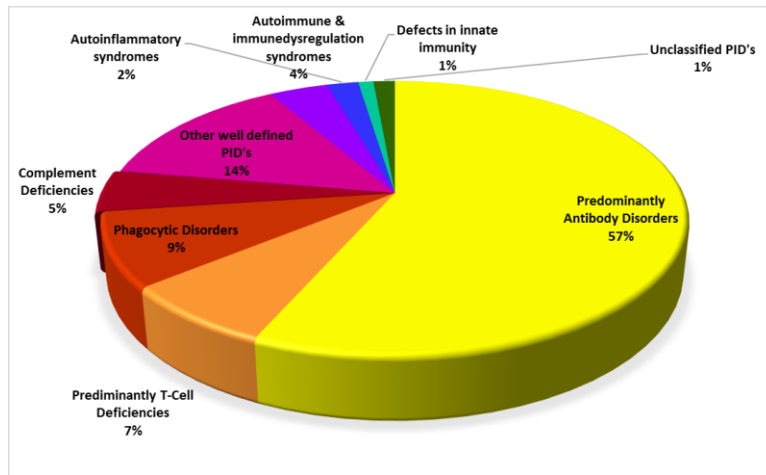


Figura 1. Prevalencia de los grupos de IEI's en reportados por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID). Datos obtenidos de ESID en DataBase Statistics (5)

Las deficiencias predominantemente de anticuerpos también conocidas como inmunodeficiencias humorales se caracterizan por presentar niveles séricos de inmunoglobulinas (Ig's) reducidos o ausentes, aunque también pueden mostrar niveles séricos de Ig's normales o aumentados con una función anormal (6). La producción de anticuerpos defectuosos aumenta la susceptibilidad, principalmente a las infecciones bacterianas que involucran el tracto respiratorio superior e inferior, también pueden causar abscesos en la piel u otros órganos, meningitis, infecciones del tracto urinario y artritis, las infecciones virales recurrentes también son comunes, así como las infecciones intestinales parasitarias causantes de diarreas (2). Actualmente se tienen definidos más de 20 trastornos por deficiencia de anticuerpos (6). Las inmunodeficiencias humorales pueden depender de una variedad de defectos que interfieren con el desarrollo, la maduración y/o la función de las células B (2).

En la figura 2 se muestran las inmunodeficiencias humorales más prevalentes, en donde, se observa que las más frecuentes son la deficiencia selectiva de IgA y la Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV).

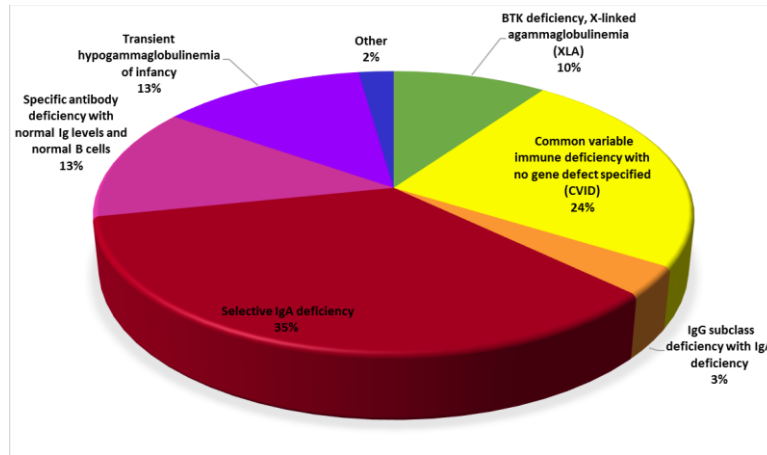


Figura 2. Prevalencia de inmunodeficiencias humorales reportado por la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID). Datos obtenidos de LASID en General Statistics (7)

Inmunodeficiencia Común Variable

Entre las deficiencias predominantemente de anticuerpos se encuentra la Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) que abarca el grupo más grande de inmunodeficiencias primarias sintomáticas, con una incidencia entre 1:10,000 y 1:50,000. Existen diferencias regionales en la incidencia, la IDCV es un diagnóstico poco frecuente entre asiáticos y afroamericanos, no se ha observado una predisposición de género y edad (8). La IDCV se refiere a un grupo de deficiencias de anticuerpos que carecen de una clasificación genética o fenotípica más específica. Es la clasificación de inmunodeficiencia con el mayor número de componentes, probablemente debido a las numerosas formas en que la producción de anticuerpos puede verse afectada y la frecuencia en que la producción de anticuerpos se deteriora en los seres humanos (9). De acuerdo con los datos reportados por la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID) la IDCV es la segunda inmunodeficiencia de mayor diagnóstico, pues se reportaron 1,040 casos de IDCV (de un total de 8,304 casos de inmunodeficiencias totales) lo cual corresponde al 12.52% del total de las inmunodeficiencias diagnosticadas en Latinoamérica (7).

La IDCV fue descrita en 1953 (10), pero fue hasta 1971 que se acuñó el término de “inmunodeficiencia común variable” por un comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un diagnóstico de exclusión, es decir, todos aquellos pacientes que presentan hipogammaglobulinemia que no pertenecieran a los síndromes ya conocidos ya sea por la descripción clínica o por el tipo de herencia (11). En 1999 los representantes del Grupo Panamericano de Inmunodeficiencias (PAGID) y de la ESID determinaron los criterios de diagnóstico para inmunodeficiencias primarias, los criterios correspondientes a la IDCV son los siguientes (12):

- Probable

Paciente masculino o femenino quien tiene una disminución marcada de IgG (al menos 2 desviaciones estándar (SD) por debajo de la media para su edad) y una disminución marcada de al menos uno de los isotipos IgM o IgA, y cumple con todos los siguientes criterios:

- Inicio de la inmunodeficiencia después de los 2 años de edad
- Ausencia de isohemaglutininas y/o mala respuesta a las vacunas
- Que se hayan excluido las causas definidas de hipogammaglobulinemia (Anexo 1)

- Posible

Paciente masculino o femenino que tiene una disminución marcada (al menos 2 SD por debajo de la media para la edad) en uno de los isotipos principales (IgM, IgG e IgA) y cumple con todos los criterios siguientes:

- Inicio de la inmunodeficiencia después de los 2 años de edad
- Ausencia de isohemaglutininas y/o mala respuesta a las vacunas
- Se han excluido las causas definidas de hipogammaglobulinemia (Anexo 1)

- Espectro de la enfermedad

Se reconoce que la mayoría de los pacientes con IDCV tienen inmunodeficiencia en la segunda, tercera o cuarta década de la vida, después de haber tenido varias neumonías; sin embargo, los niños y los adultos mayores pueden verse afectados también. Las infecciones virales,

fúngicas y parasitarias, así como las infecciones bacterianas pueden ser problemáticas. La concentración sérica de IgM es normal en aproximadamente la mitad de los pacientes. Las anomalías en el número o la función de las células T son comunes. La mayoría de los pacientes tienen un número normal de células B; sin embargo, algunos tienen células B bajas o ausentes. Aproximadamente el 50% de los pacientes tienen manifestaciones autoinmunes. Hay un mayor riesgo de malignidad (12).

Debido a que en los criterios de diagnóstico propuestos en 1999 no dejaban claro cuando el diagnóstico de IDCV fuera definitivo, en el año 2016 el consenso internacional de IDCV (CVID ICON) definió a la IDCV de la siguiente manera (11):

1. La mayoría de los pacientes tendrán al menos 1 de las manifestaciones clínicas características (infección, autoinmunidad, linfoproliferación). Sin embargo, se puede conferir un diagnóstico de IDCV a individuos asintomáticos que cumplen los criterios 2 a 5, especialmente en casos familiares.
2. La hipogammaglobulinemia debe definirse de acuerdo con el rango de referencia ajustado por edad para el laboratorio en el que se realiza la medición. El nivel de IgG debe ser repetidamente bajo, en al menos 2 mediciones con más de 3 semanas de diferencia en todos los pacientes. Se puede omitir la medición repetida si el nivel es muy bajo (<100–300 mg/dL dependiendo de la edad), existen otras características, y se considera para una mejor evolución del paciente, iniciar el tratamiento con IgG lo más rápido posible.
3. El nivel de IgA o IgM también debe ser bajo. (aunque algunos expertos prefieren una definición más estrecha que requiere un nivel bajo de IgA en todos los pacientes).
4. Se recomienda que todos los pacientes con un nivel de IgG de más de 100 mg/dL se estudien para las respuestas a los antígenos dependientes de T (TD) e independientes de T (TI), siempre que sea posible. En todos los

pacientes sometidos a tales pruebas, debe haber un deterioro demostrable de la respuesta al menos a un tipo de antígeno (TD o TI).

5. Se deben excluir otras causas de hipogammaglobulinemia (Anexo 1)
6. Los estudios genéticos para investigar formas monogénicas de IDCV o para polimorfismos modificadores de la enfermedad generalmente no se requieren para el diagnóstico y el tratamiento en la mayoría de los pacientes, especialmente aquellos que presentan infecciones solo sin desregulación inmune, autoinmunidad, malignidad u otras complicaciones. Sin embargo, en estos últimos grupos de pacientes, los defectos de un solo gen pueden ser susceptibles de terapias específicas y el diagnóstico genético molecular debe considerarse cuando sea posible (11).

Aquellos pacientes que cumplen con los 6 criterios anteriores son pacientes con diagnóstico de IDCV definitivo (11).

Sintomatología asociada a la IDCV

En el año 2018 la ESID publicó un artículo con una cohorte de 2700 pacientes con IDCV que fueron monitoreados durante 10 años (2004-2014), dichos pacientes presentaron los primeros síntomas en dos etapas de la vida principalmente, niños menores de 10 años (37.1%) y adultos entre 21 y 40 años (26.9%), además se observó que la muerte prematura en pacientes con IDCV es 3 veces más probable que en el resto de la población y que la pérdida de años saludables es 7.3 veces mayor (13).

Los padecimientos de los pacientes con IDCV son diversos, sin embargo, en la cohorte de 2700 pacientes observaron que el 26.3% presentó infecciones, el registro anual en su mayoría era de infecciones bacterianas, principalmente neumonía (5.6%, 8.5 veces más frecuente respecto a la población en general), meningitis (0.17%, 76.2 veces más frecuente respecto a la población en general) y otras infecciones ya sean respiratorias inferiores o superiores, otitis, varicela, herpes zoster, diarrea, etc., (34.0%). Dichas infecciones en el 26.8% de los

pacientes les produjo bronquiectasias (13). Las neumonías principalmente son causadas por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, por su parte los principales patógenos causantes de meningitis en los pacientes son *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* (14).

Se observó que el 36.0% de los pacientes presentan comorbilidades, tales como esplenomegalia (24.0%), autoinmunidad (25.5%), neoplasias (14.1%), enteropatías (9.9%) y granulomas (9.1%). Además, presentan trastornos de la sangre en el 14.5% de los casos, diferentes a citopenias autoinmunes, en el 50% de los casos son anemias o trombocitopenias (13).

La autoinmunidad es otro de los padecimientos que presentan los pacientes, es 7.6 veces más frecuente su aparición en pacientes con IDCV que en la población en general, siendo las citopenias autoinmunes las más frecuentes, principalmente púrpura trombocitopénica idiopática o PTI (6.0%), seguida de la anemia hemolítica (4.1%). Otras autoinmunidades que presentan los pacientes son las órgano específicas y sistémicas, principalmente hipotiroidismo (3.5%), alopecia areata y vitiligo (2.7%), artritis reumatoide (2.4%) y diabetes tipo I (1.6%) (13).

Anualmente, el 15.6% de los pacientes presentan trastornos del sistema digestivo, los cuales se presentan 8.1 veces más frecuentemente respecto a la población en general, del total de los pacientes que presentan estos padecimientos gastrointestinales el 60.9% presentan enteropatías como gastroenteritis no infecciosa y/o colitis, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, malabsorción y diarrea (13). Los principales patógenos causantes de dichas enteropatías son *Giardia intestinalis*, *Salmonella sp*, *Campylobacter sp*, *Clostridium difficile* y *Yersinia enterocolitica* (14).

Las neoplasias también son diagnósticos frecuentes en los pacientes con IDCV, los tumores sólidos son 2.4 veces más frecuentes en estos pacientes que en el resto de las personas, entre este grupo de tumores los más frecuentes son cáncer de piel (30.8%), cáncer de mama (12.2%), cáncer de pulmón (7.5%) y cáncer gástrico (1.0%), mientras que los linfomas sólo se presentaron en el 3.5% de los pacientes (13).

Defectos celulares en pacientes con IDCV

En los pacientes con IDCV los linajes celulares se han visto afectados, tal es el caso de las células T, se han reportado números disminuidos de células T CD4+, así como defectos en la producción de citocinas y disminuidos porcentajes de células T reguladoras (Treg) (15). Además, los pacientes con IDCV que presentan enfermedades autoinmunes tienen incrementada la población de células T de memoria CD4+CD45RO+, lo cual muestra una correlación negativa entre las células T CD4+ de memoria y las Treg (16).

Otro de los linajes celulares en los que se han visto gran cantidad de defectos son las células B, se ha observado una ligera reducción en el número de células B periféricas en aproximadamente la mitad de los pacientes, en algunos sujetos se han encontrado elevados los números lo cual se asocia con infiltración policlonal de los órganos linfoides y autoinmunidad (17). También se encontró que en el 10% de los pacientes el número de células B se reducen progresivamente debido al aumento de la severidad de la enfermedad (18), otro de los hallazgos son las células plasmáticas exhaustas en los órganos linfoides (19,20).

Existen distintas subpoblaciones de células B en sangre periférica las cuales se han visto afectadas en los pacientes con IDCV, tales como las células B de memoria con y sin cambio de isotipo (estas células son CD19+, CD27+, IgD- y CD19+, CD27+, IgD+ respectivamente) las cuales en al menos dos tercios del total de los pacientes se encuentran disminuidas, esto lleva a que las células B naive (CD19+, CD27-, IgD+) se encuentren aumentadas, en algunos casos se ha observado el aumento de las células B dobles negativas (CD19+, CD27-, IgD-) estas células son poco estudiadas y fue una población descrita en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), por lo que se relacionan principalmente con procesos autoinmunes, si bien, aún no se conoce con certeza la función de dichas células algunos investigadores proponen que pueden ser un tipo de memoria (21,22).

Además, se encuentran las células B transicionales (CD19+, CD24+, CD38+), las cuales son células B inmaduras que salieron de médula ósea y se convertirán en

células B naive, esta subpoblación normalmente disminuye conforme aumenta la edad de la persona, debido a que se va generando memoria inmunológica, sin embargo, en algunos pacientes con IDCV esta población se ha visto aumentada. Si bien, el principal problema radica en la diferenciación hacia células plasmáticas estas son difíciles de evaluar en humanos, ya que se encuentran en médula ósea, es por ello que en sangre periférica se evalúan los plasmablastos (CD19+, CD38+++) que son el estadio previo a la diferenciación terminal y generalmente se encuentran en pequeños porcentajes (23).

Una de las subpoblaciones más atípicas son las células B CD21 bajo, estas células se han visto aumentadas en pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide así como en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) o por el virus de hepatitis C, así como por algunos parásitos como la malaria, se ha observado que esta subpoblación presenta clonas antígeno específicos en infecciones crónicas así como clonas autorreactivas en enfermedades autoinmunes, así mismo se han encontrado similitudes entre este tipo de células y las células B dobles negativas, sin embargo, recientemente fue descrito que las células B CD21 bajo requieren estimulación T dependiente para su desarrollo, estas células se han visto aumentadas en aquellos pacientes con IDCV que cursan la enfermedad con más sintomatología y principalmente en aquellos que además de IDCV presentan alguna enfermedad autoinmune (24–26).

Debido a que se han encontrado variaciones en las subpoblaciones de células B en los pacientes con IDCV se ha podido clasificar a los pacientes con base en esto, las clasificaciones basadas en los porcentajes de células B son la clasificación de Paris (27), la de Euroclass Trial (17), y una de las más utilizadas la clasificación de Freiburg, la cual divide a los pacientes en 3 grupos (25):

- Grupo 1: incluye pacientes con <0.4% de células B CD27+ IgD- (células B de memoria con cambio de isotipo) de las células totales.

Tipo 1a: >20% de las células B CD19+ CD21^{bajo}

Tipo 1b: <20% de las células B CD19+ CD21^{bajo}

- Grupo 2: incluye pacientes con >0.4% de células B CD27+ IgD- (células B de memoria con cambio de isotipo) de las células totales.
- Grupo 3: incluye pacientes con <1% de células B

Defectos genéticos asociados a IDCV

La patología tan distinta entre los pacientes con IDCV derivan de la desregulación que presenten, ya que se han descrito diversos defectos genéticos que involucran distintos tipos de células y todos llevan a un fenotipo de hipogammaglobulinemia. Sólo entre el 2-10% de los casos del total de los pacientes con IDCV, se conoce el defecto monogénico, las mutaciones más frecuentes son en genes de moléculas relacionadas con la regulación del sistema inmunológico tales como LRBA (26.74%), PI3K (26.74%), CTLA-4 (6.42%), NFκB 1 y 2 (6.95%), sin embargo, estas no son las únicas proteínas que se han visto afectadas existen otras propias de linaje linfoide como es el caso de IKAROS (3.21%), IRF2BP2 (0.53%), existen otros defectos propios de células T por ejemplo en ICOS (3.74%). Es de destacar que se han observado gran cantidad de defectos en genes de moléculas específicas de las células B, por ejemplo, en el receptor de BAFF, TACI de las cuales ya se encuentra bien definido el defecto, así como moléculas coestimuladoras tal es el caso de CD19 (3.74%), CD81 (0.53%), CD27 (4.81%), CD21 (1.07%) y CD20 (0.53%). Además, se han encontrado defectos en los genes que codifican para IL-21 (0.53%) y su receptor IL-21R (3.21%), esto es interesante ya que dicha interleucina tiene un papel muy importante en la reacción de centro germinal(28–44). Es de destacar que en el año 2018 se describió el caso de un paciente con diagnóstico de IDCV que presentó una mutación de ganancia de función en STAT3 (45)

En la figura 3 se observan los defectos más frecuentes asociados a la IDCV, destacando que se han encontrado defectos en los genes de interleucina 21 (IL-21) así como en su receptor (IL-21R).

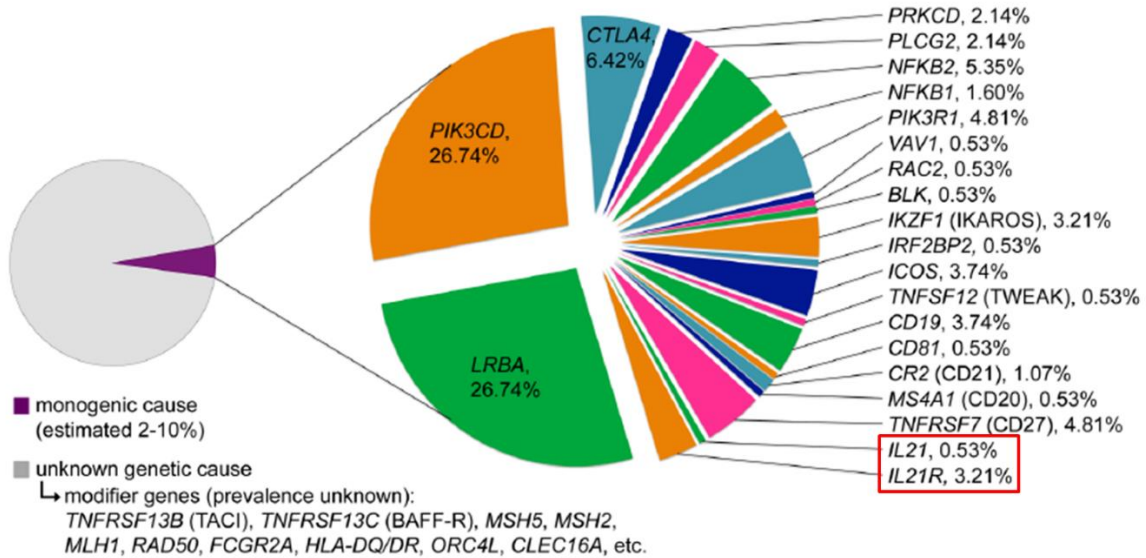


Figura 3. Genes asociados a la Inmunodeficiencia Común Variable (46)

La importancia de la reacción de centro germinal para las células B

La reacción de centro germinal consta de pasos secuenciales, en los que las células B proliferan acumulándose en la zona oscura del centro germinal, mientras que la progenie que no está proliferando migra a la zona clara donde se encuentran las células dendríticas foliculares (FDC) y las células T foliculares (T_{FH}), en ese contexto es en donde se producen acontecimientos selectivos, derivados de la maduración de la afinidad, el cambio de isotipo y la hipermutación somática (47,48).

El centro germinal es la región en la cual se lleva a cabo la respuesta de las células B de tipo T-dependiente, lo cual lleva a las células B a diferenciarse hacia células plasmáticas o células B de memoria. Todo comienza cuando las células B y T reciben señales de IFN tipo I lo cual genera que ambos tipos de células sobreexpresen CD69 y disminuyan la expresión de S1PR (receptor de esfingosina) lo cual evita que las células sigan migrando y se mantengan en los órganos linfoides secundarios. Una vez que la célula B reconoce a su antígeno avanza hacia la zona de T y por el otro lado una vez que le han presentado el antígeno a la célula T lo que la activa y la hace avanzar hacia la zona de B, en la

frontera del folículo es donde se llevará a cabo el primer contacto entre dichas células (47,48).

Una vez que se llevó a cabo el primer contacto la célula B lleva a la célula T al folículo para formar el centro germinal, en donde comenzará la interacción entre estas células, una de estas señales es la del ligando de CD40 (CD40L), encontrado en la superficie de las células T foliculares, CD40L interactúa con CD40, molécula encontrada en la superficie de las células B. La señalización por CD40L es de gran relevancia ya que activa vías de la célula B que le permiten proliferar, así como los procesos de maduración de la afinidad y cambio de isotipo (49,50).

En la figura 4 se observan las señales que inducen la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas en la reacción de centro germinal, en la cual se destaca el papel de la IL-21.

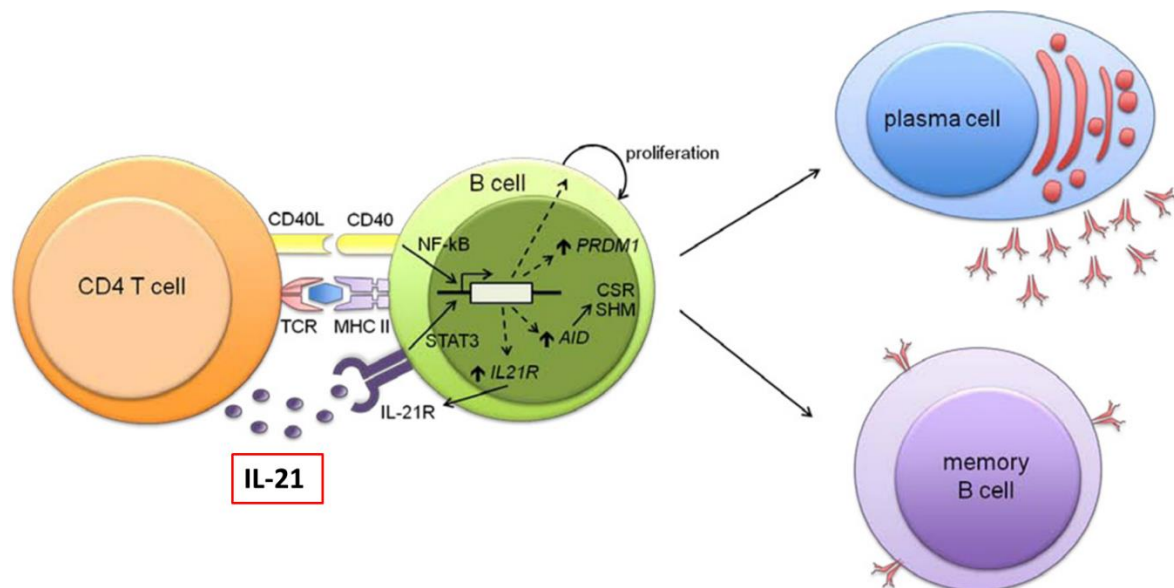


Figura 4. Señales T-dependientes que activan a la célula B e inducen su diferenciación hacia célula plasmática o célula B de memoria (51)

Vía de señalización IL-21/STAT3 en células B

Otra de las señales importantes en el centro germinal es la de las citocinas, específicamente la interleucina 21 (IL-21) que actúa como un potente inductor de la diferenciación de células B (52), así como de su proliferación en el centro germinal (53). La vía de señalización que activa la IL-21 en las células B comienza

con su unión al receptor de IL-21 (IL-21R), el cual activa a las proteínas cinasas de Janus, específicamente JAK1 y JAK3, las cuales fosforilan a las proteínas STAT (por sus siglas en inglés signal transducer and activation of transcription) principalmente STAT3 pero también se fosforilan las proteínas STAT1 y STAT5, estas se dimerizan y se translocan al núcleo induciendo la transcripción de genes, lo que deriva en el aumento de la transcripción de los factores Blimp1 y Bcl-6, así como la disminución del factor Pax5, lo cual determina la diferenciación hacia células plasmáticas o células B de memoria (54). Se ha observado que la IL-21 no sólo activa la vía de JAK-STAT sino también las de PI3K y MAPK tal como se muestra en la figura 5 (54).

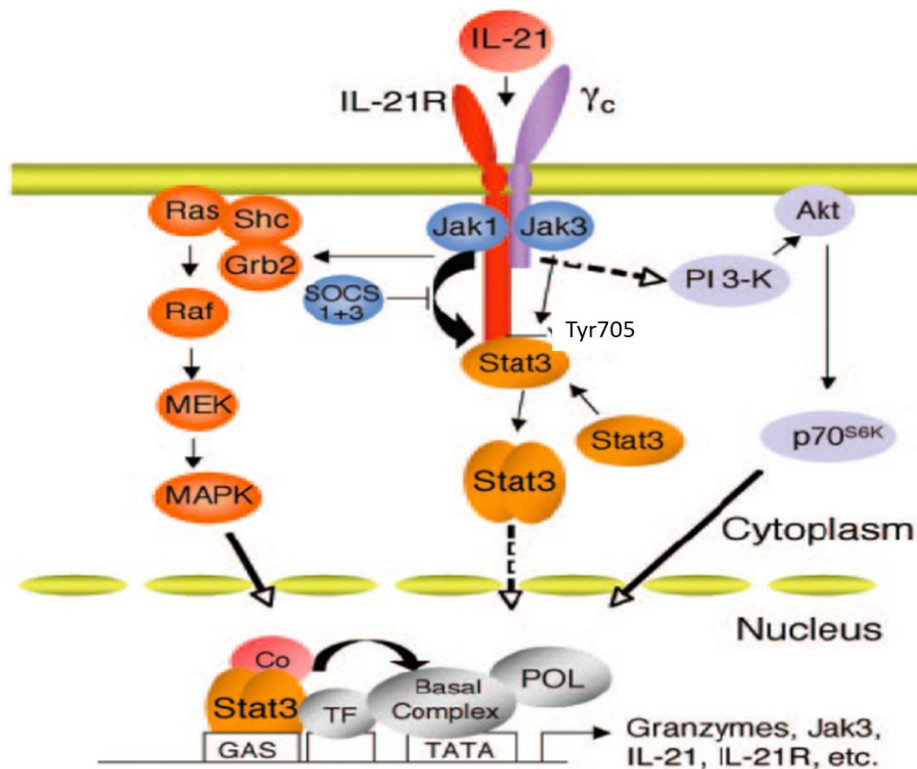


Figura 5. Vía de señalización IL-21/STAT3 (55)

La IL-21 es una citocina pleitrópica de tipo I, está compuesta por cuatro cadenas α-hélice, es producida principalmente por las células T y NKT, tiene efecto sobre diversos linajes celulares tales como células T, células B, macrófagos, monocitos y células dendríticas (56). La deficiencia de IL-21 debido a un defecto genético está

asociada con la enfermedad inflamatoria intestinal, típicamente los pacientes presentan números bajos de células B en circulación (57).

IL-21R pertenece a los receptores de citocinas de tipo I, se encuentra en la membrana de las células B (además de otras células), es un receptor de un solo pase transmembranal, que en el dominio extracelular posee el motivo WS (WSXWS, donde W es triptófano, S es serina y X cualquier otro aminoácido) que es altamente conservado en estos receptores, el IL-21R es un heterodímero conformado por las cadenas α (IL-21R α) y gamma común (γ_c), la cual es compartida con un grupo de receptores de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21) (35). Las mutaciones de pérdida de función en IL-21R α se ha observado que causan funciones deficientes en las células B y T y en algunos casos en las células NK, mientras que mutaciones de pérdida de función en la cadena γ_c da un fenotipo de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (58–60). La deficiencia de IL-21R está clasificada como un IEI, se caracteriza por presentar colangitis crónica y enfermedad hepática, además de tener una predisposición a infecciones causadas por criptosporidios (59,61).

La cinasa de Janus 3 (JAK3) está asociada al dominio citoplásmico de la cadena γ_c del IL-21R, mientras que JAK1 está asociada a la cadena α (35). Las proteínas JAK están conformadas aproximadamente por 1,100 aminoácidos en dominios en tándem, presentan 7 dominios de homología Jak (JH), el dominio JH1 es el que presenta las características de cinasa, el dominio JH2 es similar al dominio JH1 la diferencia es que es catalíticamente inactivo por lo que se conoce como pseudocinasa, los dominios JH3-JH5 forman un dominio parecido al SH2 (Src Homology 2) que permite la unión con sus moléculas diana, los dominios JH6 y JH7 forman el dominio FERM el cual interactúa con la proteína transmembranal, en este caso el IL-21R (62). La pérdida de función de JAK3 está reportado como un fenotipo de SCID, mientras que la ganancia de función ha sido asociada con algunas leucemias (58). Las mutaciones de pérdida de función de JAK1 se han visto relacionada con presencia de patógenos intracelulares (63).

El receptor de IL-21 se activa y fosforila a las proteínas JAK, lo que lleva al reclutamiento de las proteínas de STAT (signal transducer and activation of transcription) principalmente STAT3, las moléculas de STAT asociadas al receptor se fosforilan en el residuo de tirosina 705 (Tyr705) que se encuentra en el dominio de transactivación, lo que les permite dimerizarse y translocarse al núcleo para alterar la expresión génica. Después de la activación y translocación al núcleo STAT3 se une clásicamente a la secuencia canónica CCT(N)₃GAA para activar o reprimir la transcripción génica (64). Se han visto asociados factores de transcripción adicionales que forman complejos con STAT3, tal es el caso de IRF4 en las células B, se sabe que la unión cooperativa de IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) con las proteínas de la familia ETS PU.1 o SPIB aumenta la afinidad de unión de IRF4, lo que resulta en el uso de elementos compuestos ETS-IRF4 o EICE (56). STAT3 también está regulada negativamente por varios mecanismos que incluyen la regulación negativa del supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS3) y el inhibidor de proteínas de STAT3 activado (PIAS3) (64).

La proteína STAT3 pertenece a una familia de factores de transcripción de 7 miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) responsables de transmitir diversas señales de citocinas desde la membrana celular al núcleo para alterar la expresión génica. STAT3 está compuesta por 24 exones ubicados en el cromosoma 17q21, y es una proteína que está altamente conservada en todas las especies (64). La proteína STAT3 al igual que el resto de los miembros de la misma familia comparten una estructura tridimensional caracterizada por presentar seis motivos o dominios (65):

1. Dominio amino-terminal (NTD)
2. Dominio en espiral (CDD)
3. Dominio de unión al DNA (DBD)
4. Dominio conector (LD)
5. Dominio SH2 (Src homology 2)
6. Dominio de transactivación (TAD)

Como resultado del splicing se conocen dos isoformas principales de STAT3 (α y β) que difieren en la longitud del TAD (~ 50 residuos en STAT3 α y ~ 7 residuos en STAT3 β) (65). La isoforma principal de STAT3 en el humano es STAT3 α , que es una proteína de 770 aminoácidos, 92 kDa (64).

Las mutaciones de pérdida de función en STAT3 se han asociado al síndrome de hiper IgE autosómico dominante (HIES), mientras que las mutaciones de ganancia de función se han asociado a manifestaciones autoinmunes o alérgicas, tales como citopenia autoinmune, linfadenopatía, enteropatía y autoinmunidad multiorgánica incluida diabetes tipo I, tiroiditis, hepatitis, artritis y enfermedad pulmonar intersticial (66).

Hasta el año 2018 se habían encontrado 28 mutaciones de ganancia de función diferentes en STAT3, se tenían identificados 42 pacientes de los cuales se observó que el inicio de la enfermedad era temprano, entre los 0.5 y 5 años, clínicamente las manifestaciones presentadas con mayor frecuencia son citopenias (66.67%), linfoproliferación (64.29%), enteropatía (57.14%), enfermedad pulmonar intersticial (35.71%), tiroiditis (30.95%) y diabetes (23.81%), en algunos de los casos los pacientes presentaban inmunodeficiencias (67). En el año 2015 Clemente *et al.* encontraron un aumento en la fosforilación de STAT3 al activar células B de pacientes con IDCV con distintos estímulos, incluyendo IL-21 (68).

La activación con IL-21, a través de su receptor, induce la transcripción de genes importantes para la célula B tales como Bcl-6 y Pax-5 que son factores importantes para la formación del centro germinal, mientras que Blimp-1 induce la diferenciación terminal de las células B hacia células plasmáticas o células B de memoria (69).

La diferenciación de las células B hacia células plasmáticas (PC) está regulada por programas y redes transcripcionales que están influenciados por numerosas entradas y factores microambientales. Estos incluyen la naturaleza del antígeno y del subconjunto de células B que responden, la ubicación en la que se produce el encuentro con el antígeno, entre otros. Los factores de transcripción involucrados

en la regulación de la formación de las PC incluyen los represores transcripcionales Bcl-6 y la proteína Blimp-1, la cual está codificada por el gen *PRDM1*, así como los factores de transcripción Pax-5, XBP-1 e IRF4. Así, mientras que Bcl-6 se expresa en células B del centro germinal, bloquea la diferenciación a PC y mantiene a las células B mediante la supresión de Blimp-1 (70,71).

La expresión de Blimp-1 controla la diferenciación de PC al restringir el programa de expresión génica de células B maduras, regulando negativamente un conjunto de genes que incluyen *MHC*, *CIITA*, *PAX5* y *CMYC*, lo que resulta en una disminución de la expresión de la molécula de clase II, pérdida de identidad células de B y cese de proliferación, respectivamente. Blimp-1 también coordina la expresión de XBP-1, lo que permite la expansión del aparato secreto necesario para la síntesis de proteínas en la diferenciación de PC secretoras de anticuerpo (70).

Si bien, en este trabajo nos enfocamos en la vía de señalización IL-21/STAT3 es de destacar que han sido identificados distintos defectos en diversas vías de señalización centrándonos en las vías afectadas en las células B se ha observado que uno de los defectos más notorio es en la señalización del receptor de células B (BCR) teniendo problemas en la activación lo cual se ha relacionado con defectos en los receptores membranales o enzimas que participan en la transducción de señales de la cascada (72).

Así mismo, se han observado defectos en la señalización mediada por receptores tipo toll (TLR) los cuales están involucrados con la respuesta inmune innata reconociendo distintos ligandos relacionados principalmente con componentes microbianos, si bien los TLR no son receptores que se encuentren únicamente en las células B se ha descrito que TLR7 y TLR9 se han visto afectados los cuales se expresan en esta estirpe celular. TLR9 es un receptor de importancia en las células B ya que es una de las vías innatas que media la diferenciación hacia célula plasmática. Se han observado polimorfismos de un solo nucleótido en TLR9 que ha sido identificado en pacientes con IDCV lo cual deriva en una señalización

deficiente y se ha visto relacionada con una disminución de células B de memoria, además de la afectación en la proliferación, la producción de citocinas, la deficiente producción de inmunoglobulinas de tipo IgG o IgA, entre otros, sin embargo, el receptor no es la única molécula que se ha visto afectada en esta vía (73–77). En los últimos años fue descrito que la activación de TLR9 en células B activa una vía de señalización dependiente de STAT3, la cual induce la diferenciación hacia células B de memoria con cambio de isotipo, esta es una vía que ya fue estudiada en los pacientes con IDCV y presentó defectos en la señalización (78).

Estas sólo son algunas vías que se han visto afectadas en pacientes con IDCV, sin embargo, la lista de defectos en señalización es muy amplia pues cada mutación lleva a una señalización incorrecta en distintos linajes celulares lo cual deriva en un fenotipo clínico de IDCV (79). En los últimos años se han estudiado diferentes vías que puedan explicar un fenotipo de IDCV, es importante ampliar dichos estudios, la vía IL-21/STAT3 es un punto de regulación de la activación de las células B para que se diferencien a células plasmáticas secretoras de anticuerpos, es por ello por lo que estudiar esta vía podría ayudar a entender los mecanismos de diferenciación celular en los pacientes con dicha inmunodeficiencia.

Planteamiento del problema

Los Errores Innatos de la Inmunidad son considerados como enfermedades raras debido a que son poco diagnosticados, sin embargo, dichos padecimientos al estar determinadas por defectos monogénicos nos permiten identificar el papel de diversas moléculas del sistema inmunológico, así como de diversas vías de señalización.

A lo largo de los años la IDCV se ha considerado como una subclasificación de pacientes que presentan hipogammaglobulinemia, de la cual no se conoce el defecto genético, es por ello que una de las formas de abordar el estudio de estos pacientes es evaluando funcionalmente las vías de señalización, esta era la forma de poder entender a estos pacientes como grupo, sin embargo, al ser un conjunto muy heterogéneo es importante determinar las características clínicas y fenotípicas de todas sus poblaciones y subpoblaciones de células del sistema inmunológico en sangre periférica con la finalidad de identificar similitudes y diferencias entre los pacientes.

Actualmente con la secuenciación masiva, dichos pacientes son evaluados individualmente de acuerdo con el defecto genético que poseen, sin embargo, en el presente proyecto se planteó trabajar con un grupo de pacientes con diagnóstico de IDCV de los cuales no se conociera el defecto genético y evaluar su respuesta tras la inducción de la vía señalización IL-21/STAT3, el trabajo de la Dra. Laura Berrón Ruiz comprende diversos estudios desde la producción de IL-21 por parte de las células T, hasta la diferenciación terminal de la célula B y la producción de anticuerpos, cabe destacar que gran parte de dicho proyecto está siendo desarrollado por una de sus alumnas de doctorado, en cuanto al trabajo que aquí se muestra sólo son algunas de las evaluaciones de la vía para dar un panorama general de la funcionalidad de la células B en dichos pacientes.

La idea en un principio era evaluar a la misma cohorte de pacientes en las diversas pruebas, sin embargo, debido a la situación sanitaria esto no se pudo llevar a cabo, es por ello por lo que se trabajó con diferentes cohortes en cada uno

de los ensayos, de lo cual lo único que se tiene en común es que todos son pacientes con el mismo diagnóstico clínico.

Justificación

El campo de los errores innatos de la inmunidad en México no es muy estudiado, debido a la falta de experiencia en caracterización fenotípica, funcional y molecular de los pacientes lo cual es determinante para tener un diagnóstico oportuno. Este grupo de enfermedades es de difícil diagnóstico debido a la falta de ensayos que caractericen a cada patología. La IDCV, como se mencionó anteriormente, comprende un gran grupo de pacientes con manifestaciones clínicas muy heterogéneas y por lo mismo, y probablemente, con distintas mutaciones que comparten un fenotipo de hipogammaglobulinemia, es por ello que es relevante estudiar nuevas vías de señalización que en la célula B sean importantes para una óptima formación del centro germinal, donde se realice de manera correcta la hipermutación somática y cambio de isotipo que lleven a la diferenciación de la célula B a célula plasmática secretora de diferentes clases de anticuerpos. La vía de señalización IL-21/STAT3 ha sido descrita como un paso crucial para la diferenciación de las células B, han encontrado resultados que muestran una relación anormal de la fosforilación de STAT3 en pacientes con IDCV, además de una correlación de padecimientos clínicos en algunos pacientes con inmunodeficiencias que tenían mutación de ganancia de función en STAT3, lo cual hace que la vía sea atractiva para explicar el fenotipo clínico. Este estudio contribuirá a la identificación de pacientes con defectos funcionales en dicha vía, además de contribuir al conocimiento científico en el campo de los IIE's, así como de la inmunología humana.

Hipótesis

Las células B de los pacientes con IDCV presentarán defectos funcionales en la vía de señalización IL-21/STAT3.

Objetivos

Objetivo general

Determinar los defectos funcionales en la vía de señalización IL-21/STAT3 en células B de pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable, por medio de estudios funcionales.

Objetivos particulares

- Determinar las poblaciones linfocitarias (CD45++) y de células B (CD19+)
- Determinar las subpoblaciones de células B en sangre periférica: célula B de memoria total (CD19+ CD27+), célula B de memoria con cambio isotipo (CD19+ CD27+ IgD-), célula B de memoria sin cambio de isotipo (CD19+ CD27+ IgD+), célula B naive (CD19+ CD27- IgD+), células B transicionales (CD19+ CD24+++ CD38+++), plasmablastos (CD19+ CD24- CD38+) y células B CD21^{bajo} (CD19+ CD38^{bajo} CD21^{bajo})
- Determinar la fosforilación de la proteína STAT3 en células B (totales, naive y de memoria) de pacientes y donadores sanos
- Describir la capacidad proliferativa de las células B mediada por IL-21 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) obtenidas a partir de pacientes con IDCV y donadores sanos
- Activar *in vitro* PBMC's con rIL-21, provenientes pacientes con IDCV y testigos sanos
- Describir la capacidad de producir y secretar IgM, IgG e IgA de las células B a partir de PBMC's de pacientes con IDCV y donadores sanos.
- Determinar el número de células productoras de anticuerpos en cultivos celulares después de la activación *in vitro* con rIL-21 de pacientes con IDCV y donadores sanos.

Metodología

Esquematización de la metodología empleada

En la figura 6 se muestra el esquema general de la metodología empleada que se llevó a cabo en el presente proyecto

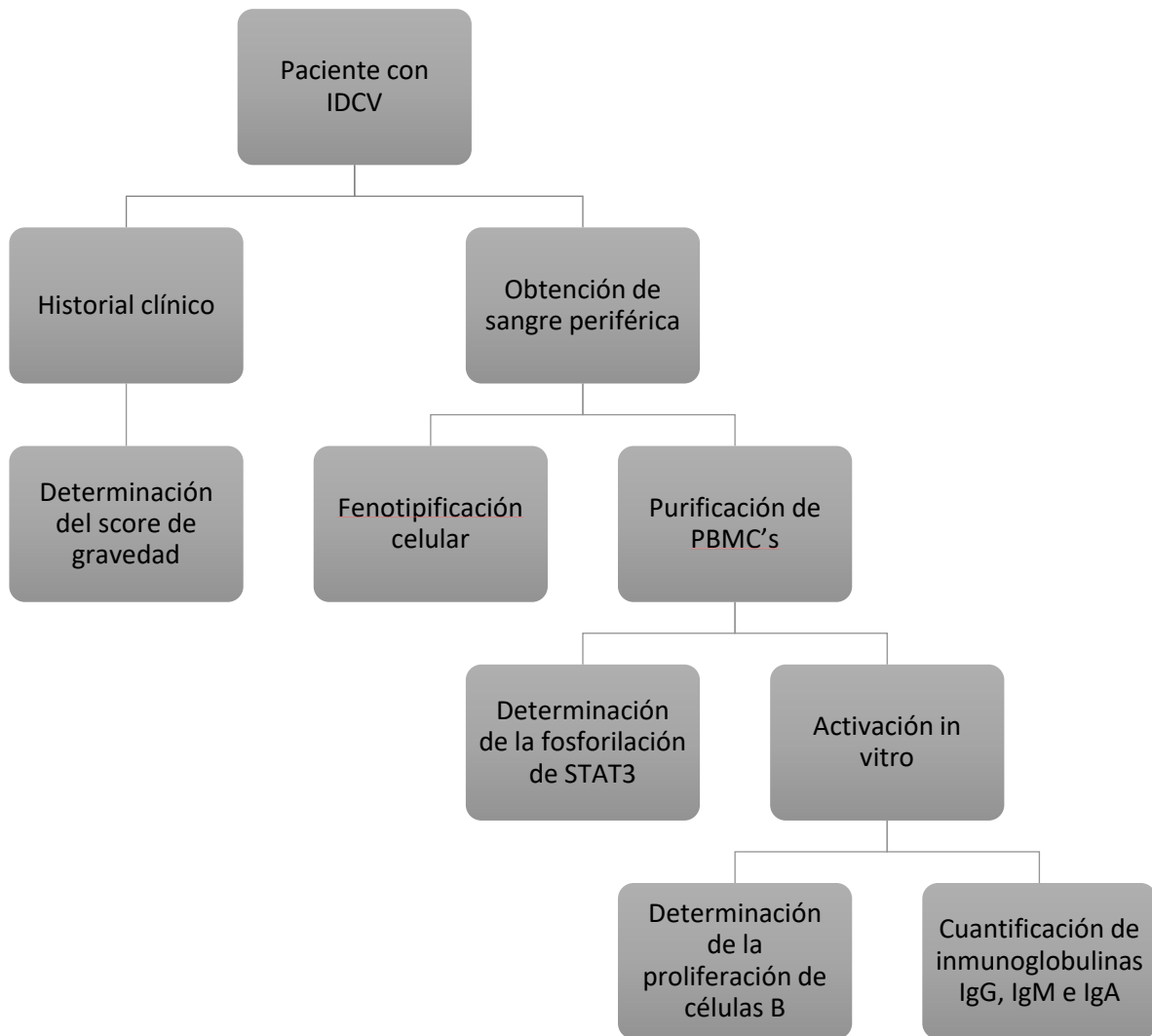


Figura 6. Esquema de la estrategia general empleada

Tipo de investigación

Estudio observacional, prospectivo y descriptivo de un grupo de pacientes mexicanos con diagnóstico de IDCV.

Criterios de inclusión

En el presente trabajo se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de IDCIV, de cualquier género, en el caso de los que eran menores de edad, fueron pacientes cuyos padres o tutores aceptaron (mediante la firma de un formato de consentimiento informado) participar en el estudio, mientras que de los mayores de edad (además de los mayores de 12 años) se requirió firma de asentimiento informado por parte del paciente. El protocolo 27/2016 fue aceptado por el comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría. Así mismo, en el presente proyecto se aseguró de salvaguardar la identidad de cada uno de los participantes.

Criterios de exclusión

Se excluyeron a aquellos pacientes en los que se detectaron causas secundarias de hipogammaglobulinemia y pacientes que recibían fármacos inmunosupresores, así como aquellos pacientes de los cuales ya se conocía el defecto genético causante del fenotipo clínico.

Determinación del score de gravedad

La gravedad de la enfermedad se determinó tomando como referencia el score de severidad propuesto por Mokhatar et al. siendo el resultado a partir de los valores numéricos correspondientes a los padecimientos que presentan o han presentado los pacientes, el número de veces que se presentó el padecimiento corresponde a toda la historia clínica, tal como se muestra en la tabla 1(80).

Tabla 1. Criterio para determinar el score de gravedad de IDCV (80)

Puntos	0	1	2	3
Sinusitis crónica	Ausente	Presente	-	-
Meningitis o encefalitis	Ausente	Una vez	Dos veces	Más de dos veces
Neumonía	Ausente	Una vez	Dos veces	Más de dos veces
Bronquiectasias	Ausente	Un lóbulo	Dos lóbulos	Más de dos lóbulos
Otras patologías pulmonares	Ausente	Sospecha	-	Confirmado
Cirugía pulmonar	Ausente	-	-	Realizado
Esplenomegalia	Ausente	11-14.9 cm	15-20 cm	>20 cm
Esplenectomía	Ausente	-	-	Realizado
Linfadenopatías	Ausente	<2 cm	2-3 cm	>3 cm
Enteropatías	Ausente	Intermitente	Crónica	Severa
Enfermedades autoinmunes	Ausente	Sospecha	-	Confirmado
Otras complicaciones reumatológicas	Ausente	Sospecha	Confirmado	-
Granulomas	Ausente	Sólo piel	Pulmón, hígado o bazo	SNC
Linfoma	Ausente	-	-	Presente
Cáncer (tumor sólido)	Ausente	-	-	Presente

Clasificación de los pacientes

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos, 1 y 2, tomando como referencia el porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo respecto al total de linfocitos, el valor tomado es 0.4% tal como lo sugiere la clasificación Freiburg, en donde el grupo 1 tiene porcentajes disminuidos mientras que el grupo 2 tiene porcentajes normales de dichas células (22).

Obtención de muestra sanguínea

Se obtuvieron muestras de sangre periférica tanto de pacientes con IDCV como de testigos sanos mediante punción venosa en tubos de 8.5 mL con ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa) como anticoagulante (BD Vacutainer®).

Fenotipificación celular en sangre periférica

Tras la obtención de las muestras de sangre total se hizo la tipificación por citometría de flujo. Se realizaron tinciones para determinar las proporciones de las

diferentes poblaciones celulares, para lo cual se emplearon las siguientes mezclas de anticuerpos monoclonales:

- Tinción para determinar el porcentaje de linfocitos
antiCD14 PerCP (Beckman Coulter) /antiCD45 FITC (Beckman Coulter)
- Tinción para determinar el porcentaje de células B
antiCD3 FITC/antiCD19 PE/antiCD45 PerCP (BD Tritest™)
- Tinción para determinar células B de memoria con y sin cambio de isotipo, células B naive y células B dobles negativas
antiCD19 APC (BD Pharmingen) /antiCD27 PE (BD Pharmingen) /antiIgD FITC (BD Pharmingen)
- Tinción para determinar células B transicionales y plasmablastos
antiCD19 APC (BD Pharmingen) /antiCD24 PE (BD Pharmingen) /antiCD38 FITC (BD Pharmingen)
- Tinción para determinar células B CD21bajo
antiCD19 APC (BD Pharmingen) /antiCD21 PE (BD Pharmingen) /antiCD38 FITC (BD Pharmingen)

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se procedió a lisar los eritrocitos con solución de lisis (BD FACST™), se incubaron durante 10 minutos y se lavaron por duplicado con PBS, finalmente se adicionó solución fijadora al 1% (Anexo 4), las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACS Aria I.

Conteo de leucocitos totales

Se realizó un conteo de leucocitos totales mediante el uso de la cámara de Neubauer (Marienfeld-superior) realizando una dilución de la muestra 1:10 mediante la tinción de Turk, la cual consiste en agregar solución de Turk (Anexo 4) y sangre, inmediatamente se contaron las células en el microscopio (Carl Zeiss) la lectura se realizó en dos cuadrantes y mediante la ecuación 1 se calculó el número de leucocitos presentes, donde LT es el número de leucocitos totales, A y B son el número de células contadas en cada cuadrante, 10 representa el factor de la cámara y 10 es la dilución empleada:

$$LT \left(\frac{\text{células}}{\text{mm}^3} \right) = \left(\frac{A + B}{2} \right) (10)(10)$$

Ecuación 1. Cálculo de leucocitos totales en sangre periférica

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's)

La purificación de PBMC's se realizó a partir de sangre total utilizando Lymphoprep™ con una relación 2:1, se separaron mediante gradiente de densidad y centrifugación, se recuperaron las PBMC's, se lavaron por duplicado con PBS y se resuspendieron en PBS.

Conteo de células totales

El conteo celular se realizó utilizando la cámara de Neubauer, con una dilución de muestra 1:10,000 mediante la siguiente tinción, se colocó el volumen adecuado de la suspensión de PBMC's y de azul de tripano 0.4% (Sigma-Aldrich®) y se procedió a contar en el microscopio. El número total de células se obtuvo con la ecuación 2, siendo CT el número de células totales: A, B, C y D el número de células contadas en cada cuadrante, FD el factor de dilución y 10 representa el factor de la cámara:

$$CT = \left(\frac{A + B + C + D}{4} \right) (FD)(10)$$

Ecuación 2. Cálculo de PBMC's

Determinación de la fosforilación de STAT3

Se empleó un millón de PBMC's las cuales se tiñeron con antiCD19 (BD Pharmingen) /antiCD27 (BD Pharmingen), se dejaron incubar a 37°C y 5% CO₂ por 30 minutos, posteriormente se bloquearon con RPMI/SFB 8% durante 1 hora, transcurrido el tiempo se dividieron en tres condiciones: sin estímulo, 15 minutos y 60 minutos; a estas últimas dos condiciones se les adicionó rIL-21 (80ng/mL) (R&D Systems®) con RPMI, se dejaron incubar el tiempo que determinaba cada condición a 37°C y 5% CO₂, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con solución fijadora al 16% (Anexo 4). Posteriormente, se adicionó metanol frío a cada muestra para permeabilizar la membrana de las células y se incubó durante 30 minutos a 4°C, se lavaron las muestras con PBA (Anexo 4), se agregó anti-

pSTAT3 (BioLegend) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, por último, las muestras se fijaron con solución fijadora al 1% (Anexo 4), las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACS Aria I.

Ajuste del número de células B para activación posterior

Para garantizar que en los cultivos la cantidad de células B era similar entre todos los pacientes y testigos realizamos un ajuste al número de células totales, tomando en cuenta el porcentaje de células B que tenía cada individuo en sangre periférica, tal como se muestra en la ecuación 3, donde B es el volumen de suspensión de PBMC's, CB es la cantidad de células B requeridas, V es el volumen de la suspensión de células en mL, CT es el número de células totales obtenido mediante la ecuación 2, %B es el porcentaje de células B obtenido a partir de las tinciones de fenotipo.

$$B(\text{mL}) = \frac{(CB)(V)}{(CT)(\%B)}$$

Ecuación 3. Cálculo de células B

Activación *in vitro* para cultivo celular

Se realizó la activación *in vitro* utilizando para cada condición un millón de células B de los donadores sanos y los pacientes, las cuales se cultivaron por 7 días a 37°C, 5% CO₂.

Para la técnica de proliferación se emplearon las siguientes condiciones:

- Sin estímulo
- 3 estímulos
 1. CpG 3.85 µg/mL o 0.5 nmol (ODN 2006, Invivogen)
Oligonucleótido de DNA bacteriano capaz de activar TLR9 en células B
 2. Pansorbin 1:5000 (*Staphylococcus aureus* Cowan SAC, Merck)
Pared celular de *Staphylococcus aureus* que induce la activación de la vía de BCR

3. Pokeweed o PKW 1 µg/mL (Sigma Aldrich)

Lectina que funge como factor de crecimiento de células B y potencia la respuesta de Pansorbin al ser empleados en conjunto.

- CpG 3.85 µg/mL
- rIL-21 80 ng/mL (R&D System), anti-IgM 1 µg/mL (Invitrogen) y CD40L 1 µg/mL (Cell Signaling Technology®)
- anti-IgM 1 µg/mL y CD40L 1 µg/mL

En el caso de la activación in vitro para la determinación de anticuerpos se emplearon las siguientes condiciones:

- Sin estímulo
- 3 estímulos
 1. CpG 3.85 µg/mL
 2. Pansorbin 1:5000
 3. PKW 1 µg/mL
- CpG 3.85 µg/mL
- rIL-21 80 ng/mL

una vez transcurrido el tiempo de cultivo se separó el sobrenadante del paquete celular mediante centrifugación.

Determinación de la proliferación de células B

Se utilizaron cinco millones células B, las cuales se tiñeron con carboxi-fluoresceína diacetato, succinimidyl ester (CellTrace™ CFSE, life Technologies) se lavaron con solución de SFB 8%, posteriormente se realizaron lavados con solución de SFB 2% y se estimularon con las condiciones antes mencionadas, se incubaron por 5 días. Transcurrido el tiempo de cultivo, las células se tiñeron con antiCD19 APC (BD Pharmingen) durante 30 minutos y se fijaron con solución fijadora al 1% (Anexo 4), las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACS Aria I. Los resultados fueron analizados con el programa FlowJo v 7.6 mediante la herramienta de proliferación la cual calcula los ciclos proliferativos mediante los

picos observables de IMF, posteriormente calcula los índices de división y de proliferación, y como se muestra en la ecuación 4, la relación entre estos corresponde al porcentaje de división el cual es el que reportamos en el presente trabajo (81), la condición sin estimular ya no se muestra en los resultados debido a que el programa lo utiliza como referencia para calcular el porcentaje de división de las otras condiciones.

$$\% \text{ División} = \frac{\text{Índice de división}}{\text{Índice de proliferación}} \times 100$$

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de división celular realizado por el programa FlowJo

Cuantificación de anticuerpos mediante ELISA

Con el sobrenadante de los cultivos de las PBMC's activadas de los pacientes y testigos sanos se realizó un ensayo de ELISA para cuantificar IgG, IgA e IgM (semi kits de Bethyl Laboratories, Inc). Las placas de 96 pozos se revistieron con anti-IgG humano (o anti-IgM o IgA) un día antes del ensayo dejándose incubar a 4°C. El día del ensayo se lavaron las placas con solución de lavado (Anexo 4), se bloqueó la placa con solución de bloqueo (Anexo 4) durante 60 minutos a 37°C. Se añadieron los sobrenadantes de los cultivos, así como las diluciones del suero de referencia para realizar la curva de referencia y se incubaron 120 minutos a 37°C. Se lavaron y se incubaron con el conjugado anti-IgG humano/HRP (o anti-IgM o IgA) por 45 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se revelaron con la solución de revelado (Anexo 4). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2M después de 5 minutos, las placas fueron leídas a una densidad óptica de 492 nm en un lector de ELISAS (BioTek Epoch). A partir de los datos obtenidos de absorbancias y tomando los valores de la curva de referencia se calcularon las concentraciones de cada muestra.

Análisis estadístico

Los datos demográficos, clínicos y de laboratorio importantes se resumieron para las variables numéricas con mediana, mínimo y máximo o media y desviación estándar dependiendo del tipo de distribución y en el caso de las variables categóricas con frecuencias y porcentajes. Las variables categóricas se

compararon mediante F de Fisher, las variables numéricas dependiendo del tipo de distribución que presentaron se compararon mediante T de student o U de Mann-Whitney, en el caso de comparaciones de más de dos grupos e igualmente dependiendo de la distribución se realizó la prueba de ANOVA y la prueba post-hoc de Scheffe. Las correlaciones se realizaron con la prueba de Pearson. Así mismo se realizaron todas las pruebas necesarias para determinar el tipo de distribución de los datos, en el caso de los resultados de la IMF de pSTAT3 los datos fueron transformados a Log_{10} para mejorar el desempeño de estos. Los valores de p inferior a 0.05 se consideran significativos, los análisis estadísticos se realizaron con los softwares de GraphPad Prism 8 e IBM SPSS Statistics 25.

Análisis de frecuencias de manifestaciones clínicas de pacientes con IDCV que tuvieron respuesta anormal a la activación con IL-21

Para determinar si los resultados de los pacientes estaban altos normales o bajos se agruparon a los pacientes en cuartiles, y se tomaron los valores del cuartil 25 y 75 para tomar como valores de referencia al 50% de los testigos, respecto a los valores de proliferación la condición en la cual no se observó un aumento en la condición con IL-21 de cada paciente se compararon las condiciones con IL-21, CD40L, α -IgM y la condición con CD40L, α -IgM.

Resultados

Se trabajó con 43 pacientes diagnosticados previamente con IDCV de acuerdo con su perfil clínico, además de cumplir con el criterio de tener bajos valores de inmunoglobulinas (IgG e IgA) en suero, con al menos dos desviaciones estándar por debajo del valor de referencia de acuerdo con su rango de edad. Debido a que no a todos los pacientes se les pudieron realizar cada uno de los ensayos las cohortes de pacientes en cada ensayo son distintas y se analizaron de manera independiente como se muestra posteriormente en la figura 7, los pacientes fueron subclasificados en tres cohortes:

- Cohorte 1: pacientes en los cuales se determinó la proliferación de las células B
- Cohorte 2: pacientes en los cuales se determinaron las concentraciones de inmunoglobulinas en sobrenadantes
- Cohorte 3: pacientes a los cuales se les determinó la fosforilación de la proteína STAT3 en células B

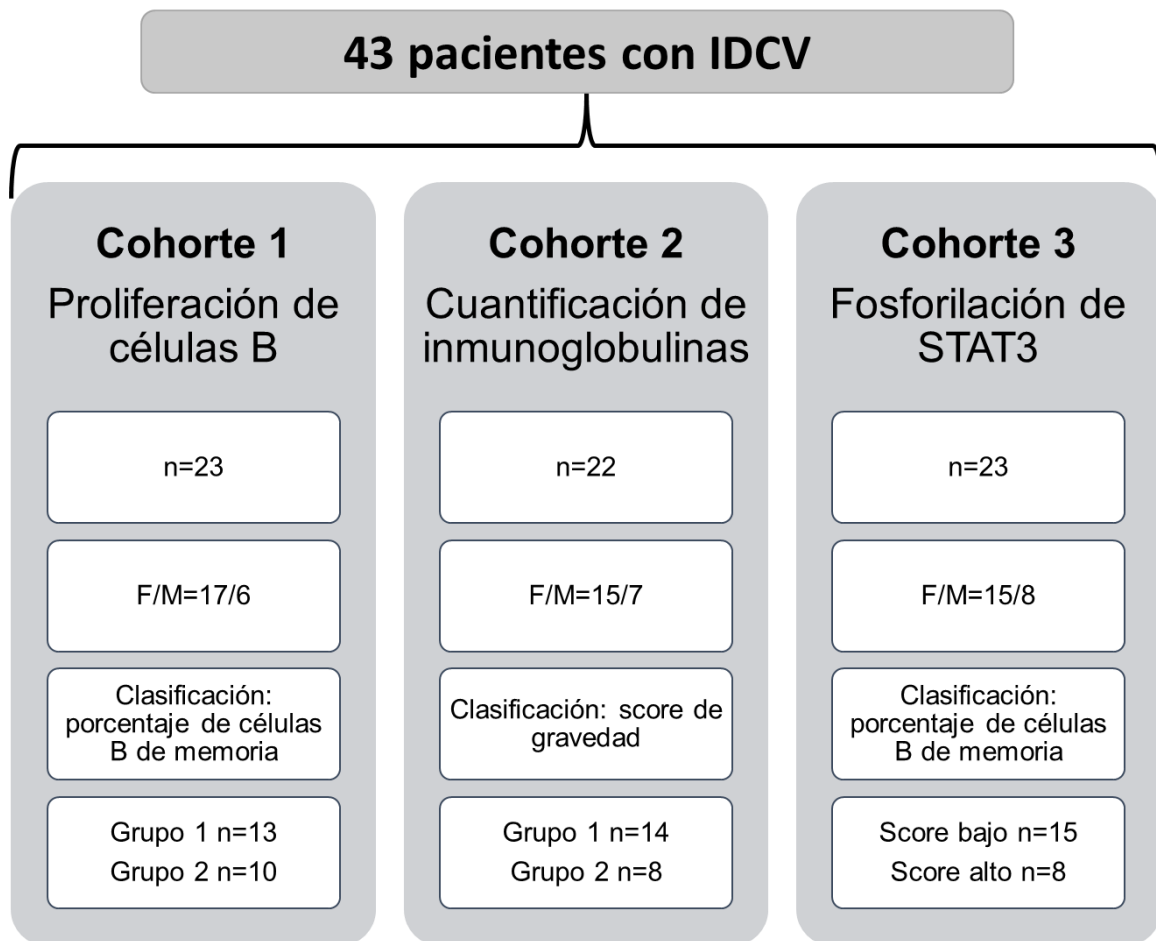


Figura 7. Agrupación de los pacientes. Se muestran las cohortes de pacientes con las que se trabajó en el presente trabajo de acuerdo con la determinación funcional que se les realizó. Cohorte 1: pacientes a los cuales se les realizó la determinación de la proliferación de células B. Cohorte 2: pacientes en los cuales se determinó la cantidad de inmunoglobulinas en sobrenadantes. Cohorte 3: pacientes a los cuales se les realizó la determinación de la fosforilación de STAT3 en células B.

En la tabla 2 se muestran los padecimientos clínicos de los 43 pacientes que fueron incluidos en este estudio, así como el grupo de Freiburg al cual pertenecen, el sexo, la edad al momento de la toma de muestra, las inmunoglobulinas en suero antes de que les fuera administrada la gammaglobulina por primera vez, así como el score de gravedad, el desglose del cálculo del score se muestra en el anexo 2.

Tabla 2. Resultados clínicos de todos los pacientes

No Paciente	Grupo	Sexo	Edad (años)	Ig's en suero			Score	Sinusitis	Neumonía	Bronquiectasias	Esplenomegalia	Linfadenopatías	Enteropatías	Enfermedades autoinmunes	Granulomas	Cáncer
				IgG (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgM (mg/dL)										
1	2	F	2	270	<2	400	5		x		x					
2	1B	F	5	297	<26.6	68.4	6				x		x			
3	1B	F	10	498	40	100	3		x			x				
4	1A	F	14	106	>5	29	8		x			x		x		
5	2	F	13	246	15.8	63.3	3	x			x					
6	1B	F	16	287	<23	36	4	x	x				x	x		
7	1a	M	16	356	1	2	6	x					x	x		
8	2	F	17	530	100	183	3	x	x	x						
9	1B	M	18	320	25	25	8	x	x	x			x			
10	1B	M	19	530	9	10	6				x			x		
11	1B	F	24	183	1	9	5	x	x	x			x			
12	1B	F	29	344	2	1	7	x	x		x			x		
13	2	F	34	134	<26	28.8	9	x	x				x			
14	1B	M	35	575	67.8	95.8	1								x	
15	1A	F	39	43	6.5	1	8	x	x	x	x			x		
16	1B	F	37	33.3	6.7	62.3	21	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	2	F	32	240	10	40	3	x	x							
18	1A	M	43	426	318	4	4	x	x				x			
19	2	M	42	34	2	68	4			x			x	x		
20	2	M	49	<200	<4	<21	4	x	x				x			
21	1B	F	57	301	0	4	7	x	x	x						
22	2	F	52	301	1	5	5		x		x	x				
23	1B	M	67	228	6.6	550	4	x	x							
24	1B	F	16	68	7	5	3		x	x						
25	1B	F	19	226	15	57	13	x	x	x					x	
26	1A	M	31	<7.1	<5.7	16.7	17	x	x		x	x			x	x
27	1B	M	34	452	1	1	11	x	x	x	x	x			x	
28	2	M	22	345	1	1	15	x	x		x			x		
29	2	F	57	301	0	4	7	x	x	x						
30	1A	F	36	85	1	3	1		x							
31	1A	F	21	252	1	1	8	x	x		x			x		
32	2	M	47	150	3	20	5	x			x			x		
33	2	F	49	75.8	88	21	3							x		
34	1A	F	43	6.1	1	5	16	x	x	x	x	x	x	x		
35	1B	M	47	473	10	47	4	x						x		
36	1A	F	27	3.3	1.8	40.9	3	x					x			
37	1B	M	19	281	2.3	17	10	x		x	x	x		x	x	
38	1B	F	20	171	1	1	5	x		x		x				
39	2	F	65	487	30	15	2				x			x		
40	1B	M	62	373	25	25	6		x	x			x			
41	2	F	38	600	31	76	9	x		x			x	x		
42	2	F	32	568	4	173	2						x	x		
43	2	F	17	526	83.6	79.4	6							x		

x: pacientes que han presentado el padecimiento.

1. Fenotipificación celular

A continuación, en la figura 8 se observa de manera general como se realizó la fenotipificación de linfocitos, células B y subpoblaciones de células B tales como células B de memoria con y sin cambio de isotipo, células B naive, células B dobles negativas, células B transicionales, plasmablastos y células B CD21 bajo, el análisis detallado se encuentra en el anexo 5.

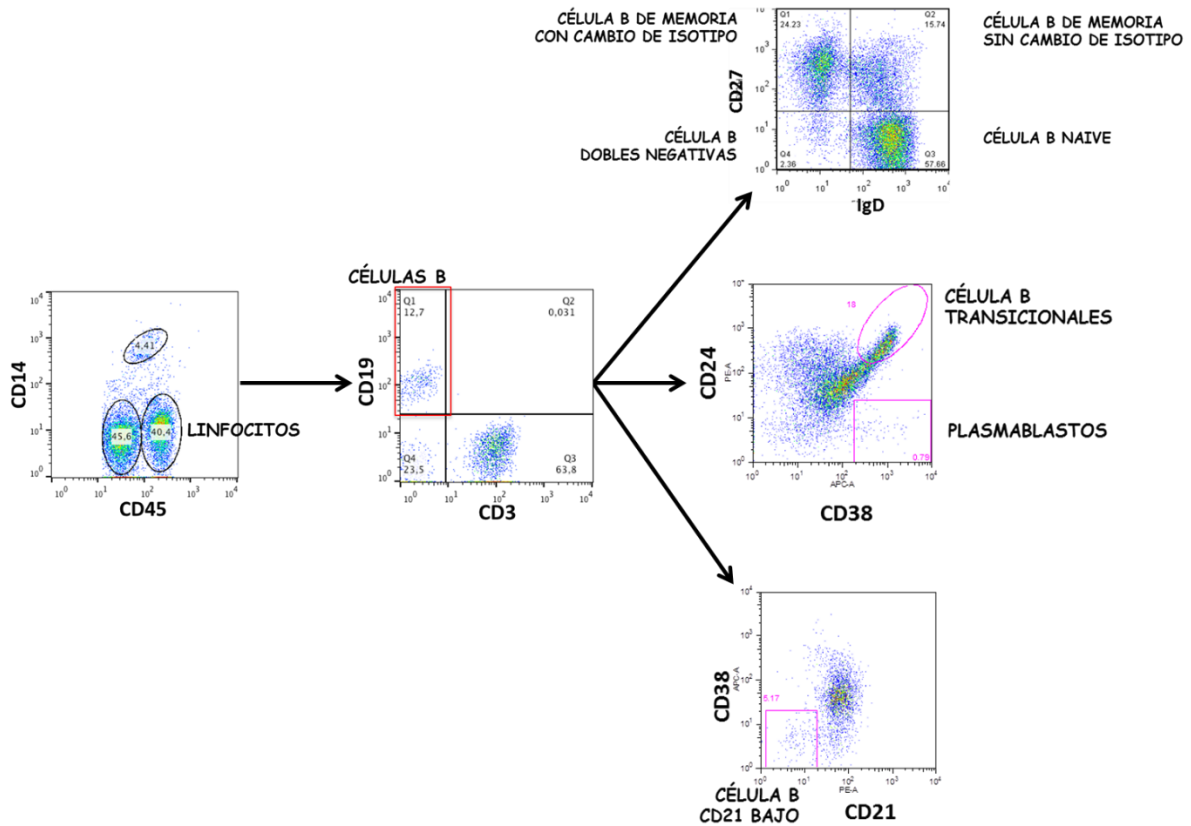


Figura 8. Esquema general de la fenotipificación de linfocitos, así como población y subpoblaciones de células B (células B de memoria con y sin cambio de isotipo, células B naive, células B dobles negativas, células B transicionales, plasmablastos y células B CD21 bajo)

En la tabla 3 se muestran los resultados en porcentajes y números absolutos de linfocitos, células B así como subpoblaciones de células B, con flechas se indica si el valor se encuentra fuera del rango de referencia ya sea superior (↑) o inferior (↓) al mismo.

Tabla 3. Resultados de subpoblaciones de células B de todos los pacientes

No. Paciente	Leucocitos totales mm3	Linfocitos %	Linfocitos mm3	Linfocitos CD19+ %	Linfocitos CD19+ mm3	Célula B Naive %	Célula B Naive mm3	Célula B memoria SCI %	Célula B memoria SCI mm3	Célula B memoria CCI %	Célula B memoria CCI mm3	Células B DN %	Células B DN mm3	Célula B transicional %	Célula B transicional mm3	Plasmablastos %	Plasmablastos mm3	Células B CD21bajo %	Células B CD21bajo mm3
1	9333	52	4853.16 ↑	1 ↓	49 ↓	46	22 ↓	13	6 ↓	22	11 ↓	19 ↑	9	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	69 ↑	33 ↑
2	2725	21 ↓	572 ↓	9	52 ↓	43 ↓	22 ↓	33 ↑	17	18	9 ↓	6	3	7	4	4	2	10	5
3	2550	43	1096 ↓	1 ↓	11 ↓	92 ↑	10 ↓	1 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	29 ↑	3	10 ↑	1	0 ↓	0 ↓	11	1
4	3350	39	1307	7	91 ↓	85 ↑	78	4 ↓	4 ↓	1 ↓	1 ↓	10	9	10 ↑	9	0 ↓	0 ↓	34 ↑	31 ↑
5	10100	12 ↓	1212 ↓	22	267	63	168	3 ↓	8 ↓	10	27	2	5	1	1	0 ↓	1	1	3
6	10250	21 ↓	2153	2 ↓	43 ↓	92 ↑	40 ↓	1 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	7	3	41 ↑	18 ↑	0 ↓	0 ↓	10	4
7	4900	20 ↓	980 ↓	5 ↓	49 ↓	82 ↑	40 ↓	1 ↓	0 ↓	1 ↓	0 ↓	15 ↑	7	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	71 ↑	35 ↑
8	6500	26	1690	19	321	66	212	11	35	15	48	8	26	2	6	0 ↓	0 ↓	1	2
9	10050	15 ↓	1508	16	241	92 ↑	222	2 ↓	5 ↓	0 ↓	0 ↓	25 ↑	60 ↑	24 ↑	58 ↑	0 ↓	0 ↓	3	7
10	6100	22 ↓	1342	15	201	68	137	25 ↑	50	3 ↓	6 ↓	4	8	2	4	0 ↓	0 ↓	13	26
11	9950	26	2587	3 ↓	78 ↓	36 ↓	28 ↓	11	9 ↓	34 ↑	26	2	2 ↓	1	1	2	2	2	2
12	1225	13 ↓	159 ↓	21	33 ↓	83 ↑	28 ↓	9	3 ↓	3 ↓	1 ↓	6	2 ↓	1	0 ↓	0 ↓	0 ↓	4	1
13	4350	19 ↓	827 ↓	18	149	32 ↓	48 ↓	43 ↑	64 ↑	17	25	8	12	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	5	7
14	4150	20 ↓	830 ↓	5 ↓	42 ↓	78	32 ↓	2 ↓	1 ↓	8 ↓	3 ↓	12 ↑	5	10 ↑	4	0 ↓	0 ↓	9	4
15	15500	34	5270 ↑	8	422	82 ↑	346	2 ↓	8 ↓	1 ↓	4 ↓	9	38 ↑	21 ↑	89 ↑	0 ↓	1	26 ↑	110 ↑
16	7200	18 ↓	1296	17	220	87 ↑	192	2 ↓	4 ↓	1 ↓	2	11	24	1	2	0 ↓	1	11	24
17	9100	30	2730	20	546 ↑	50	273	30 ↑	164 ↑	10	55	10	55 ↑	1	5	0 ↓	0 ↓	14	76
18	12900	10 ↓	1290	3 ↓	39 ↓	84 ↑	33 ↓	5 ↓	2 ↓	2 ↓	1 ↓	6	2 ↓	4	2	1	0 ↓	7	3
19	3400	30	1020 ↑	19	194	71	138	13	25	6 ↓	12	10	19	4	8	0 ↓	1	4	8
20	9425	35	3299	7	231	75	173	12	28	7 ↓	16	5	12	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	21 ↑	49 ↑
21	9300	18 ↓	1674	11	184	86 ↑	158	3 ↓	6	1 ↓	2 ↓	20 ↑	37 ↑	5	9	0 ↓	0 ↓	13	24
22	8500	30	2550	20	510	92 ↑	469 ↑	3 ↓	15	2 ↓	10	4	20	5	26 ↑	0 ↓	2	7	36
23	8900	50	4450 ↑	6	267	86 ↑	230	2 ↓	5 ↓	5 ↓	13	6	16	0 ↓	1	1	3	1	3
24	9650	23 ↓	2220	33 ↑	732 ↑	93 ↑	681	4 ↓	29	1 ↓	7 ↓	2	15	12 ↑	88 ↑	0 ↓	0 ↓	3	22
25	5000	31	1550	12	186	67	125	22	41	7 ↓	13	4	7	0 ↓	0 ↓	1	2	9	17
26	14050	47	6604 ↑	3 ↓	198	92 ↑	182	1 ↓	2 ↓	1 ↓	1 ↓	7	14	3	6	0 ↓	0 ↓	60 ↑	119 ↑
27	10525	9 ↓	947 ↓	6	57 ↓	61	35 ↓	6	3 ↓	18	10	16 ↑	9	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	10	6
28	14200	5 ↓	710 ↓	7	50 ↓	37 ↓	18 ↓	10	5 ↓	35 ↑	17	18 ↑	9	1	0 ↓	0 ↓	0 ↓	21 ↑	10
29	2800	36	1008 ↓	15	151	57	86 ↓	5 ↓	8 ↓	20	30	16 ↑	24	2	3	2	3	11	17
30	12936	19 ↓	2458	9	221	84 ↑	186	3 ↓	7 ↓	1 ↓	2 ↓	12	27	5	11	0 ↓	0 ↓	21 ↑	46 ↑
31	2550	13 ↓	332 ↓	2 ↓	7 ↓	53	4 ↓	8	1 ↓	12	1 ↓	27 ↑	2 ↓	1	0 ↓	1	0 ↓	34 ↑	2
32	3500	34	1190 ↓	21	250	74	185	20	50	2 ↓	5 ↓	4	10	3	7	2	5	10	25
33	8350	42	3507	33 ↑	1157 ↑	92 ↑	1065 ↑	2 ↓	23	2 ↓	23	3	35	7	81 ↑	1	12	1	12
34	4500	26	1170 ↓	3 ↓	35 ↓	90 ↑	32 ↓	7	2 ↓	1 ↓	0 ↓	6	2 ↓	2	1	2	1	21 ↑	7
35	6650	27	1796	4 ↓	72 ↓	79	57 ↓	11	8 ↓	3 ↓	2 ↓	7	5	5	4	0 ↓	0 ↓	15	11
36	6450	19 ↓	1226 ↓	17	208	83 ↑	173	13	27	1 ↓	1 ↓	5	10	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	41 ↑	85 ↑
37	2500	8 ↓	200 ↓	3 ↓	6 ↓	87 ↑	5 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	0 ↓	13 ↑	1 ↓	3	0 ↓	0 ↓	0 ↓	50 ↑	3
38	5300	22 ↓	1166 ↓	1 ↓	7 ↓	88 ↑	6 ↓	7	0 ↓	0 ↓	0 ↓	5	0 ↓	17 ↑	1	0 ↓	0 ↓	11	1
39	3350	22 ↓	737 ↓	7	52 ↓	25 ↓	13 ↓	23	12 ↓	29 ↑	15	23 ↑	12	7	4	0 ↓	0 ↓	53 ↑	27
40	3600	37	1332	5 ↓	67 ↓	77	51 ↓	12	8 ↓	8	5 ↓	3	2 ↓	7	5	0 ↓	0 ↓	14	9
41	7150	34	2431	16	389	71	276	11	43	6 ↓	23	13 ↑	51 ↑	1	4	0 ↓	1	20 ↑	78 ↑
42	5000	29	1450	18	261	81 ↑	211	9	23	5 ↓	13 ↓	5	13	7	18 ↑	0 ↓	0 ↓	7	18
43	10200	26	2652	47 ↑	1246 ↑	89 ↑	1109 ↑	5 ↓	62	3 ↓	37	3	37 ↑	22 ↑	274 ↑	0 ↓	4	2	25

Las flechas indican que los valores se encuentran fuera del rango de referencia para su edad (↑) indica que es mayor al límite superior, (↓) indica que es menor al límite inferior

De acuerdo con los valores de cada paciente se observa la variabilidad en los porcentajes de números absolutos de las poblaciones celulares, siendo destacable que en un gran número de pacientes las células B de memoria se encuentran disminuidas, así mismo los valores de células B naive se encuentran aumentados en la mayoría de los pacientes.

2. Cohorte 1.

Resultados de proliferación

- **Resultados clínicos de la cohorte 1**

Se trabajó con 23 pacientes con IDCV, con una media de edad de 36.8 años, siendo 16 femeninos y 6 masculinos en los cuales se observó que los padecimientos más frecuentes son sinusitis (69.6%), enfermedades autoinmunes (56.5%) y neumonía (47.8%).

Al clasificar a los pacientes de acuerdo al porcentaje de células B de memoria se obtuvieron 13 pacientes del grupo 1 y 10 del grupo 2, al comparar sus características clínicas se observó que los pacientes del grupo 1 presentan más neumonía, sinusitis, bronquiectasias, esplenomegalia, granulomas y enteropatías, si bien el score de gravedad no fue significativamente diferente se observa que en los pacientes del grupo 1 dicho valor es mayor que en el grupo 2, además se encontró que los pacientes del grupo 1 tienen menores valores de IgG en suero con respecto a los pacientes del grupo 2, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con IDCV de la cohorte 2, así como su clasificación por el porcentaje de células B de memoria y la comparación de los grupos.

	Pacientes IDCV	IDCV pacientes grupo 1 Células B de memoria <0.4%	IDCV pacientes grupo 2 Células B de memoria >0.4%	IDCV grupo 1 vs IDCV grupo 2 <i>p</i> - value
Número de pacientes	23	13	10	
Sexo (femenino/masculino)	17/6	8/5	9/1	
Edad (media±SD)	36.8±17.1	33.5±17.1	38.7±18.3	
Manifestaciones clínicas (número de casos (%))				
Neumonía	11 (47.8)	8 (61.5)	3 (30.0)	<0.0001
Sinusitis	16 (69.6)	11 (84.6)	5 (50.0)	<0.0001
Bronquiectasias	9 (39.1)	6 (46.2)	3 (30.0)	0.0286
Esplenomegalia	5 (21.7)	4 (30.8)	1 (10.0)	0.0004
Linfadenopatías	10 (43.5)	6 (46.2)	4 (40.0)	0.4752
Granulomas	2 (8.7)	2 (15.4)	0 (0.0)	<0.0001
Enteropatías	11 (47.8)	8 (61.5)	3 (30.0)	<0.0001
Enfermedades autoinmunes	13 (56.5)	7 (53.8)	6 (60.0)	0.4752
Cáncer (tumores sólidos)	1 (4.3)	1 (7.7)	0 (0.0)	0.0021
Score de gravedad (media±SD)	5.9±4.5	7.0±5.4	4.5±2.3	0.2348
Niveles de inmunoglobulinas mg/dL (media±SD)				
IgG (rango de referencia 639-1349 mg/dL)	285.0±187.4	210.1±148.2	378.5±187.0	0.0344
IgA (rango de referencia 70-312 mg/dL)	19.0±31.5	4.9±7.0	35.64±39.7	0.0627
IgM (rango de referencia 56-352 mg/dL)	62.5±120.2	61.5±148.2	63.9±66.4	0.1521

En negritas se indican aquellos valores que fueron estadísticamente significativos, los padecimientos se compararon mediante la prueba F de Fisher, los valores de inmunoglobulinas se compararon mediante la prueba U de Mann Whitney; significancia $p < 0.05$

- **Resultados fenotípicos de la cohorte 1**

Al realizar las comparaciones de poblaciones y subpoblaciones celulares de ambos grupos encontramos que existe diferencia en el porcentaje y números

absolutos de las células B CD19+, las cuales son significativamente menores en el grupo 1, así mismo, tienen menores porcentajes de células B de memoria con cambio de isotipo, es de destacar que el grupo 1 además tiene porcentajes elevados de células B CD21bajo, tal como se muestra en la figura 9, únicamente se muestran las comparaciones que tuvieron diferencia estadística.

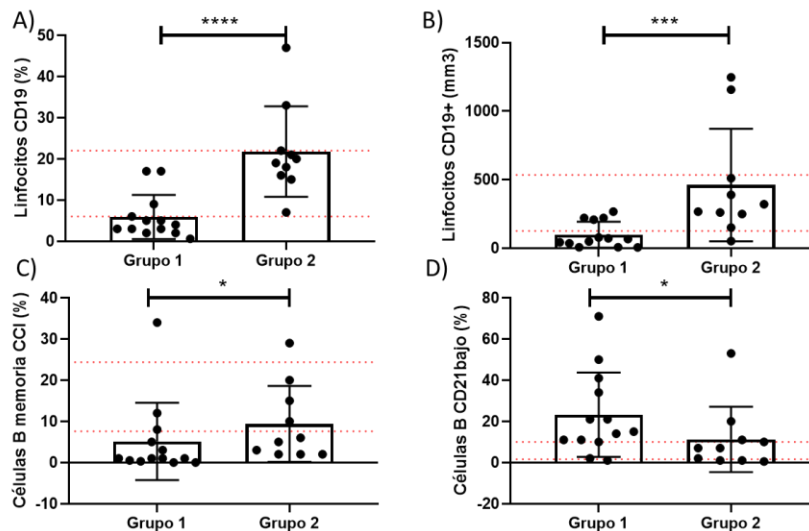


Figura 9. Comparación de poblaciones y subpoblaciones celulares. A) Porcentaje de células B CD19+ ($p < 0.0001$), B) Números absolutos de células B CD19+ ($p = 0.0009$), C) Porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo ($p = 0.0335$), D) Porcentaje de células B CD21 bajo ($p = 0.0400$). Con líneas punteadas se indican los valores de referencia. Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

- **Estrategia de análisis de la determinación de la proliferación de células B**

El análisis para la determinación de la proliferación de las células B en las distintas condiciones de activación se muestra en la figura 10, se comenzó seleccionando la región de células en eventos independientes mediante el uso de tamaño en área y en altura (FSC-A y FSC-H respectivamente), posteriormente se seleccionó la región de linfocitos la cual se determinó por tamaño y granularidad (FSC-A y SSC-A), enseguida se seleccionó la población de células B la cual estaba identificada como CD19+, por último se identificó la expresión de CFSE en la condición sin estimular en la cual se fijaron los parámetros (radio y variación de la fluorescencia mejor conocido como CV) del pico que corresponde a la generación cero, una vez definidos estos parámetros se analizó cada una de las condiciones estimuladas para determinar los picos que corresponden a las siguientes generaciones celulares y mediante la opción de proliferación del programa FlowJo v 7.6 se calculó el porcentaje de división de las células B, debido a que el programa toma como

referencia la condición sin estimular para determinar el porcentaje de división en las comparaciones ya no se muestra la condición sin estímulo pues ya se consideró en el análisis.

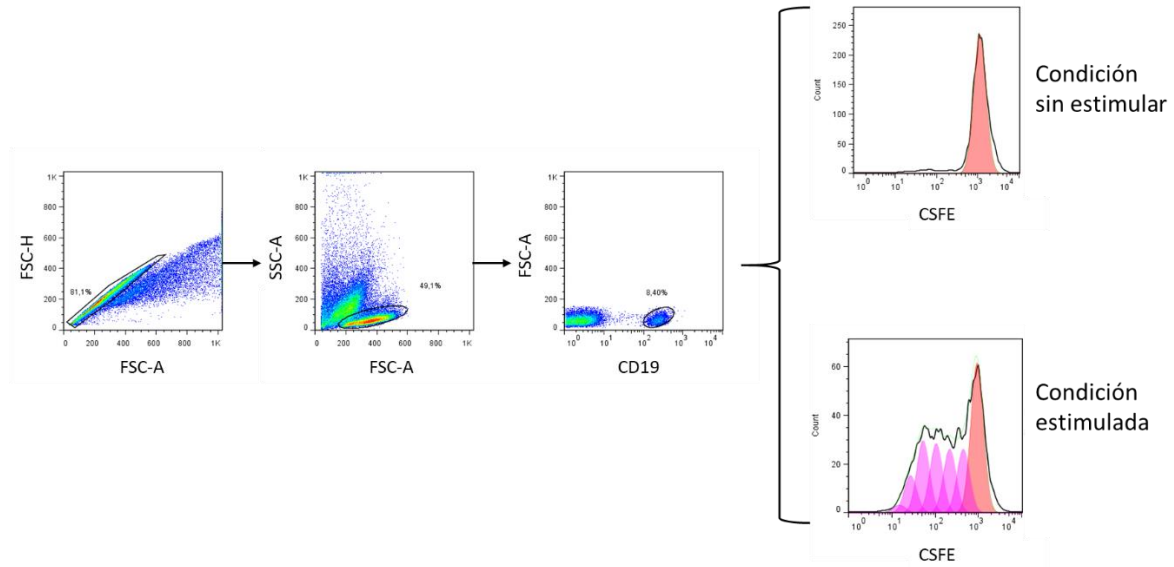


Figura 10. Estrategia de análisis para determinar el porcentaje de división de células B en cada condición.

- **Estandarización de la técnica de proliferación de células B**

En la figura 11 se muestra la estandarización de la técnica en la que se representan los resultados de un testigo sano, y se observan las generaciones de proliferación de las células B al ser estimuladas en cada una de las condiciones.

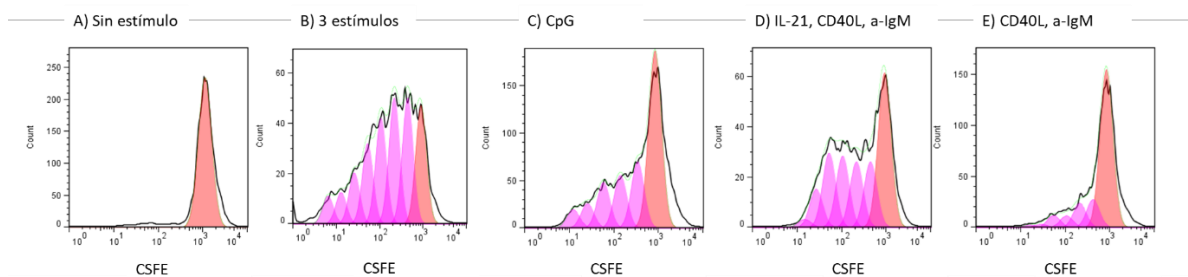


Figura 11. Resultados muestra de proliferación de un testigo sano. A) Condición sin estímulo, B) Condición con tres estímulos (PKW, Pansorbin y CpG), C) CpG, D) IL-21, CD40L y α -IgM, E) CD40L y α -IgM.

- **Resultados de proliferación de células B**

A continuación, se muestran los datos en porcentaje de división de células B, obtenidos en este trabajo, la tabla 5 corresponde a resultados de pacientes, mientras que en la tabla 6 se muestran los resultados de los testigos.

Tabla 5. Resultados del porcentaje de división de células B de los pacientes en las distintas condiciones de activación.

No. Paciente	División células B (%)			
	3 est (Pansorbin, PKW, CpG)	CpG	IL-21, a-IgM, CD40L	a-IgM, CD40L
5	21.30	39.20	33.50	45.90
6	8.50	6.33	31.30	5.51
7	26.60	4.85	1.26	2.39
8	41.20	20.90	10.30	1.92
11	20.50	18.90	64.10	29.00
16	34.70	8.83	19.80	6.61
22	34.40	20.60	38.50	5.00
23	10.10	22.00	5.21	0.57
29	53.80	25.80	11.40	1.11
30	42.50	53.90	62.20	35.90
31	30.10	17.90	31.20	29.50
32	37.30	18.30	31.00	12.20
33	29.00	6.84	74.10	69.50
34	3.42	3.90	55.50	4.87
35	9.02	47.00	56.40	7.23
36	17.50	40.70	20.70	6.09
37	70.90	37.70	49.80	39.60
38	5.87	72.30	54.90	13.90
39	44.20	29.00	11.50	1.97
40	31.80	28.80	26.20	43.80
41	23.60	13.70	20.10	6.78
42	23.10	7.63	18.00	24.20
43	33.90	12.90	9.56	18.90

Tabla 6. Resultados del porcentaje de división de células B de los testigos en las distintas condiciones de activación

No. Testigo	División células B (%)			
	3 est (Pansorbin, PKW, CpG)	CpG	IL-21, α-IgM, CD40L	α-IgM, CD40L
1	23.60	75.00	71.60	79.90
2	82.10	34.00	23.40	13.90
3	37.40	8.36	21.00	8.33
4	42.50	23.40	29.30	12.40
5	38.50	18.60	31.80	54.10
6	63.90	55.80	42.20	15.00
7	77.50	26.40	53.10	38.00
8	30.60	31.80	31.90	22.90
9	32.00	19.80	19.80	24.90
10	31.70	49.30	55.00	3.98
11	28.30	25.20	23.90	14.80
12	44.20	41.50	23.50	26.10
13	20.00	38.30	55.50	34.00
14	36.80	33.30	45.30	24.80
15	42.00	26.50	34.50	11.00

Tras obtener los resultados de los porcentajes de división de las células de 23 pacientes y 15 testigos, se realizó la comparación entre estos grupos se encontró los pacientes tienen una proliferación disminuida significativamente en las condiciones con tres estímulos y con CpG, tal como se muestra en la figura 12.

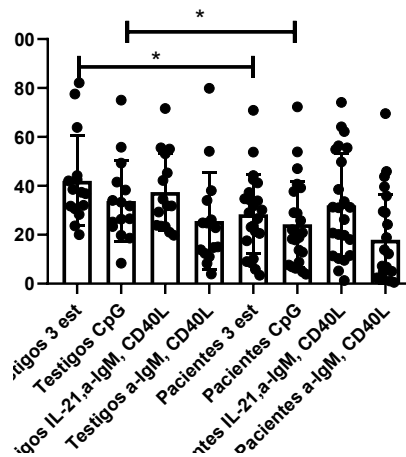


Figura 12. Comparación de la proliferación de células B entre pacientes y testigos. Estimulación con 3 estímulos ($p=0.0263$), activación con CpG ($p=0.0478$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

Posteriormente se clasificó a los pacientes de acuerdo a su porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo y se observó que las células B de los pacientes del grupo 1 tuvieron una menor proliferación que los testigos al activar las células con los tres estímulos, mientras que las células B de los pacientes del grupo 2 presentan menor proliferación que las células de los testigos al activar con CpG y con IL-21, CD40L y α -IgM tal como se observa en la figura 13.

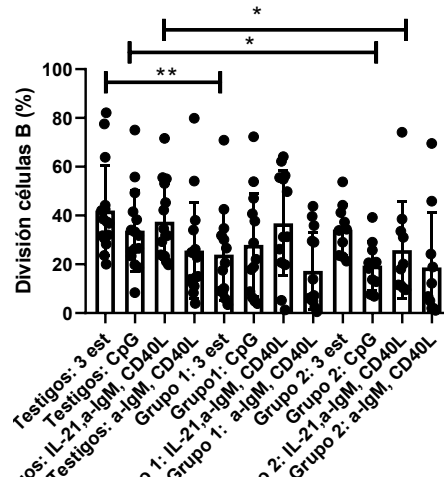


Figura 13. Comparación de la proliferación entre testigos y pacientes clasificados. Testigos vs grupo 1 activando con 3 estímulos ($p=0.0073$), testigos vs grupo 2 estimulando con CpG ($p=0.0163$), testigos vs grupo 2 activando con IL-21, CD40L y α -IgM ($p=0.0475$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

Tras realizar la comparación entre los grupos se decidió comparar la proliferación de las células B de cada grupo de estudio entre cada condición, encontrando que los testigos tienen una proliferación significativamente menor entre la condición con tres estímulos y activando con CD40L y α -IgM, así mismo existe una reducción de la proliferación al comparar las condiciones de IL-21, CD40L y α -IgM y la de CD40L y α -IgM solos (Figura 14A), este mismo patrón se observó entre las condiciones de IL-21, CD40L y α -IgM así como en la de CD40L y α -IgM de las células B del grupo 1 (Figura 14B), sin embargo, al analizar la proliferación de las células B del grupo 2 se observó que el porcentaje de división estaba disminuido en las condiciones con CpG, así como CD40L y α -IgM al compararlos con la condición con tres estímulos (Figura 14C).

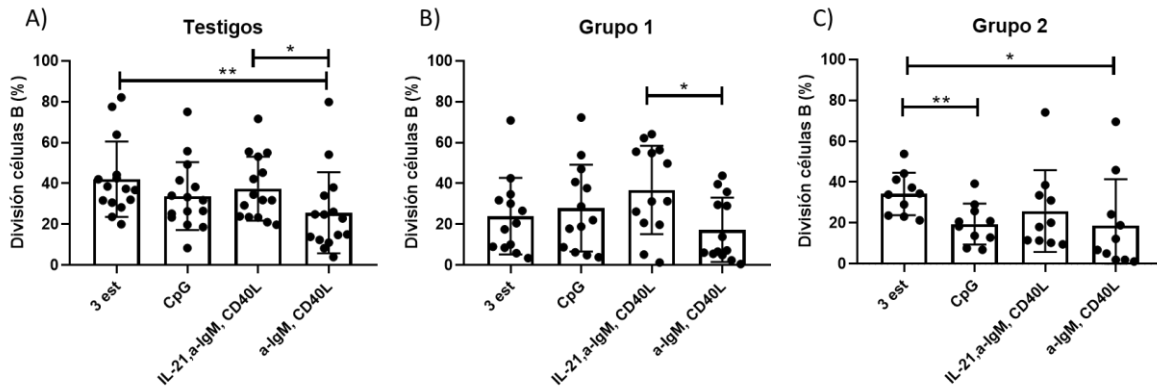


Figura 14. Comparación de la proliferación de las distintas condiciones en cada uno de los grupos de estudio. A) Resultados de testigos, 3 estímulos vs CD40L y α -IgM ($p=0.0057$); IL-21, CD40L y α -IgM vs CD40L y α -IgM ($p=0.0329$). B) Resultados de los pacientes del grupo 1, IL-21, CD40L y α -IgM vs CD40L y α -IgM ($p=0.0338$). C) Resultados de los pacientes del grupo 2, 3 estímulos vs CpG ($p=0.0042$); 3 estímulos vs CD40L y α -IgM ($p=0.0355$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

De acuerdo con los resultados anteriores correspondientes a la cohorte 1 se encontró que los pacientes tienen una disminución en la proliferación de sus células B en condiciones con tres estímulos y CpG, al clasificar a los pacientes por su porcentaje de células B se observó que las células B de los pacientes del grupo 1 presentan menor proliferación tras ser activadas con los tres estímulos, mientras que la disminución en los pacientes del grupo 2 se observó en las condiciones con CpG, así como con IL-21, CD40L y α -IgM, esto comparado con los resultados de los testigos. Al comparar la proliferación de las células B al activar con las distintas condiciones en cada uno de los grupos de estudio se observó que el grupo 1 presentó una disminuida proliferación al estimular con CD40L y α -IgM al compararla con la condición con IL-21, CD40L y α -IgM, por otro lado, los pacientes del grupo 2 presentaron proliferaciones de sus células B disminuidas en las condiciones con CpG, así como con CD40L y α -IgM en comparación con la condición con tres estímulos.

Posteriormente se realizó un análisis de frecuencias en el cual se querían identificar las características clínicas predominantes en esta cohorte de pacientes, para ello se clasificó a los pacientes de acuerdo al porcentaje de proliferación de lo cual se obtuvieron tres grupos, aquellos que tenían una proliferación normal (tomando como referencia la proliferación de los testigos), otro grupo que presentó una proliferación baja sin importar la condición de cultivo, y se encontraron 7

pacientes que tras comparar las condiciones de CD40L y α -IgM con y sin IL-21 se observó que no tenían ningún cambio, a estos los denominados el grupo que no proliferaron con IL-21, en este último grupo se observó que dichos pacientes presentaron mayor frecuencia en enfermedades autoinmunes respecto a los otros grupos, tal como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Frecuencias de manifestaciones clínicas de los pacientes con IDCv y su relación con la proliferación de células B tras la activación con IL-21

	Proliferación		
	No proliferaron con IL-21	Proliferación baja en todas las condiciones	Proliferación normal
No Pacientes	7	7	9
Sinusitis	42.9 %	85.7 %	77.8 %
Neumonía	28.6 %	57.1 %	55.6 %
Bronquiectasias	14.3 %	57.1 %	44.4 %
Esplenomegalia	14.3 %	28.6 %	22.2 %
Linfadenopatías	28.6 %	28.6 %	66.7 %
Enteropatías	42.9 %	42.9 %	55.6 %
Autoinmunidad	71.4 %	42.9 %	55.6 %
Granulomas	0.0 %	14.3 %	11.1 %
Cáncer	0.0 %	14.3 %	0.0 %

En negritas se indica la patología que se presentó mayor frecuencia.

3. Cohorte 2

Resultados de los pacientes a los cuales se les cuantificaron inmunoglobulinas procedentes sobrenadantes de cultivos celulares

- **Resultados clínicos de la cohorte 2**

Se analizó a la cohorte de 22 pacientes a los cuales se les realizó la determinación de inmunoglobulinas en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares a los que se les indujo diferenciación de células B con distintos mitógenos, para ello se trató de clasificar a los pacientes de acuerdo con el porcentaje de células B (Anexo 3), sin embargo, no se observaron diferencias entre estos grupos por lo que se procedió a clasificar a los pacientes de acuerdo a su gravedad clínica tomando como referencia la media del score de gravedad (7.5) de esta cohorte y es lo que se muestra a continuación.

Se obtuvieron los resultados de 22 pacientes, con una media de edad de 29.9 años, los cuales presentan neumonía (77.3%) y sinusitis (63.6%) principalmente, al clasificar a los pacientes de acuerdo con la gravedad clínica como era de esperarse se encontraron diferencias significativas en distintos padecimientos como neumonía, sinusitis, esplenomegalia, linfadenopatías, granulomas y cáncer, los cuales son más frecuentes en pacientes con un score de gravedad alto. Al agrupar a los pacientes por su score de gravedad era lógico que se encontraría diferencia significativa entre los grupos de pacientes como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con IDCV a los que se les han cuantificado inmunoglobulinas in vitro, así como su clasificación por score de gravedad y la comparación de los grupos

	Pacientes IDCV	IDCV pacientes score bajo	IDCV pacientes score alto	IDCV score bajo vs IDCV score alto
		Score <7.5	Score >7.5	p- value
Numero de pacientes	22	14	8	
Sexo (femenino/masculino)	15/7	10/4	5/3	
Edad (media±SD)	29.9±5.1	31.8±17.1	26.5±8.5	
Manifestaciones clínicas (número de casos (%))				
Neumonía	17 (77.3)	9 (64.3)	8 (100.0)	<0.0001
Sinusitis	14 (63.6)	7 (50.0)	7 (87.5)	<0.0001
Bronquiectasias	7 (31.8)	4 (28.6)	3 (37.5)	0.2306
Esplenomegalia	8 (36.4)	3 (21.4)	5 (62.5)	<0.0001
Linfadenopatías	12 (54.5)	5 (35.7)	7 (87.5)	<0.0001
Granulomas	4 (18.2)	0 (0.0)	4 (50.0)	<0.0001
Enteropatías	7 (31.8)	5 (35.7)	2 (25.0)	0.1242
Enfermedades autoinmunes	10 (45.5)	6 (42.9)	4 (50.0)	0.3950
Cáncer (tumores sólidos)	2 (9.1)	0 (0.0)	2 (25.0)	<0.0001
Score de gravedad (media±SD)	7.5±5.1	4.4±1.6	12.8±4.7	<0.0001
Niveles de inmunoglobulinas mg/dL (media±SD)				
IgG (rango de referencia 639-1349 mg/dL)	230.9±141.6	235.8±145.2	221.2±144.8	0.5143
IgA (rango de referencia 70-312 mg/dL)	27.8±77.6	37.3±91.7	4.9±6.1	0.8792
IgM (rango de referencia 56-352 mg/dL)	38.5±83.8	46.4±104.1	24.6±6	0.7768

En negritas se indican aquellos valores que fueron estadísticamente significativos, los padecimientos se compararon mediante la prueba F de Fisher, los valores de inmunoglobulinas se compararon mediante la prueba U de Mann Whitney; significancia $p < 0.05$

• Resultados fenotípicos de la cohorte 2

Al comparar las poblaciones leucocitarias en estos grupos de pacientes se observó un porcentaje aumentado de las células B CD21^{bajo} (Figura 15A) y de las células B dobles negativas (Figura 15B).

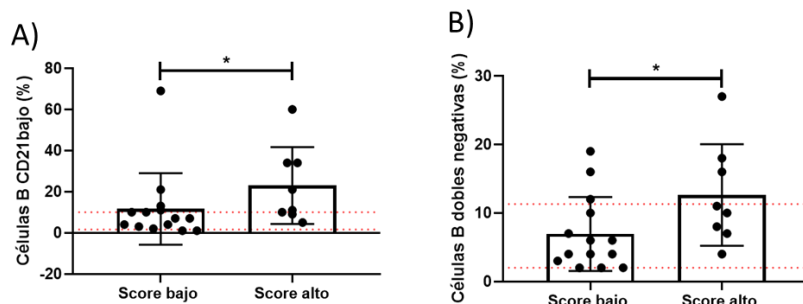


Figura 15. Comparación de poblaciones y subpoblaciones leucocitarias entre los grupos con score bajo y alto A) Células B CD21^{bajo} ($p=0.0470$). B) Células B dobles negativas ($p=0.0394$). Con líneas punteada se indican los valores de referencia. Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

- **Estandarización de la técnica de ELISA**

En la figura 16 se muestra el resultado de la estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA respectivamente, se observan las curvas de referencia, las cuales se encuentran dentro de los parámetros lo que permite garantizar la reproducibilidad del ensayo, así como la confiabilidad de los resultados que se obtuvieron, para aceptar una curva de referencia se realizaba por duplicado y se tomaron como criterios que el blanco tuviera una absorbancia menor a 0.1 y que el porcentaje del coeficiente de variación fuera menor a 15. Las concentraciones de la curva fueron las que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de inmunoglobulinas de las curvas de referencia

IgG	IgM	IgA
1 → 0.03 ng/mL	1 → 15.6 ng/mL	1 → 1.03 ng/mL
2 → 0.30 ng/mL	2 → 31.2 ng/mL	2 → 3.10 ng/mL
3 → 3.00 ng/mL	3 → 62.5 ng/mL	3 → 9.26 ng/mL
4 → 30.00 ng/mL	4 → 125.0 ng/mL	4 → 27.70 ng/mL
5 → 300.00 ng/mL	5 → 250.0 ng/mL	5 → 83.30 ng/mL
6 → 3000.00 ng/mL	6 → 500.0 ng/mL	6 → 250.00 ng/mL
7 → 30000.00 ng/mL	7 → 1000.0 ng/mL	7 → 750.00 ng/mL

Para facilitar la visualización de las desviaciones estándar se identificó a cada concentración con un número, el cual corresponde a los valores mostrados en la tabla 9.

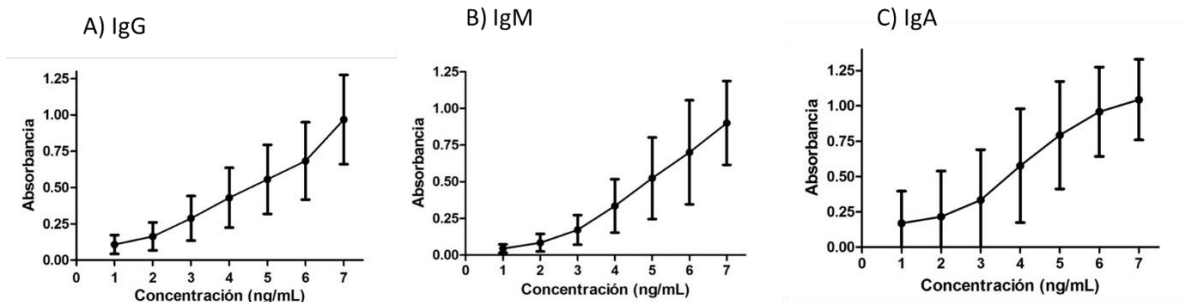


Figura 16. Estandarización de la técnica de ELISA. A) Resultados de IgG. B) Resultados de IgM. C) Resultados de IgA

- **Resultados de la cuantificación de inmunoglobulinas**

A continuación, se muestran los datos de concentraciones de inmunoglobulinas de tipo IgG, IgA e IgM, en las distintas condiciones de activación los cuales fueron obtenidos en este trabajo, la tabla 10 corresponde a resultados de pacientes, mientras que en la tabla 11 se muestran los resultados de los testigos.

Tabla 10. Cuantificación de inmunoglobulinas. Resultados de pacientes

No. Paciente	IgG (ng/mL)				IgM (ng/mL)				IgA (ng/mL)			
	S/E	CpG	3 est	IL-21	S/E	CpG	3 est	IL-21	S/E	CpG	3 est	IL-21
1	1785.03	1308.13	9540.42	8243.09	5774.04	7435.15	5013.54	6912.47	23.77	26.68	32.65	4045.95
4	136.17	301.85	130.00	211.54								
5	1534.21	4091.79	95.70	534.64	345.52	816.40	298.21	433.20				
6	303.86	64.36	424.48	161.44	194.91	197.92	348.79	237.31	419.71	748.17	468.53	453.56
10	221.31	2499.35	137.46	1171.70	318.65	531.63	234.68	303.41				
11					377.86	478.69	397.94	465.91				
12	294.72	618.99	191.59	259281.84	495.89	660.77	585.37	997.25	422.88	416.57	417.62	544.20
13					2461.41	2455.90	2551.40	2417.62				
16					1943.56	1573.80	1443.14	6091.92				
18	34.79	359.26	7.91	46.43	201.69	389.60	281.18	220.33				
19	964.30	6838.19	28533.95	15067.90	476.90	608.88	643.88	354.77				
22					203.50	308.60	540.39	223.88				
24	7538.07	8329.47	39799.73	94545.85	2219.80	2172.57	2143.56	2399.77	18242.90	13671.51	3149.11	33956.41
25					1965.11	3085.06	1415.57	-	5283.93	51100.32	700.80	-
26	2996.54	4117.53	-	7611.51								
27					355.84	373.43	349.61	329.24				
28					431.57	431.85	710.16	888.10				
29	3458.05	3611.04	226.15	11875.43	671.55	796.66	400.24	590.05				
30	1674.64	1886.35	119.42	122.03	190.15	232.19	195.60	194.74				
31	0.01	296.41	69.51	254.74								
32					201.97	333.18	276.83	300.19				
33	2526.54	4247.51	216.57	108.34	285.30	407.34	300.38	228.71				

Tabla 11. Cuantificación de inmunoglobulinas. Resultados de testigos

No Testigo	IgG (ng/mL)				IgM (ng/mL)				IgA (ng/mL)			
	S/E	CpG	3 est	IL-21	S/E	CpG	3 est	IL-21	S/E	CpG	3 est	IL-21
1	3.70	238.50	29.07	228.14	1286.41	3410.30	2056.70	6989.02	4016.86	127752.75	22940.99	370298.83
2	5540.84	36622.60	36928.55	3685.82	2708.35	3800.18	2518.74	2336.12	14775.60	174111.00	25636.38	84964.83
3	214.84	341.57	695.44	225.04	2444.90	2816.19	2753.70	2369.28	5593.82	8595.34	9909.49	5255.42
4					1428.52	1464.77	2268.36	-	6305.60	26790.51	8146.36	-
5	649.93	18911.64	12456.74	-								
6	869.53	1818.58	-	1320.05								
7	206.66	1385.71	-	313.73								
8	52.07	81.61	250.90	-								
9	566.89	4877.72	246.07	445.23	351.94	676.47	290.85	337.44	1523.70	4033.09	1668.71	1477.13
10					1582.96	1546.17	1399.14	2091.51	6932.84	6471.81	3987.24	20785.88
11					776.29	899.22	1829.21	1993.10	4854.18	9683.62	4842.26	4854.18
12	14120.55	15067.90	6548.48	140050.58	1792.30	2199.54	1465.05	2124.86				
13	18912.80	498.31	22006.86	68.03	631.47	77.07	96.01	742.08				
14	3895.23	531.75	996.12	10657.31	1407.33	738.82	472.43	548.59				

Tras la activación de las PBMCs de 23 pacientes y 14 testigos, se realizó la cuantificación de inmunoglobulinas en sobrenadantes mediante la técnica de ELISA (tamaño de muestra IgG 11 testigos y 14 pacientes; IgM 9 testigos y 19 pacientes; IgA 7 testigos y 5 pacientes), como se observa en la figura 17 al comparar la producción de las distintas inmunoglobulinas entre testigos y pacientes sin importar la condición de cultivo, es evidente que las células de los pacientes tienen una menor producción de inmunoglobulinas en comparación con los testigos.

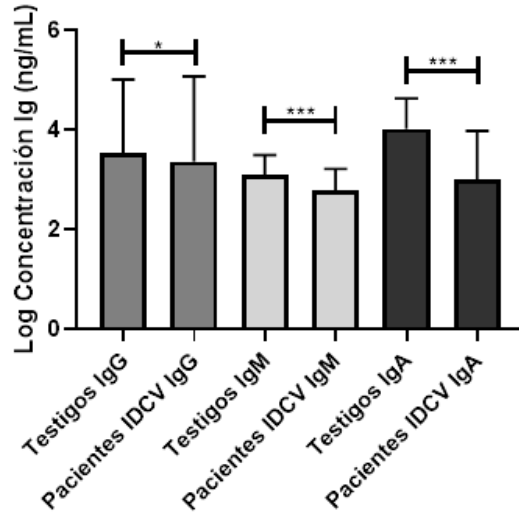


Figura 17. Resultados de la cuantificación de anticuerpos. Comparación de las concentraciones de inmunoglobulinas entre pacientes y testigos. IgG ($p=0.0267$), IgM ($p=0.0001$), IgA ($p=0.0004$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

Tras comparar la producción de inmunoglobulinas producidas *in vitro* con las inmunoglobulinas en suero al momento del diagnóstico de los pacientes, se observó que la producción *in vitro* es significativamente menor en todas las condiciones de cultivo en cada una de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA tal como se muestra en la figura 18.

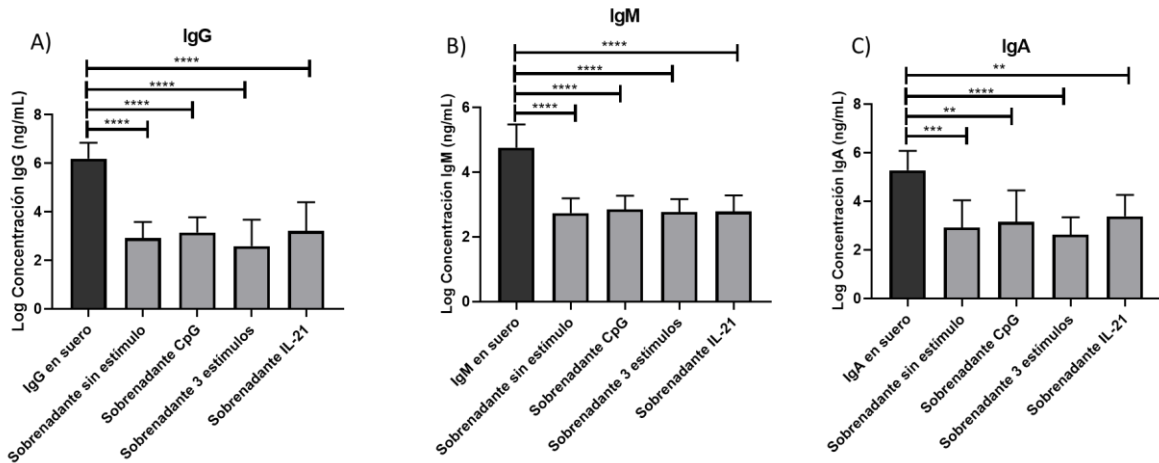


Figura 18. Inmunoglobulinas en suero vs inmunoglobulinas *in vitro*. Comparación de las concentraciones de inmunoglobulinas en suero al momento del diagnóstico e inmunoglobulinas tras la activación *in vitro* de las células. A) IgG (**** $p < 0.0001$) B) IgM (**** $p < 0.0001$) C) IgA (** IL-21 $p=0.0029$, CpG $p=0.0055$; *** sin estímulo $p=0.0007$; **** 3 estímulos $p < 0.0001$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

Al adentrarnos al análisis de las condiciones de cultivo específicas se encontraron diferencias en la producción de IgG (Fig 19A) entre pacientes y testigos en condiciones con tres estímulos, al igual que con IgA (Fig 19C), mientras que las diferencias en IgM (Fig 19B) se encuentran en las condiciones sin estímulo y con IL-21.

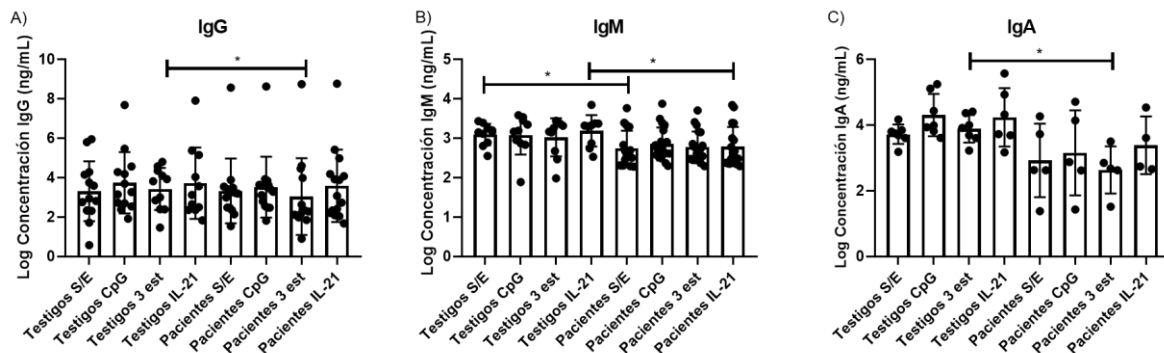


Figura 19. Resultados de la cuantificación de anticuerpos. Comparación de las concentraciones de inmunoglobulinas entre pacientes y testigos en las distintas condiciones. A) IgG ($p=0.0197$). B) IgM (S/E $p=0.0470$, IL-21 $p=0.0470$). C) IgA ($p=0.0203$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

Tras clasificar a los pacientes de acuerdo a su gravedad clínica (tamaño de muestra IgG 11 testigos, 11 pacientes con score bajo y 3 pacientes con score alto; IgM 9 testigos, 14 pacientes score bajo y 5 pacientes con score alto), se observó que en la producción de IgG no existe diferencia entre estos grupos, sin embargo, se encontraron diferencias en la producción de IgM en condiciones sin estímulo y con IL-21 entre el grupo de testigos y de pacientes con score bajo, observándose una disminución marcada de dicha inmunoglobulina en los pacientes con menor gravedad clínica (Figura 20), debido al pequeño número de pacientes al cual se le determinó la producción de IgA no se pudo realizar la clasificación de estos.

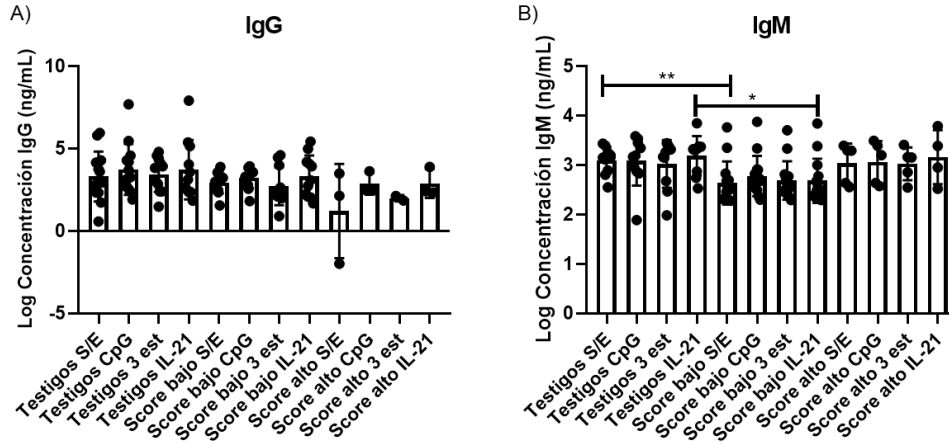


Figura 20. Resultados de la cuantificación de anticuerpos. Comparación de las concentraciones de inmunoglobulinas entre pacientes clasificados por score y testigos en las distintas condiciones. A) IgG. B) IgM (S/E $p=0.0069$, IL-21 $p=0.0128$). Prueba U Mann Whitney $p < 0.05$.

De acuerdo con los resultados de la cohorte 3 se encontró una disminución de la producción de inmunoglobulinas por parte de los pacientes sin importar el estímulo, específicamente se vio una marcada disminución en las muestras de pacientes en la producción de IgG e IgA tras la activación con 3 estímulos, en cuanto a IgM la disminución marcada se observó en condiciones sin estímulo y con IL-21. Tras clasificar a los pacientes de acuerdo con su gravedad clínica se observó que las disminuciones de la producción de IgM fueron dadas por los pacientes con un score bajo.

Posteriormente se realizó un análisis de frecuencias clínicas para cada inmunoglobulina en el cual se agrupó a los pacientes de acuerdo a la concentración de inmunoglobulinas (tomando como referencia a los testigos) y se obtuvieron 3 grupo los que tenían una producción normal, baja o alta, cabe destacar que la única condición clínica que se vio presente en todos los grupos de baja producción sin importar la inmunoglobulina, fueron las enteropatías tal como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Frecuencias de manifestaciones clínicas de los pacientes con IDCV y su relación con la concentración de anticuerpos tras la activación con IL-21.

	IgG			IgM			IgA		
	Alto	Bajo	Normal	Alto	Bajo	Normal	Alto	Bajo	Normal
No Pacientes	6	5	3	4	12	2	0	3	1
Sinusitis	50.0 %	40.0 %	66.7 %	50.0 %	58.3 %	100.0 %	-	66.7 %	0.0 %
Neumonía	83.3 %	80.0 %	33.3 %	100.0 %	58.3 %	100.0 %	-	100.0 %	100.0 %
Bronquiectasias	50.0 %	0.0 %	0.0 %	50.0 %	33.3 %	0.0 %	-	33.3 %	0.0 %
Esplenomegalia	50.0 %	0.0 %	66.7 %	50.0 %	16.7 %	100.0 %	-	33.3 %	100.0 %
Linfadenopatías	33.3 %	20.0 %	66.7 %	25.0 %	50.0 %	50.0 %	-	0.0 %	0.0 %
Enteropatías	16.7 %	40.0 %	0.0 %	50.0 %	41.7 %	0.0 %	-	33.3 %	0.0 %
Autoinmunidad	33.3 %	60.0 %	66.7 %	25.0 %	41.7 %	100.0 %	-	66.7 %	0.0 %
Granulomas	16.7 %	0.0 %	0.0 %	25.0 %	8.3 %	0.0 %	-	0.0 %	0.0 %
Cáncer	16.7 %	0.0 %	0.0 %	25.0 %	0.0 %	0.0 %	-	0.0 %	0.0 %

En negritas se indica la patología que presentó mayor frecuencia.

4. Cohorte 3

Determinación de la fosforilación de la proteína STAT3 en células B

- **Resultados clínicos de la cohorte 3**

Se trabajó con 23 pacientes, con una media de edad de 27.9 años, los cuales principalmente presentan neumonía (74%) y sinusitis (61%), estos pacientes fueron clasificados en dos grupos de acuerdo con el porcentaje de células B de memoria como se describió anteriormente, el resumen de las características clínicas de esta cohorte se muestra en la tabla 8, al comparar a estos grupos de pacientes observamos algunas diferencias clínicas, un mayor número de pacientes del grupo 1 presentan más esplenomegalia, granulomas, autoinmunidad y cáncer, mientras que los pacientes del grupo 2 presentan más neumonías, si bien al comparar el score de gravedad no existe diferencia significativa se observa que los pacientes del grupo 1 tienen una media mayor respecto al grupo 2, tal como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes con IDCV a los que se les ha determinado la fosforilación de STAT3, así como su clasificación por el porcentaje de células B de memoria y la comparación de los grupos.

	Pacientes IDCV	IDCV pacientes grupo 1 Células B de memoria <0.4%	IDCV pacientes grupo 2 Células B de memoria >0.4%	IDCV grupo 1 vs IDCV grupo 2 <i>p</i> - value
Número de pacientes	23	15	8	
Sexo (femenino/masculino)	15/8	9/6	6/2	
Edad (media±SD)	27.9±16.7	26.5±16.5	30.1±17.9	
Manifestaciones clínicas (número de casos (%))				
Neumonía	17 (73.9)	9 (60.0)	6 (75.0)	0.0341
Sinusitis	14 (60.9)	9 (60.0)	5 (62.5)	0.1722
Bronquiectasias	6 (26.1)	4 (26.7)	2 (25.0)	0.8720
Esplenomegalia	5 (21.7)	4 (26.7)	1 (12.5)	0.0208
Linfadenopatías	7 (30.4)	5 (33.3)	2 (25.0)	0.2753
Granulomas	2 (8.7)	2 (13.3)	0 (0.0)	0.0002
Enteropatías	12 (52.2)	8 (53.3)	4 (50.0)	0.7773
Enfermedades autoinmunes	6 (26.1)	6 (40.0)	0 (0.0)	<0.0001
Cáncer (tumores sólidos)	2 (8.7)	2 (13.3)	0 (0.0)	<0.0001
Score de gravedad (media±SD)	5.6±4.0	6.4±4.6	4.3±2.3	0.1760
Niveles de inmunoglobulinas mg/dL (media±SD)				
IgG (rango de referencia 639-1349 mg/dL)	264.5±156.4	301.9±171.6	244.4±143.4	0.4334
IgA (rango de referencia 70-312 mg/dL)	29.2±66.2	32.0±59.4	19.7±33.6	0.5341
IgM (rango de referencia 56-352 mg/dL)	61.7±118.9	71.2±142.1	101.0±132.7	0.3219

En negritas se indican aquellos valores que fueron estadísticamente significativos, los padecimientos se compararon mediante la prueba F de Fisher, los valores de inmunoglobulinas se compararon mediante la prueba U de Mann Whitney; significancia $p < 0.05$

- **Resultados fenotípicos de la cohorte 3**

Al comparar las poblaciones y subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica entre estos grupos de pacientes, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje y números absolutos de las células B (CD19+) las cuales están disminuidas en el grupo 1 (Figura 21A y 21B), además este mismo grupo tiene aumentado el porcentaje de células B naive (Figura 21C), y como era de esperarse una disminución en las células B de memoria con y sin cambio de isotipo, ya que este fue el criterio de clasificación (Figuras 21D y 21E).

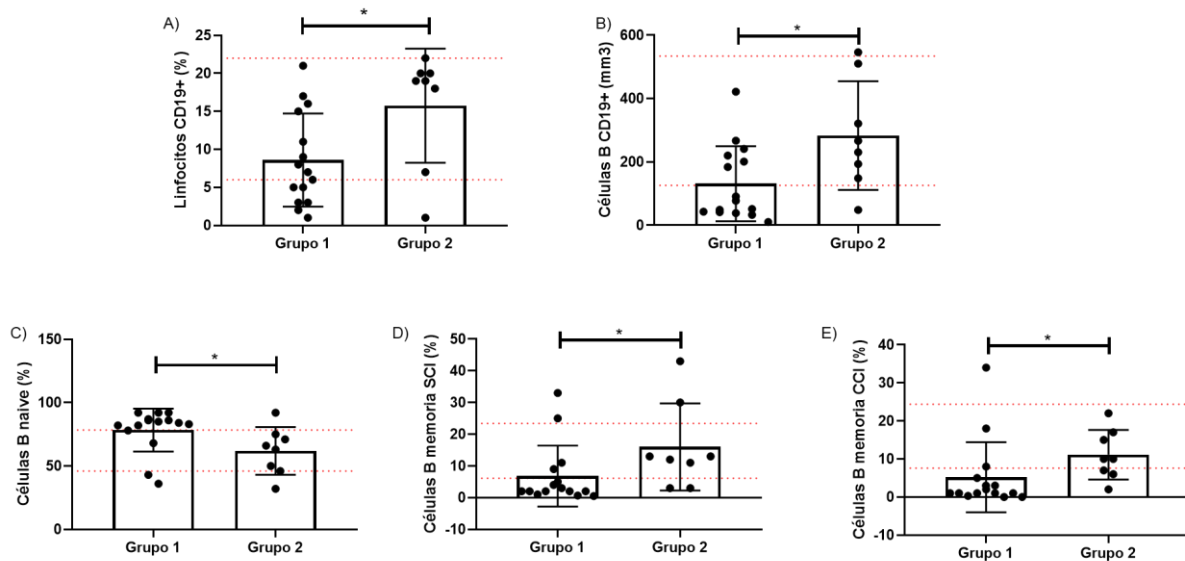


Figura 21. Comparación de poblaciones y subpoblaciones leucocitarias entre el grupo 1 y 2. A) Porcentajes de células B CD19+ ($p=0.0321$) B) Números absolutos de células B CD19+ ($p=0.0337$). C) Porcentajes de células B naive ($p=0.0347$). D) Porcentajes de células B memoria sin cambio de isotipo ($p=0.0130$). E) Porcentajes de células B de memoria con cambio de isotipo ($p=0.0106$). Con líneas punteadas se indican los valores de referencia. Prueba t-student $p < 0.05$.

- **Estrategia de análisis de la determinación de la fosforilación de STAT3**

El análisis para la determinación de la fosforilación de STAT3 se muestra en la figura 22, se comienza con una gráfica de CD19 y SSC, se selecciona la región de células B (CD19+), marcada como R1, a partir de ésta se obtienen los histogramas de pSTAT3, de los cuales se comparan las condiciones de 15 y 60 minutos contra la condición sin estímulo (S/E), estos resultados corresponden a la fosforilación de STAT3 en células B totales.

Por otro lado, partiendo de la región R1 se analiza CD19 y CD27, lo cual nos permite identificar dos poblaciones la R2 y R3, las cuales corresponden a las células B de memoria (CD19+ CD27+) y células B naive (CD19+ CD27-) respectivamente, a partir de dichas regiones se realiza el análisis de histogramas tal como se detalló anteriormente, el histograma rojo en todos los casos corresponde a la condición sin estimular mientras que el histograma azul representa la condición estimulada. La fosforilación de STAT3 fue medida en intensidad media de fluorescencia (IMF).

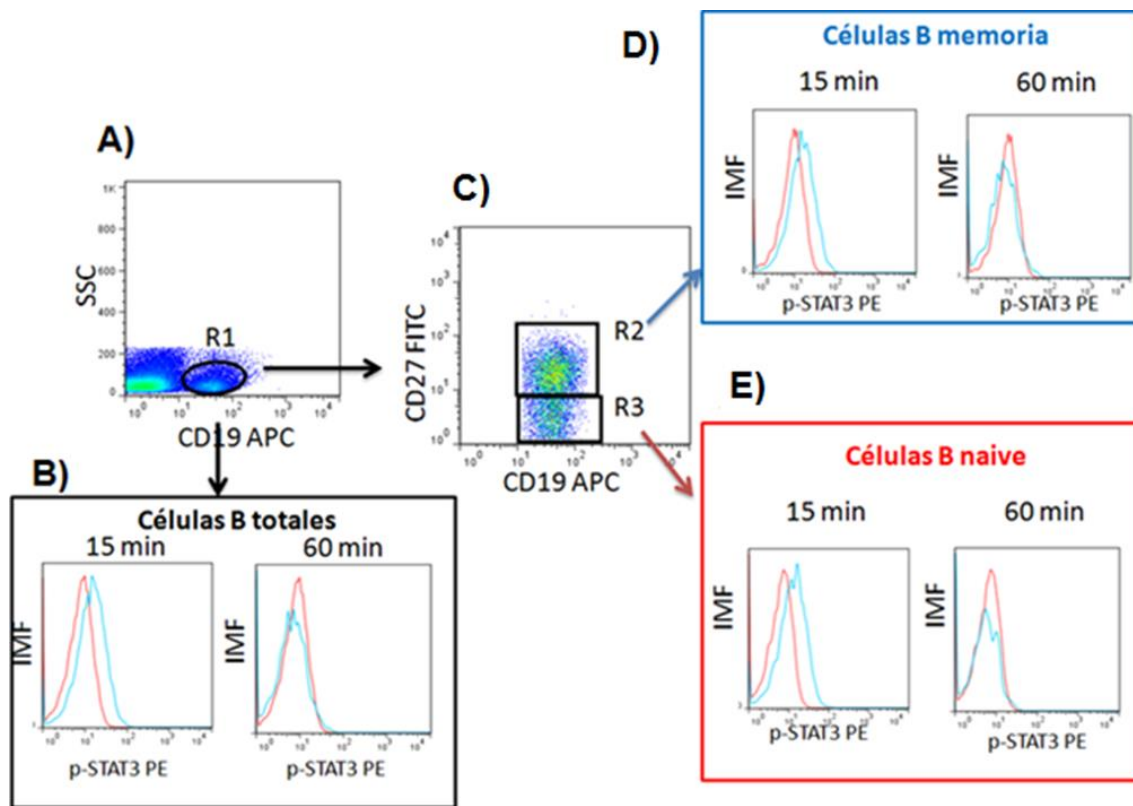


Figura 22. Análisis de la fosforilación de STAT3. Se muestra a detalle el análisis que se realiza para determinar p-STAT3 en células B totales (B), células B de memoria (D) y células B naive (E), así como las poblaciones de las cuales se parte para tener los resultados (A, C). Se realiza la tinción con antiCD19 APC, antiCD27 FITC y anti pSTAT3 PE. La curva roja determina la condición sin estímulo, mientras que la curva azul determina la condición estimulada con rIL-21.

- **Estandarización de la determinación de la fosforilación de STAT3**

Posteriormente se realizó la determinación de la fosforilación de la proteína STAT3, en la figura 23 se muestran los resultados de un testigo sano para determinar la fosforilación de la proteína STAT3 en células B totales (A), naive (B) y de memoria (C). En los tres casos se observa que tras 15 minutos de activación

con IL-21r la proteína STAT3 se encuentra fosforilada (histograma azul), además se observa que transcurridos los 60 minutos tras la activación la proteína STAT3 ya se encuentra desfosforilada (histograma verde), esto con respecto a la condición sin estímulo (histograma rojo).

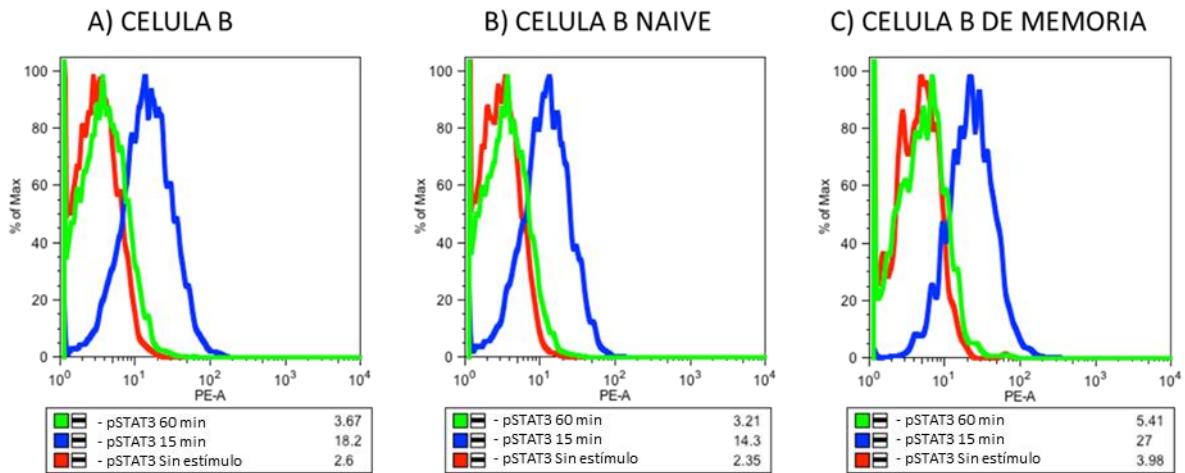


Figura 23. Fosforilación de la proteína STAT3. Se muestran los resultados de la estandarización de la técnica, con la muestra de un testigo sano.

- **Resultados de la determinación de la fosforilación de STAT3**

A continuación, se muestran los datos en IMF de pSTAT3 de células B totales, naive y de memoria obtenidos en este trabajo, la tabla 14 corresponde a resultados de pacientes, mientras que en la tabla 15 se muestran los resultados de los testigos.

Tabla 14. Resultados de IMF de pSTAT3 de las muestras de los pacientes

No. Paciente	Célula B total			Célula B naive			Célula B de memoria		
	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min
1	3.42	2.19	6.32	3.07	2.71	4.10	3.97	3.43	9.79
2	4.33	6.47	5.02	4.16	6.40	4.97	5.26	6.61	5.94
3	4.72	14.50	2.97	4.72	14.50	2.97			
4	6.00	7.00	12.00	5.00	6.00	9.00	8.00	6.00	20.00
5	3.82	5.11	3.93	3.77	4.92	3.67	5.67	6.26	4.84
6	2.21	2.36	3.39	2.21	2.36	3.39			
7	2.80	2.17	2.10	2.80	2.17	2.10			
8	2.18	3.86	2.76	2.18	3.70	2.60	2.18	5.99	3.50
9	9.06	9.99	12.60	9.06	9.99	12.60			
10	5.23	10.20	10.70	4.80	4.92	4.54	5.93	6.91	27.60
11	13.50	18.90	9.35	12.40	18.80	7.15	14.70	20.40	12.40
12	12.20	11.30	9.95	11.90	13.10	9.02	15.70	16.80	15.20
13	3.54	5.59	3.32	2.63	4.92	2.79	3.15	7.12	5.54
14	1.39	1.71	1.70	1.37	1.67	1.45	1.72	1.99	4.76
15	2.36	3.69	8.20	2.29	3.27	5.45	3.73	5.56	18.90
16	2.22	2.46	19.70	2.22	2.41	17.10	2.15	3.30	31.40
17	11.60	23.00	17.60	10.40	22.40	16.30	13.00	23.70	17.60
18	10.20	9.40	7.00	9.29	8.90	5.70	15.00	11.00	10.00
19	3.66	2.00	10.20	3.50	2.00	9.00	3.70	1.96	12.60
20	67.90	157.00	103.00	63.80	126.00	88.10	84.90	225.00	134.00
21	5.16	7.75	9.00	5.24	7.50	7.76	6.18	13.10	12.40
22	2.72	2.63	16.90	2.80	2.62	10.70	2.32	2.37	15.80
23	2.58	2.48	16.60	2.42	2.11	16.40	3.65	3.21	17.30

Tabla 15. Resultados de IMF de pSTAT3 de las muestras de los testigos

No. Testigo	Célula B total			Célula B naive			Célula B de memoria		
	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min	S/E	15 min	60 min
1	2.60	18.20	3.67	2.35	14.30	3.21	3.98	27.00	5.40
2	1.80	4.85							
3	5.63	7.32	5.73	5.40	5.62	5.33	7.65	10.40	8.12
4	3.41	9.97	6.00	4.32	9.97	6.54	4.18	9.07	4.07
5	5.45	11.40	2.75	5.15	10.70	2.59	4.33	10.90	4.03
6	1.28	2.08	1.32	1.24	1.44	1.26	1.49	2.21	1.44
7	1.39	2.65	1.43	1.50	2.37	1.58	1.85	5.06	1.98
8	12.80	19.70	15.90						
9	17.30	28.80	9.92						
10	2.58	6.21		1.91	4.30		3.93	9.79	
11	2.20	4.25	2.07	2.07	3.66	2.03	2.79	4.26	2.32
12	7.64	19.60	7.13	6.26	15.80	5.82	8.58	21.50	8.15
13	2.35	4.94	2.56	2.60	4.78	2.94			
14	17.60	36.50		15.70	33.30		23.90	48.00	

A partir de los resultados de la fosforilación de STAT3 de los 23 pacientes y 14 testigos se obtuvo lo siguiente, en la figura 24 se muestran los resultados de la fosforilación de STAT3 en células B totales (Figura 24A), naive (Figura 24B) y de memoria (Fig 24C) tanto de testigos como de pacientes, en todos los casos se observa una diferencia entre ambos grupos de personas a los 60 minutos, los pacientes muestran una mayor fosforilación de la proteína que los testigos a dicho tiempo. Este fenómeno es más evidente en las células B de memoria que en las células B naive.

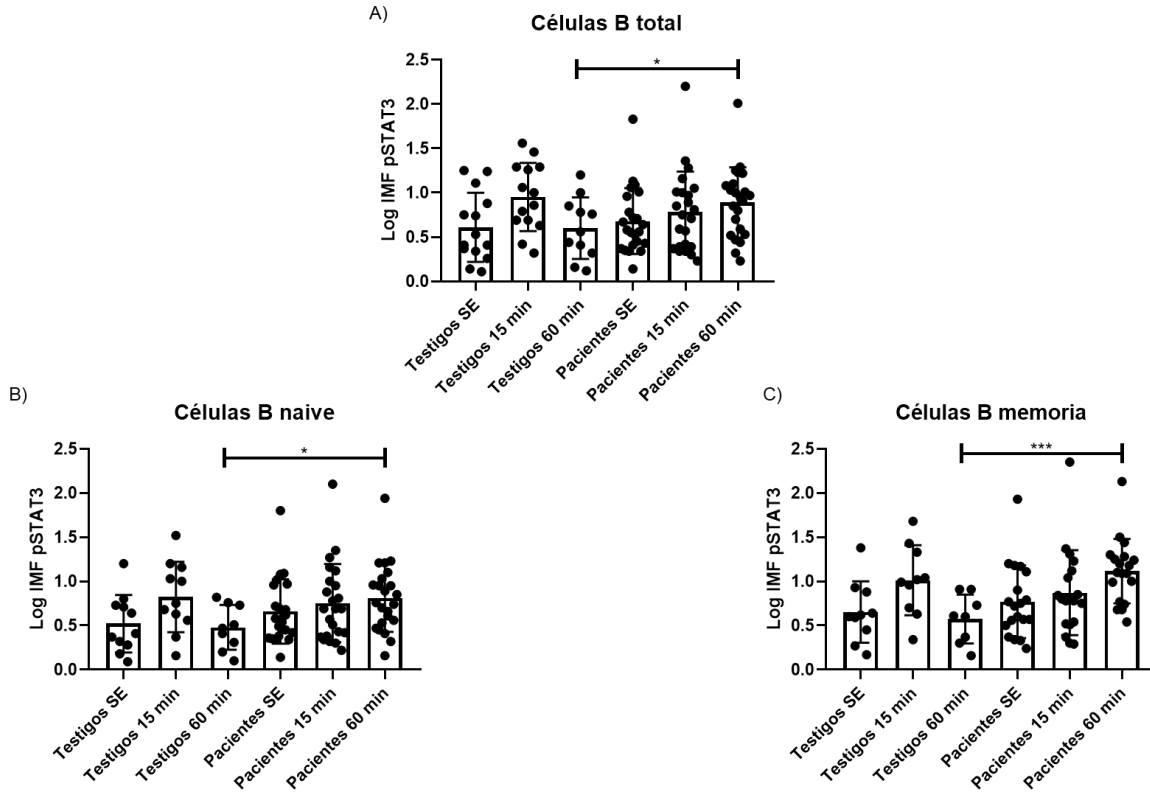


Figura 24 Resultados de la fosforilación de STAT3. Se muestra la comparación de la IMF entre pacientes y testigos en las diferentes condiciones y tiempos. A) Células B totales ($p=0.0440$). B) Células B naive ($p=0.0230$). C) Células B de memoria ($p=0.0010$). Prueba t-student $p < 0.05$.

Posteriormente clasificamos a los pacientes en los dos diferentes grupos, esto se realizó para cada tiempo y encontramos diferencia en la fosforilación a los 60 minutos en las células B de memoria, siendo más marcado el aumento en los pacientes del grupo 1 (Figura 25).

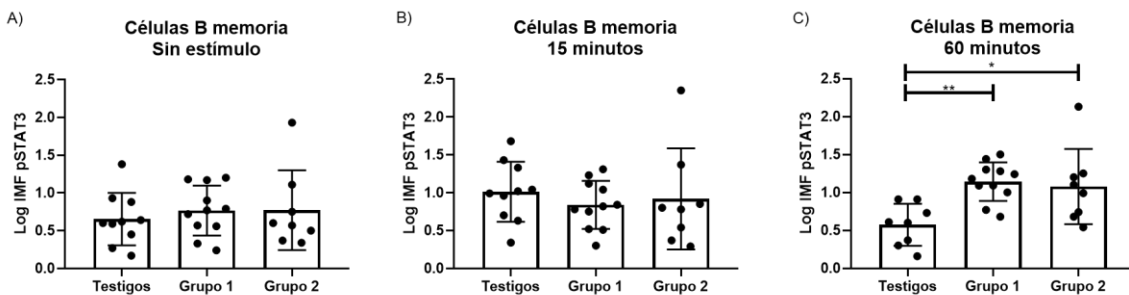


Figura 25. Resultados de la fosforilación de STAT3 en células B de memoria. Se muestra la comparación de la IMF entre pacientes de los distintos grupos y testigos a los diferentes tiempos. A) Sin estímulo. B) 15 minutos. C) 60 minutos ($p=0.0070$ y $p=0.0260$). Prueba ANOVA $p < 0.05$.

El resultado anterior indujo a analizar la fosforilación de STAT3 en las células B de memoria dentro de cada grupo a los distintos tiempos, y encontramos que en el grupo de testigos la fosforilación de STAT3 disminuye significativamente a los 60 minutos al compararse con el punto máximo de fosforilación, mientras que en los pacientes del grupo 1 se encuentra aumentada significativamente respecto al nivel basal (dicho comportamiento no se encontró en las células B totales, ni en las naive) (Figura 26).

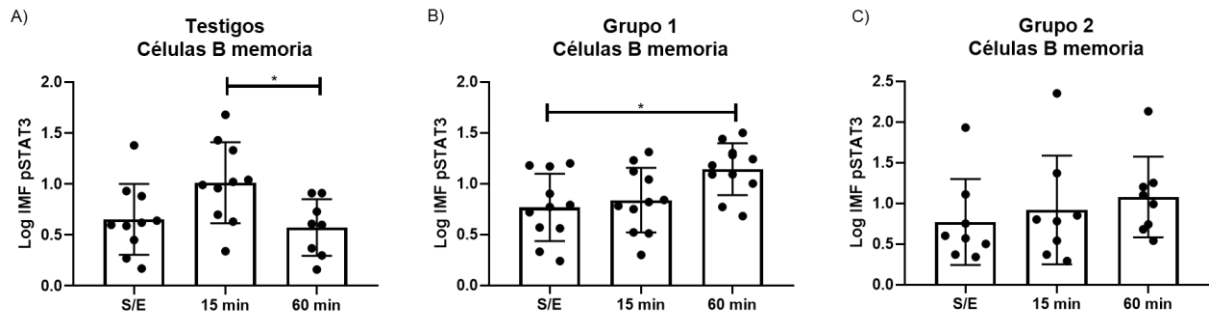


Figura 26. Resultados de la fosforilación de STAT3 en células B de memoria. Se muestra la comparación de la IMF entre los distintos tiempos en cada grupo de pacientes, así como en los testigos. A) Testigos ($p=0.0450$). B) Grupo 1 ($p=0.0230$). C) Grupo 2. Prueba ANOVA $p < 0.05$.

Posteriormente se buscó si existía alguna correlación entre la fosforilación de la proteína STAT3 y la gravedad clínica, y se encontró que en los pacientes del grupo 1 el aumento en la fosforilación de STAT3 a los 60 minutos en células B totales, naive y de memoria estaba relacionado con un score más alto (Figura 27).

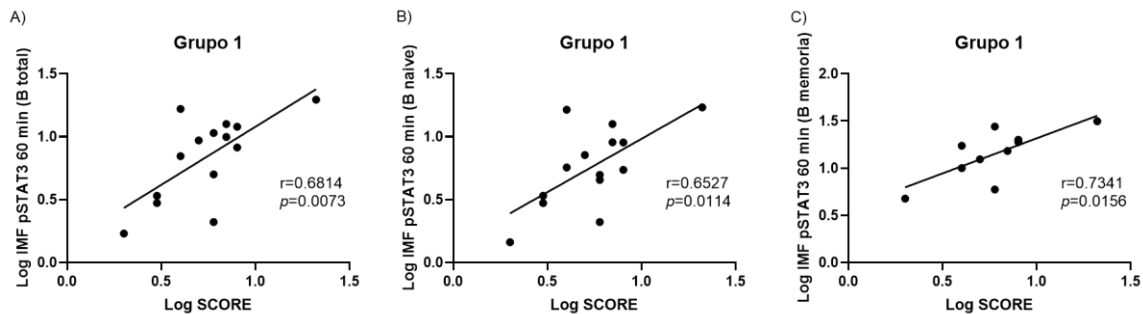


Figura 27. Correlaciones entre la fosforilación de STAT3 a los 60 minutos y el score de gravedad. A) Células B totales B) Células B naive. C) Células B de memoria. Prueba correlación de Pearson $p < 0.05$.

De acuerdo con los resultados anteriores se encontró una fosforilación anormal en los pacientes con IDCv tras la activación de la vía de señalización IL-21/STAT3, en donde se observa un incremento a los 60 minutos, lo cual es más marcado en

las células B de memoria de los pacientes del grupo 1, y esto parece tener relación con la gravedad de la enfermedad.

Por último, realizamos un análisis de frecuencias para determinar cuáles características clínicas eran las que estaban más presentes en aquellos pacientes con una fosforilación aumentada de STAT3 a los 60 minutos en las células B de memoria, si bien encontramos distintas sintomatologías asociadas es de destacar que se observaron enteropatías y enfermedades autoinmunes con gran frecuencia, tal como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Frecuencia de manifestaciones clínicas de los pacientes con IDCV y su relación con pSTAT3 en células B de memoria.

	pSTAT3 BM 60 min		
	Alto	Bajo	Normal
No Pacientes	14	0	5
Sinusitis	64.3 %	-	60.0 %
Neumonía	85.7 %	-	40.0 %
Bronquiectasias	35.7 %	-	20.0 %
Esplenomegalia	35.7 %	-	0.0 %
Linfadenopatías	42.9 %	-	40.0 %
Enteropatías	42.9 %	-	20.0 %
Autoinmunidad	42.9 %	-	20.0 %
Granulomas	7.1 %	-	20.0 %
Cáncer	7.1 %	-	0.0 %

En negritas se indican las patologías que se presentaron mayor frecuencia.

Tras analizar los resultados de las tres cohortes y buscando relación con los resultados anormales en la vía de señalización IL-21/STAT3 que presentaron algunos de los pacientes se observaron similitudes de tipo clínico como es el caso de las enteropatías o las autoinmunidades, así mismo se encontraron similitudes fenotípicas en los porcentajes de poblaciones y subpoblaciones celulares, tal como se observa en la figura 28.

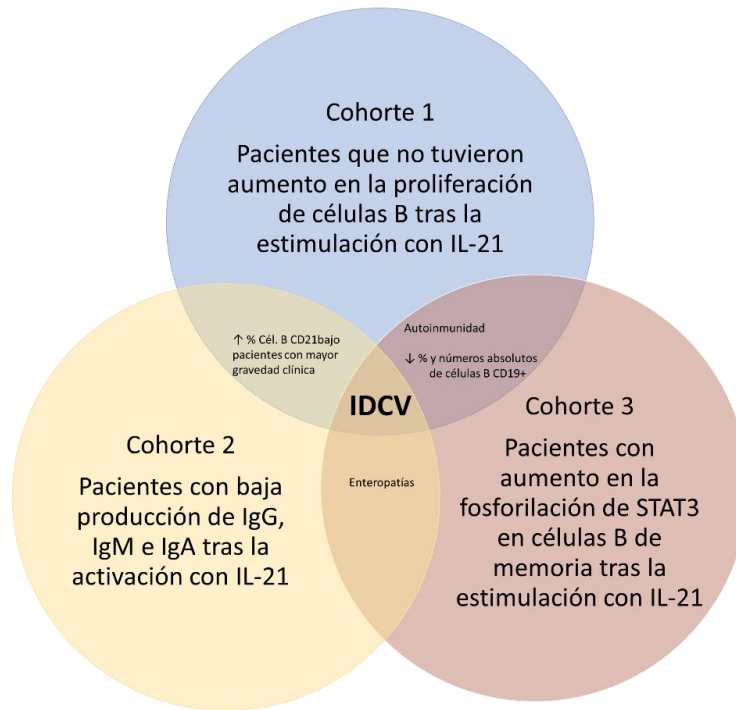


Figura 28. Diagrama de relación entre las cohortes. Se encontraron relaciones entre las cohortes de estudios, en aquellos pacientes que presentaron anomalías en respuesta a la estimulación con IL-21, las características asociadas son porcentajes anormales poblaciones de células B, además de características clínicas como enteropatías y autoinmunidad.

Discusión

La Inmunodeficiencia Común Variable es una enfermedad que comprende un gran grupo de pacientes con hipogammaglobulinemia, actualmente se han determinado algunos defectos genéticos que causan el fenotipo de la enfermedad, sin embargo, aún faltan estudios que ayuden a comprender más sobre dicha inmunodeficiencia, desde estudios genéticos hasta funcionales como es el caso del presente proyecto.

La vía de señalización IL-21/STAT3 es, como ya se ha mencionado, de gran relevancia para que las células B puedan diferenciarse hacia células plasmáticas de larga vida es por ello que en este trabajo se realizaron pruebas para evaluar distintos procesos funcionales durante la activación de la vía, sin embargo, cada uno de dichos ensayos se realizó con cohortes diferentes, las cuales fueron identificadas como cohorte 1 (pacientes a los cuales se les realizó la determinación de la proliferación de células B), cohorte 2 (pacientes a los cuales se les realizó la determinación de inmunoglobulinas tras la activación in vitro de células B) y cohorte 3 (pacientes a los cuales se les realizó la determinación de la fosforilación de la proteína STAT3 en células B).

Si bien, se trabajó con cohortes independientes es de destacar que muchos de los resultados clínicos son compartidos por todos los pacientes, la media de edad en todas las cohortes fue en la edad adulta, lo cual era de esperarse ya que como ha sido reportado por diversos autores la IDCV es una enfermedad que se presenta principalmente en edades adultas, otro dato importante a destacar es que en todas las cohortes hay un mayor número de personas del sexo femenino que del sexo masculino, esto también se ha observado en distintas cohortes de diversos lugares del mundo, si bien, no se conoce la causa es un hecho relevante (18,82,83).

Los hallazgos clínicos que presentaron los pacientes con IDCV de este trabajo son principalmente infecciones recurrentes en el tracto respiratorio, y esto se corrobora ya que los principales padecimientos fueron neumonía y sinusitis. La IDCV se caracteriza por una variabilidad de manifestaciones clínicas aparte de las

infecciones de repetición por lo que en los pacientes de estas cohortes también fueron frecuentes las enteropatías y enfermedades autoinmunes (14,18,82–85).

Tras clasificar a los pacientes de acuerdo al porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo respecto a los linfocitos totales, tal como lo sugiere la clasificación de Freiburg (22), se encontraron diferencias entre los grupos de pacientes en la mayoría de los casos los pacientes del grupo 1 cursan la enfermedad con más sintomatología, presentan más episodios de neumonías, sinusitis, así como esplenomegalia, granulomas, enfermedades autoinmunes, cáncer y bronquiectasias, esto como ya ha sido ampliamente reportado influye en la gravedad con la que el paciente cursa su enfermedad, es decir, los pacientes del grupo 1 suelen presentar más complicaciones que los del grupo 2, si bien, en las cohortes de estudio del presente trabajo no se observó diferencia en el score de gravedad si se encontró una mayor media en los pacientes del grupo 1, es por ello que en el caso de la cohorte dos se decidió clasificarlos de acuerdo a la gravedad clínica y los datos que se encontraron son similares a los observados en las otras cohortes (86,87). Es de destacar que en la cohorte 1 se encontró diferencia en la concentración de IgG en suero, la cual se vio reducida en los pacientes del grupo 1, esto se vio reflejado en las medias de score, sin embargo, las medias de concentración de ambos grupos se encuentran por debajo de los valores de referencia reportados (88).

Cuando se realiza el análisis comparativo de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en las tres cohortes que se dividieron en este trabajo. Podemos apreciar que el grupo 1 se caracterizó por tener una disminución de las células B en número y porcentaje, lo cual, ya ha sido reportado por otros grupos de investigación. Uno de los defectos principales que tienen los pacientes con IDCV es precisamente en las células B en las vías de maduración que puede ir desde los estadios más inmaduros hasta la diferenciación terminal; por lo que el grupo 1, que se caracteriza por una disminución de sus células B de memoria, también en muchos de los casos se encuentra bajo el número de células B totales en sangre periférica.

En cuanto a la fenotipificación leucocitaria también se comparten varios hallazgos entre las cohortes de estudio, uno de los más importantes es la disminución de las células B en el grupo 1 tanto en porcentaje como en números absolutos, lo cual ha sido reportado ampliamente en distintas cohortes, esto debido a los defectos funcionales ya sea propiamente en las células B o en las células T que ayudan a la coestimulación de las células B, además han observado que los pacientes con IDCV presentan problemas en sus células B ya que las vías de maduración pre-centro germinal se encuentran alteradas y esto podría derivar en una disminución en las poblaciones de estas células (89).

Este mismo grupo como era de esperarse debido a la clasificación presenta porcentajes aumentados de células B naive y porcentajes disminuidos de las células B de memoria con y sin cambio de isotipo. Además, en la cohorte 1 se encontraron diferencias similares a los de la cohorte 2 en estos dos grupos de pacientes (Grupo 1 y con score alto, respectivamente) se observó que los porcentajes de células B CD21bajo se encontraban aumentados, esto es de relevancia ya que se ha observado que estas células pueden poseer un BCR que reconoce moléculas propias y consecuentemente es una población que se ha visto en pacientes que presentan autoinmunidad, los cuales en su gran mayoría pertenecen al grupo 1 (24,90), además en los pacientes de la cohorte dos con score alto se observó que poseían un porcentaje elevado de células B dobles negativas, esta población se ha estudiado es pacientes con autoinmunidad, principalmente lupus eritematoso sistémico (LES) y como el grupo 1 de la cohorte 2 tiene un porcentaje alto de procesos inflamatorios y autoinmunidad, esto explica el porcentaje alto de células B DN si bien no se sabe el papel que desempeñan estas células, algunos autores indican que podría ser un tipo de célula B de memoria no convencional (91).

En cuanto a los resultados de la cohorte 1 se realizó la determinación de la proliferación de células B, este es un ensayo poco realizado, sin embargo, hay grupos de investigación que han propuesto realizarlo en pacientes con IDCV para determinar la funcionalidad de estas células (92), lo que respecta propiamente a

los resultados se observó que la proliferación de las células B de los pacientes con IDCV estaba disminuida significativamente al activar con los tres estímulos, esto podría deberse a que esta estimulación induce la activación de distintas vías tal es el caso de TLR9 con CpG, BCR con Pansorbin que es pared celular de *Staphylococcus aureus*, y PKW una lectina con efecto mitogénico, ya que se activan distintas vías y se ha observado que muchos de los pacientes presentan defectos en las células B estas son incapaces de proliferar y probablemente se induzca apoptosis como ya se ha observado anteriormente (93,94). Por otro lado también se vio disminuida la proliferación cuando se estimuló con CpG esto era de esperarse ya que se ha observado que los pacientes con IDCV presentan defectos en la vía de TLR9 que como lo han propuesto anteriormente esto podría deberse a un defecto en la señalización mediada por STAT3 (74,78).

Al agrupar a los pacientes de acuerdo con la clasificación de Freiburg se observaron distintas diferencias, en los pacientes del grupo 1 la proliferación es significativamente menor al estimular a las células con tres estímulos, esto podría deberse a que los pacientes de dicho grupo presentan mayores problemas en moléculas específicas del linaje de células B lo cual impide que estas puedan diferenciarse hacia células plasmáticas. Por otro lado, la proliferación de las células B de los pacientes del grupo 2 se observó disminuida al activar a las células con CpG e IL-21, CD40L y α -IgM, esto es de importancia ya que parece que los pacientes de ambos grupos presentan defectos para proliferar y por ende para que sus células B se diferencien hacia células plasmáticas, tal como lo reportaron Blanco y col. (95).

Posteriormente tras analizar la proliferación en distintas condiciones en cada grupo se observó que el comportamiento normal, tomando como referencia a los testigos, es que la proliferación se encuentre significativamente disminuida en condiciones con CD40L y α -IgM en comparación con la condición en la cual se activó con IL-21, CD40L y α -IgM, esto muestra la importancia de la IL-21 para inducir la proliferación de las células B, pues como ya había sido reportado por Ding y col. la IL-21 es un potente inductor de la proliferación y diferenciación

terminal de las células B (96). Además, esta respuesta proliferativa baja con la estimulación por CD40L y α -IgM, también se vio disminuida en comparación con la activación con los tres estímulos esto debido a que como ya se había mencionado IL-21 es un inductor de la proliferación y diferenciación de las células B, sin embargo, al activar con CD40L la respuesta es de menor potencia debido a que requiere de la sinergia de la IL-21 (96).

Al analizar la proliferación de las células B del grupo 1 en las distintas condiciones encontramos un comportamiento similar que en el grupo de testigos en el cual hay un aumento significativo del porcentaje de división en las células B tras estimularlas con IL-21, CD40L y α -IgM, esto en comparación con la activación por CD40L y α -IgM, lo cual muestra que este grupo de pacientes parece no tener problema en la vía de señalización, sin embargo, al observar detenidamente cada condición encontramos que todas están disminuidas excepto la condición que contiene a la IL-21, lo cual podría estar dado por el aumento de la fosforilación de STAT3 (68). Respecto a los resultados del grupo 2, encontramos resultados completamente diferentes a los que se observaron con los testigos, existe una disminución en el porcentaje de división tras activar a las células con CpG, así como con CD40L y α -IgM, en comparación con la activación por tres estímulos, en cuanto a CpG se ha observado que este grupo de pacientes parece tener problemas para la activación de las vías por TLRs, así mismo desde los testigos se observó que CD40L y α -IgM, no son señales lo suficientemente fuertes como para inducir un alto porcentaje de proliferación de las células B, es importante destacar que al comparar la condición con IL-21 y sin IL-21 no se observó diferencia, lo cual podría indicar un posible defecto en la activación que se da en centro germinal en dicha vía.

En cuanto a los resultados de la cohorte 2 en la determinación de inmunoglobulinas en sobrenadantes tras el cultivo de PBMCs en distintas condiciones se observó que los pacientes producen menor cantidad de IgG, IgM e IgA en comparación con los testigos, esto probablemente debido a defectos asociados a las células B en los pacientes con IDCV, los cuales impiden que las

células B lleguen a su diferenciación terminal como células plasmáticas productoras de anticuerpo. Este resultado es más evidente cuando se compara la producción de inmunoglobulinas *in vitro* con la concentración de inmunoglobulinas en suero, la funcionalidad de la célula B se ve afectada pues sin importar la condición de cultivo la concentración de anticuerpos se encuentra muy por debajo de la concentración en suero, aun considerando que los pacientes presentan hipogammaglobulinemia (89,95).

Al comparar la producción de inmunoglobulinas entre los pacientes con IDCV y los testigos en cada una de las condiciones se observó que había una disminución significativa de IgG e IgA cuando se activaba con los tres estímulos, esto quizá pueda deberse a que las células B estaban recibiendo demasiadas señales y al tener algún defecto en este linaje celular se inducía algún tipo de muerte celular y esto impedía la diferenciación y posterior producción de anticuerpos tal como se observó desde la proliferación, si bien no se realizaron ensayos de apoptosis ha sido descrito que los pacientes con IDCV presentan mayor porcentaje de muerte celular en linfocitos totales que los testigos, lo cual es incluso más significativo en los pacientes del grupo 1 (97).

En cuanto a la producción de IgM se encontró una disminución marcada en condiciones sin estímulo y con IL-21, si bien la disminución se observa en todas las condiciones específicamente en esas dos es significativo, el caso específico de la activación con IL-21 puede deberse a que dicha citocina alude a la reacción de centro germinal, en donde se lleva a cabo la hipermutación somática y el cambio de isotipo, lo cual nos lleva a pensar que algunos de estos pacientes pueden realizar el cambio de isotipo pues al observar la producción de IgG en condiciones con IL-21 los pacientes presentan una media similar a los de los testigos, si bien esto aún no ha sido muy descrito se ha observado que algunos pacientes principalmente aquellos que tienen autoinmunidad presentan problemas en la formación del centro germinal ya que estos son hiperplásticos, y si bien son capaces de producir inmunoglobulinas estas no son funcionales o bien son autorreactivos (98).

Al comparar la producción de IgG e IgM tras clasificar a los pacientes por su score se observó que la diferencia encontrada en IgG tras activar con tres estímulos ya no era significativa en ninguno de los grupos de estudio, sin embargo, las diferencias en IgM sin estímulo y con IL-21 se mantuvieron únicamente en el grupo con un score bajo, lo cual indica que estos pacientes son quienes pueden realizar el cambio de isotipo y es por ello que su gravedad clínica es menor, pues al estimularse sus células pueden producir mayor cantidad de anticuerpos de tipo IgG, sin embargo, se tendrían que realizar más estudios para determinar si estos anticuerpos son realmente funcionales ya que se ha observado que los pacientes con IDCV presentan alteraciones en sus repertorios de BCR (99,100).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la fosforilación de la proteína STAT3 que corresponden a la cohorte 3, al comparar el grupo de pacientes con IDCV y el grupo de testigos encontramos que los pacientes tienen un comportamiento anormal, es decir, se observó que la proteína STAT3 en estado basal se encuentra desfosforilada en los testigos, al activarse mediante la vía de IL-21 la proteína se fosforila a los 15 minutos, mientras que a los 60 minutos la proteína se vuelve a desfosforilar, hecho que no ocurre en las células B de los pacientes, pues a dicho tiempo la fosforilación se mantiene, si bien, esto se observa en las células B totales y naive es de destacar que es mucho más significativo en las células B de memoria. En 2018 Borzutzky y col. reportaron que la fosforilación de STAT3 era similar en pacientes con IDCV y testigos, en ese trabajo únicamente observan la fosforilación a los 10 minutos tras la activación con IL-6 e IL-21 (78), con lo cual se corrobora que los pacientes no tienen problema en fosforilar la proteína STAT3 pero parecen tener un problema al desfosforilarla de acuerdo con los resultados aquí presentados. Recientemente Marega y col. reportaron pacientes con STAT3-GOF, dichos pacientes no tienen propiamente el diagnóstico de IDCV pero dos de ellos presentan hipogammaglobulinemia, este grupo de investigadores realizó la cinética de fosforilación de STAT3 en células T CD3+ activando con IL-6 y en los pacientes que presentan la mutación R152W se observa un aumento en la fosforilación de dicha proteína a los 60 minutos, en comparación con los controles, dicha fosforilación se mantiene hasta los 90 minutos y disminuye a los 120

minutos (101), en el presente trabajo no podemos decir en qué momento disminuye pSTAT3 en las células de los pacientes, debido a que no se realizó la determinación con mayor extensión de tiempo.

Al clasificar a los pacientes en grupo 1 y 2, y comparar los resultados de la fosforilación de la proteína STAT3 con los resultados de los testigos se observó dicho aumento en las células B de memoria a los 60 minutos en ambos grupos, dicho aumento también se observó al comparar la fosforilación de STAT3 a los distintos tiempos, siendo más marcado el aumento en los pacientes del grupo 1, un comportamiento similar ya había sido reportado por Clemente y col, en el cual encontraron que los pacientes que no poseen células B de memoria con cambio de isotipo tenían un aumento en la fosforilación de la proteína STAT3 (68). Si bien ya se han reportado casos de ganancia de función en STAT3 en pacientes con diagnóstico de IDCV (45) debido a los alcances de este trabajo no se puede asegurar que la fosforilación alterada sea causa de un defecto de ganancia de función en la proteína STAT3 también podría deberse a otras moléculas, tales como SOCS3 que es la fosfatasa que regula la desfosforilación de STAT3, lo cual podría provocar que la proteína no se desfosforile o que la desfosforilación se dé con un retraso, actualmente sólo se han reportado defectos en SOCS1 que si bien está relacionada principalmente con STAT1 en una de las mutaciones reportadas el paciente presentó un síndrome parecido a IDCV, lo cual nos lleva a pensar que algo similar podría ocurrir en la vía de señalización de STAT3 (102).

Se han reportado casos de pacientes que presentan ganancia de función en la proteína STAT3, dichos pacientes principalmente presentan autoinmunidad y como se pudo observar en los datos clínicos de esta cohorte los pacientes del grupo 1 presentan enfermedades autoinmunes con mayor frecuencia que los del grupo 2, si bien, este no es el único indicador podría darnos un indicio de que algunos de los pacientes podrían presentar dicho defecto, además, de acuerdo a los resultados se observó que mientras mayor sea la fosforilación de la proteína STAT3, mayor es la gravedad clínica de los pacientes, aun cuando esta es una

correlación descriptiva es de relevancia tomarlo en cuenta para futuras pruebas que se les pudieran realizar a los pacientes (67).

En este trabajo la pregunta de investigación fue si la vía de IL-21/STAT3 estaba afectada en los pacientes con IDCV y hacer diversos estudios a una cohorte de pacientes; sin embargo, por cuestiones ajenas al estudio se trabajó con tres distintas cohortes de pacientes lo cual aumentó la variabilidad de los resultados. A pesar de ello se pudo evidenciar que existen defectos tras activar la vía IL-21/STAT3; se demostró una anormal fosforilación de STAT3 en los pacientes, lo cual se vio principalmente a los 60 minutos en las células B de memoria, cuando se analizaron las frecuencias de las características clínicas de los pacientes con aumento en la fosforilación se observó predisposición a ciertas manifestaciones, tales como neumonía, esplenomegalia, enteropatías y autoinmunidad, mientras que los pacientes con una fosforilación de STAT3 normal a dicho tiempo tienen menor frecuencia en la presencia de dichas manifestaciones, esto nos evidencia que los pacientes que tienen alteración en la fosforilación de STAT3 tienen un problema que se evidencia en las manifestaciones clínicas con las que cursan su enfermedad (Figura 29). Tras analizar la proliferación de las células B en la cohorte 2 de pacientes, se encontró que había 7 pacientes que al comparar las condiciones de activación con α -IgM, CD40L con y sin IL-21 no había cambio en el porcentaje de proliferación, es decir, que la IL-21 no inducía la respuesta, al comparar a dichos pacientes con el resto se observó que los pacientes que no tuvieron una respuesta con IL-21 presentaban enfermedades autoinmunes con mayor frecuencia que el resto, lo cual muestra que la falta de respuesta a la IL-21 tiene un efecto clínico de autoinmunidad (Figura 29). Para finalizar cuando se analizó la producción de inmunoglobulinas tras la activación con IL-21, se observó que los pacientes que tienen niveles bajos de IgG, IgA e IgM presentan con mayor frecuencia enteropatías, lo cual evidencia que la falla en la producción de inmunoglobulinas inducida por IL-21 está asociada a dicha manifestación clínica (Figura 29). Para comprender como es que los defectos en la vía IL-21/STAT3 está afectando a la secreción de inmunoglobulinas séricas y la predisposición hacia ciertas patologías clínicas en los pacientes con IDCV, se necesitan una

cohorte más grande y más estudios de proteínas involucrados en la vía en estos pacientes. Aun así, los resultados observados en el presente trabajo nos indica que existe falla en la vía de señalización IL-21/STAT3 en algunos pacientes con IDCV.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se observa que existen defectos en la vía de señalización IL-21/STAT3 en algunos de los pacientes, ya que tuvieron una respuesta anormal tras la activación con la IL-21, y tal como lo había reportado Clemente y col. algunos pacientes con IDCV muestran una fosforilación de la proteína STAT3 aumentada, sin embargo, a lo largo de la vía hay otras moléculas que también se han visto aumentadas, tales como IRF4 que es un factor de transcripción inducido por STAT3, así como Blimp-1 que es otro factor de transcripción el cual induce la diferenciación hacia células plasmáticas, pero como lo han planteado algunos autores deben existir algunos puntos de control en las células B que estén regulando estas alteraciones y que impidan que esta células puedan diferenciarse a células productoras de anticuerpo de manera óptima.(68,103,104).

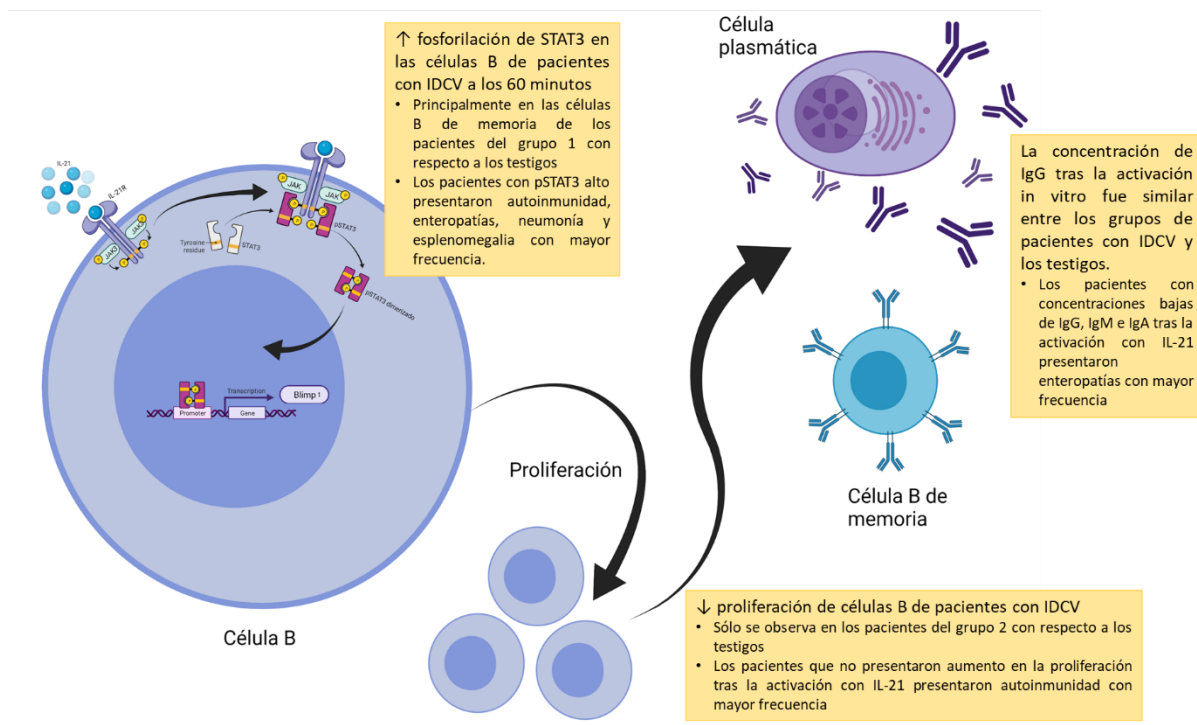


Figura 29. Resultados de los estudios funcionales de la vía de señalización IL-21/STAT3.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que existen defectos en las células B de los pacientes con IDCIV, desde los porcentajes y números absolutos anormales en sangre periférica, hasta fallas funcionales que impiden que dicha célula prolifere adecuadamente y se diferencie hacia célula plasmática productora de anticuerpos, específicamente se evidenció un problema en la vía de señalización de IL-21/STAT3 en la cual se observa que hay una desfosforilación atípica de la proteína STAT3 lo cual está relacionado con la gravedad clínica, se observaron características clínicas de autoinmunidad y enteropatías en aquellos pacientes en los que se vio un defecto evidente asociado a la vía de señalización estudiada. Los hallazgos presentados tienen importantes implicaciones en la comprensión de la enfermedad, así mismo evidencian el defecto funcional de los pacientes en la diferenciación terminal de las células B lo cual se asocia a un problema en la reacción de centro germinal.

Perspectivas

En este trabajo se observaron anomalías tras la activación de la vía IL-21/STAT3, si bien, se propone estudiar más el centro germinal también se propone buscar la relación entre los diversos defectos genéticos y su relación con la diferenciación terminal de las células B y cómo eso afecta específicamente a la vía de señalización IL-21/STAT3, para ello es necesario realizar más experimentos que abarquen estudios funcionales y moleculares de proteínas involucradas en la adecuada respuesta de dicha vía, con el fin de entender con más profundidad los defectos que pueden explicar el fenotipo clínico de los pacientes con Inmunodeficiencias Común Variable, y así mismo en un futuro encontrar tratamientos más adecuados a las condiciones individuales de los pacientes y que esto se vea reflejado en la calidad de vida de los mismos.

Referencias bibliográficas

1. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020;40(1):24–64.
2. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2 SUPPL. 2):S182–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.053>
3. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol*. 2020;40(1):66–81.
4. Notarangelo LD, Bacchetta R, Casanova JL, Su HC. Human inborn errors of immunity: An expanding universe. *Sci Immunol*. 2020;5(49).
5. ESID. ESID Database Statistics [Internet]. ESID Registry (2004-2014). 2014. Available from: <https://esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/ESID-Database-Statistics>
6. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2018;14(s2):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0290-5>
7. LASID. General statistics [Internet]. Statistics. 2020. Available from: <https://lasidregistry.org/view/statistics/general/2020-05>
8. Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):1–11.
9. Abbott JK, Gelfand EW. Common Variable Immunodeficiency. Diagnosis, Management, and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2015;35(4):637–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.009>
10. Janeway CA, Apt L, Glitin D. Agammaglobulinemia. *Trans Assoc Am Physicians*. 1953;66:200–2.
11. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(1):38–59.
12. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol*. 1999;93(3):190–7.
13. Odnoletkova I, Kindle G, Quinti I, Grimbacher B, Knerr V, Gathmann B, et al. The burden of common variable immunodeficiency disorders: A retrospective analysis of the European Society for Immunodeficiency (ESID) registry data. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):1–17.

14. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2008;46(10):1547–54.
15. Berrón-ruiz L, López-herrera G, Vargas-hernández A, Santos-argumedo L, López-macías C, Isibasi A, et al. Impaired selective cytokine production by CD4 + T cells in Common Variable Immunodeficiency associated with the absence of memory B cells. *Clin Immunol*. 2016;166–167:19–26.
16. Espa S, López-herrera G, Segura-méndez NH, Farril-romanillos PO. *Allergologia et immunopathologia* Low percentages of regulatory T cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune diseases and its association with increased numbers of CD4 + CD45RO + T and CD21 low B cells. 2019;47(5).
17. 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.
18. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2016;119(7):1650–8.
19. Ochtrop MLG, Goldacker S, May AM, Rizzi M, Draeger R, Hauschke D, et al. IMMUNOBIOLOGY T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency studied systematically . Here we report from controls . These infiltrates correlated. *Blood*. 2016;118(2):309–19.
20. Taubenheim N, Hornung M Von, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter H, et al. Common Variable Immunodeficiency Patients 1. 2014;
21. Romero-Ramírez S, Navarro-Hernandez IC, Cervantes-Díaz R, Sosa-Hernández VA, Acevedo-Ochoa E, Kleinberg-Bild A, et al. Innate-like B cell subsets during immune responses: Beyond antibody production. Vol. 105, *Journal of Leukocyte Biology*. 2019. p. 843–56.
22. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: A new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002;99(5):1544–51.
23. Taubenheim N, Hornung M Von, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter H, et al. Defined Blocks in Terminal Plasma Cell Differentiation of Common Variable Immunodeficiency Patients. *J Immunol*. 2005;175:5498–503.
24. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoenig M. Circulating CD21 low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing , innate-like B cells. 2009;(2):0–5.
25. Warnatz K, Wehr C, Dräger 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.
26. Keller B, Strohmeier V, Harder I, Unger S, Payne KJ, Andrieux G, et al. The expansion of human T-bet high CD21 low B cells is T cell dependent. :1–17.
 27. Piqueras B, Galicier L, Cruyssen FBDER. Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates with Clinical Aspects. *J Clin Immunol*. 2003;23(5):385–400.
 28. Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. 2016;53(9):575–90.
 29. Lopez-herrera G, Tampella G, Pan-hammarstro Q, Trujillo-vargas CM, Phadwal K, Simon AK, et al. Deleterious Mutations in LRBA Are Associated with a Syndrome of Immune Deficiency and Autoimmunity. *Am J Hum Genet*. 2012;90:986–1001.
 30. Zelm MC Van, Reisli I, Burg M Van Der, Noesel CJM Van, Tol MJD Van, Woellner C, et al. An Antibody-Deficiency Syndrome Due to Mutations in the. 2006;1901–12.
 31. Zelm MC Van, Dongen JJM Van, Burg V Der, Zelm MC Van, Smet J, Adams B, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency Find the latest version : CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. 2010;
 32. Montfrans JM Van, Hoepelman AIM, Otto S, Gijn M Van, Corput L Van De, Weger RA De, et al. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J Allergy Clin Immunol*. 129(3):787-793.e6.
 33. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Bergbreiter A, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia.
 34. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell – independent antibody responses. 2010;120(1).
 35. Kotlarz D, Ziętarą N, Milner JD, Klein C. Human IL-21 and IL-21R deficiencies: Two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26(6):704–12.
 36. Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, Salzer E, Çagdas D, Esenboga S, et al. Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R. *Haematologica*. 2015;100(6):216–9.

37. Deau M-C, Heurtier L, Frange P, Suarez F, Bole-Feysot C, Nitschke P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3923–8.
38. Kuehn H, Ouyang W, Lo B, Deenick E, Niemela J, Avery D, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Sciencexpress*. 2014;(Reports):1–8.
39. Franks ZF, Durtschi JD, Chen K, Coonrod EM, Kuma A, Margraf RL, et al. Germline Mutations in NFKB2 Implicate the Noncanonical NF- k B Pathway in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. 2013;812–24.
40. Kuehn H, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Pedersen AS, Gelfand EW, Maffucci P, et al. Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med*. 2016;374(11):1032–43.
41. Keller MD, Pandey R, Li D, Glessner J, Tian L, Hou C, et al. Mutation in IRF2BP2 is responsible for a familial form of common variable immunodeficiency disorder. *J Allergy Clin Immunol*.
42. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003;4(3):261–8.
43. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Bo J, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13945–50.
44. Schlesier M, Peter HH, Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. 2005;37(8):820–8.
45. Russell MA, Pigors M, Houssen ME, Manson A, Kellsell D, Longhurst H, et al. A novel de novo activating mutation in STAT3 identified in a patient with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol*. 2018;187(Cvid):132–6.
46. Bogaert JA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, Baere E De, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. 2016;53:575–90.
47. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* [Internet]. 2019;177(3):524–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>
48. Lau AW, Brink R. Selection in the germinal center. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2020;63(Figure 1):29–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.001>
49. Zhou JHS, Markham JF, Duffy KR, Hodgkin PD. Stochastically timed competition between division and differentiation fates regulates the transition from B lymphoblast to plasma cell. *Front Immunol*. 2018;9(SEP):1–15.

50. Lai J-H, Luo S-F, Ho L-J. Targeting the CD40-CD154 Signaling Pathway for Treatment of Autoimmune Arthritis. *Cells*. 2019;8(8):927.
51. Pallikkuth S, Parmigiani A, Pahwa S. Role of IL-21 and IL-21 receptor on B cells in HIV infection. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(2):173–95.
52. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol Rev*. 2008;223(1):60–86.
53. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D’Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 2010;207(2):365–78.
54. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: A double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2014;13(5):379–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4296>
55. Leonard WJ, Zeng R, Spolski R. Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *J Leukoc Biol*. 2008;84(2):348–56.
56. Leonard WJ, Wan CK. IL-21 Signaling in Immunity. *F1000Research*. 2016;5(0):1–10.
57. Salzer E, Kansu A, Sic H, Májek P, Ikinciogullari A, Dogu FE, et al. Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6).
58. Leonard WJ, Lin JX, O’Shea JJ. The γ c Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity [Internet]*. 2019;50(4):832–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.028>
59. Kotlarz D, Zi N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. 2013;
60. Schwartz RH, Natl P, Sci A, Med JE, Go C, Allison JP, et al. Interaction of IL-2R , 1 and Yc Chains with Jaki and Jak3 : Implications for XSCID and XCID. 1994;5409(1987):3–6.
61. Cagdas D, Mayr D, Baris S, Worley L, Langley DB, Metin A, et al. Genomic Spectrum and Phenotypic Heterogeneity of Human IL-21 Receptor Deficiency. *J Clin Immunol*. 2021;41(6):1272–90.
62. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VET, Silvennoinen O, O’Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol*. 2004;5(12).
63. Villarino A V., Kanno Y, O’Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol*. 2017;18(4):374–84.
64. Vogel TP, Milner JD, Cooper MA. The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *J Clin Immunol*. 2015;35(7):615–23.
65. Sgrignani J, Garofalo M, Matkovic M, Merulla J, Catapano C V., Cavalli A.

- Structural biology of STAT3 and its implications for anticancer therapies development. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
66. Lorenzini T, Dotta L, Giacomelli M, Vairo D, Badolato R. STAT mutations as program switchers: turning primary immunodeficiencies into autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2017;101(1):29–38.
 67. Fabre A, Marchal S, Barlogis V, Mari B. Clinical Aspects of STAT3 Gain-of-Function Germline Mutations : A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;3.
 68. Clemente A, Pons J, Lanio N, Cunill V, Frontera G, Crespí C, et al. Increased STAT3 phosphorylation on CD27+ B-cells from common variable immunodeficiency disease patients. *Clin Immunol [Internet].* 2015;161(2):77–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.09.004>
 69. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim H-P, Wang G, Qi C-F, et al. Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol.* 2004;173(9):5361–71.
 70. Moens L, Tangye SG. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation: IL-21 takes center stage. *Front Immunol.* 2014;5(FEB):1–13.
 71. Tellier J, Nutt SL. Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *Eur J Immunol.* 2019;49(1):30–7.
 72. Schwartz R, Porat YB-A, Handzel Z, Sthoeger Z, Garty B-Z, Confino-Cohen R, et al. Identification of a Subset of Common Variable Immunodeficiency Patients with Impaired B-Cell Protein Tyrosine Phosphorylation. 1999 [cited 2022 Feb 8];6(6):856–60. Available from: <https://journals.asm.org/journal/cdli>
 73. Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramon S, et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol [Internet].* 2009;124(2):349–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 74. Cunningham-Rundles C, Radigan L, Knight AK, Zhang L, Bauer L, Nakazawa A. TLR9 Activation Is Defective in Common Variable Immune Deficiency. *J Immunol.* 2006;176(3):1978–87.
 75. Escobar D, Pons J, Clemente A, Iglesias J, Regueiro V, Bengoechea JA, et al. Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cell Immunol [Internet].* 2010;262(2):105–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.01.002>
 76. Plebani A, Lougaris V, Soresina A, Meini A, Zunino F, Gioia Losi C, et al. A novel immunodeficiency characterized by the exclusive presence of transitional B cells unresponsive to CpG. *Immunology.* 2007;121:183–8.
 77. Giardino G, Cirillo E, Gallo V, Esposito T, Fusco F, Conte MI, et al. B cells

from nuclear factor κB essential modulator deficient patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand. *Clin Immunol* [Internet]. 2015;161(2):131–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.08.008>

78. Borzutzky A, Rauter I, Fried A, Rachid R, McDonald DR, Hammarstrom L, et al. Defective TLR9-driven STAT3 activation in B cells of patients with CVID. *Clin Immunol* [Internet]. 2018;197(August):40–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.08.008>
79. Yazdani R, Abolhassani H, Rezaei N, Azizi G, Hammarström L, Aghamohammadi A. Evaluation of Known Defective Signaling-Associated Molecules in Patients Who Primarily Diagnosed as Common Variable Immunodeficiency. *Int Rev Immunol*. 2016;35(1):7–24.
80. Mokhari M, Shakeri A, Mirminachi B, Abolhassani H, Yazdani R, Grimbacher B, et al. Important Factors Influencing Severity of Common Variable Immunodeficiency. *Arch Iran Med*. 2016;19(8):544–50.
81. Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: Avoid the panglossian. *Cytom Part A*. 2011;79 A(2):95–101.
82. AYTEKİN G, YILDIZ E, ÇÖLKESEN F, ARSLAN Ş, ÇALIŞKANER AZ. Five Years of Experience in a Single Center: Retrospective Analysis of Adult Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Asthma Allergy Immunol*. 2020;18(1):30–7.
83. Cunningham-rundles C, Bodian C. Common Variable Immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 Patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34–48.
84. Gathmann B, Mahlaoui N, Gérard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze I, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(1):7–9.
85. Richardson CT, Slack MA, Dhillon G, Marcus CZ, Barnard J, Palanichamy A, et al. Failure of B Cell Tolerance in CVID. *Front Immunol*. 2019;10(December):1–9.
86. Vodjgani M, Aghamohammadi A, Samadi M, Moin M, Hadjati J, Mirahmadian M, et al. Analysis of Class-Switched Memory B Cells. *17(Ivc):321–8*.
87. Berglund LJ, Wong SWJ, Fulcher DA. B-cell maturation defects in common variable immunodeficiency and association with clinical features. *Pathology*. 2008;40(3):288–94.
88. Jolliff C, Cost K, Stivrins P, Grossman P, Nolte C, Franco S, et al. Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3 and C4 as determined by rate nephelometry. *Clin Chem*. 1982;28(1):126–8.
89. del Pino-Molina L, López-Granados E, Lecrevisse Q, Torres Canizales J, Pérez-Andrés M, Blanco E, et al. Dissection of the Pre-Germinal Center B-

- Cell Maturation Pathway in Common Variable Immunodeficiency Based on Standardized Flow Cytometric EuroFlow Tools. *Front Immunol.* 2021;11(February):1–14.
90. Reincke ME, Payne KJ, Harder I, Strohmeier V, Voll RE, Warnatz K, et al. The Antigen Presenting Potential of CD21^{low} B Cells. *Front Immunol.* 2020;11(October):1–12.
 91. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2007;178(10):6624–33.
 92. Khoenkhoen S, Ádori M, Pedersen GK, Karlsson Hedestam GB. Flow Cytometry-Based Protocols for the Analysis of Human Plasma Cell Differentiation. *Front Immunol.* 2020;11(September):1–12.
 93. Clemente A, Pons J, Lanio N, Matamoros N, Ferrer JM. CD27⁺ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. *Clin Exp Immunol.* 2013;174(1):97–108.
 94. Saxon A, Keld B, Guo B, Hart NST, Lyon L. B cells from a distinct subset of patients with common variable CD38 expression , and undergo enhanced apoptosis. 1995;95(Cvid):17–25.
 95. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Serrano C, Criado I, Del Pino-Molina L, et al. Defects in memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin-subclasses in patients with CVID and immunoglobulin subclass deficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(3):809–24.
 96. Ding B, Bi E, Chen H, Yu J, Ye H. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol.* 2013;190(4):1827–36.
 97. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the Complexity of T Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. *J Immunol.* 2007;178(6):3932–43.
 98. Romberg N, Le Coz C, Glauzy S, Schickel JN, Trofa M, Nolan BE, et al. Patients with common variable immunodeficiency with autoimmune cytopenias exhibit hyperplastic yet inefficient germinal center responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(1):258–65.
 99. Roskin KM, Simchoni N, Liu Y, Lee J, Seo K, Hoh RA, et al. IgH sequences in common variable immune deficiency reveal altered B cell development and selection. *Sci Transl Med.* 2016;7(302):1–23.
 100. Van Schouwenburg PA, Jspeert HI, Pico-Knijnenburg I, Dalm VASH, Van Hagen PM, Van Zessen D, et al. Identification of CVID patients with defects

in immune repertoire formation or specification. *Front Immunol.* 2018;9(NOV):1–12.

101. Marega LF, Sabino JS, Pedroni MV, Teocchi M, Lanaro C, de Albuquerque DM, et al. Phenotypes of STAT3 gain-of-function variant related to disruptive regulation of CXCL8/STAT3, KIT/STAT3, and IL-2/CD25/Treg axes. *Immunol Res.* 2021;(0123456789).
102. Körholz J, Gabrielyan A, Sowerby JM, Boschann F, Chen L-S, Paul D, et al. One Gene, Many Facets: Multiple Immune Pathway Dysregulation in SOCS1 Haploinsufficiency. *Front Immunol.* 2021;12(August):1–11.
103. Afshar-Ghasemlou S, Esmail N, Sherkat R, Yazdani R, Abbasi-Rad F, Ganjalikhani-Hakemi M, et al. Increased IRF4 expression in isolated B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2019;47(1):52–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.09.005>
104. Farrokhi S, Abbasi-Rad F, Esmail N, Sherkat R, Yazdani R, Afshar-Ghasemlou S, et al. Increased Expression of B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1 (BLIMP1) in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2020;19(4):437–46.
105. ESID. Diagnostic criteria for PID [Internet]. Clinical Working Party. Available from: <https://esid.org/Working-Parties/Clinical-Working-Party/Resources/Diagnostic-criteria-for-PID2#Q6>

Anexo I

Diagnóstico diferencial de hipogammaglobulinemia (105)

- Inducida por drogas
 - Agentes antimalaria
 - Captopril
 - Carbamazepina
 - Glucocorticoides
 - Fenclofenaco
 - Sales de oro
 - Penicilamina
 - Fenitoína
 - Sulfasalazina
- Desordenes genéticos
 - Ataxia telangiectasia
 - Formas autosómicas de inmunodeficiencia combinada severa (SCID)
 - Síndrome de hiper IgM (HIGM)
 - Deficiencia de transcobalamina II e hipogammaglobulinemia
 - Agammaglobulinemia ligada al X (XLA)
 - Desorden linfoproliferativo ligado al X (asociado con el virus de Epstein-Barr, EBV)
 - Inmunodeficiencia combinada severa (SCID) ligado al X
 - Algunos trastornos metabólicos
 - Anomalías cromosómicas
 - Síndrome cromosómico 18q-
 - Monosomía 22
 - Trisomía 8
 - Trisomía 21
- Enfermedades infecciosas
 - Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)
 - Rubéola congénita
 - Infección congénita con citomegalovirus (CMV)
 - Infección congénita con *Toxoplasma gondii*
 - Virus de Epstein-Barr (EBV)
- Malignidades
 - Leucemia linfocítica crónica
 - Inmunodeficiencia con timoma
 - Linfoma no Hodgkin
 - Malignidad de células B
- Desordenes sistémicos
 - Inmunodeficiencia causada por hipercatabolismo de inmunoglobulinas
 - Inmunodeficiencia causada por pérdida excesiva de inmunoglobulinas (nefrosis, quemaduras severas, linfangiectasia, diarrea severa)

Anexo 2

Datos clínicos del cálculo del score

Tabla 17. Score desglosado

No Paciente	Score	Sinusitis		Neumonía				Bronquiectasias				Otra patología pulmonar		Grugía pulmón	
		Ausente (0)	Presente (1)	Ausente (0)	1 vez (1)	2 veces (2)	más 2 veces (3)	Ausente (0)	1 lóbulo (1)	2 lóbulos (2)	más 2 veces (3)	Ausente (0)	Presente (3)	Ausente (0)	Realizado (3)
1	5	0				2		0				0		0	
2	6	0		0				0				0		0	
3	3	0				2		0				0		0	
4	8	0			1			0					3	0	
5	3		1	0				0				0		0	
6	4		1		1			0				0		0	
7	6		1	0				0				0		0	
8	3		1		1				1			0		0	
9	8		1			2			1				3	0	
10	6	0		0				0				0		0	
11	5		1		1				1			0		0	
12	7		1			2		0				0		0	
13	9		1				3	0					3	0	
14	1	0		0				0				0		0	
15	8		1		1				1			0		0	
16	21		1			2				2			3	0	
17	3		1			2		0				0		0	
18	4		1		1			0				0		0	
19	4	0		0					1			0		0	
20	4		1		1			0				0		0	
21	7		1			2					3	0		0	
22	5	0				2		0				0		0	
23	4		1				3	0				0		0	
24	3	0				2			1			0		0	
25	13		1				3				3		3	0	
26	17		1		1			0				0		0	
27	11		1			2					3	0		0	
28	15		1				3	0					3	0	
29	7		1			2					3	0		0	
30	1	0			1			0				0		0	
31	8		1		1			0				0		0	
32	5		1	0				0				0		0	
33	3	0		0				0				0		0	
34	16		1			2					3		3	0	
35	4		1	0				0				0		0	
36	3		1	0				0				0		0	
37	10		1	0					1			0		0	
38	5		1	0					1			0		0	
39	2	0		0				0				0		0	
40	6	0					3		1			0		0	
41	9		1	0					1				3	0	
42	2	0		0				0				0		0	
43	6	0		0				0					3	0	

Tabla 18. Continuación de score desglosado

No Paciente	Score	Esplenomegalia				Esplenectomía		Linfadenopatías				Enteropatía			
		Ausente (0)	11-14.5 cm (1)	15-20 cm (2)	más 20 cm (3)	Ausente (0)	Realizado (3)	Ausente (0)	menos 2 cm (1)	2-3 cm (2)	más 3 cm (3)	Ausente (0)	Intermitente (1)	Crónica (2)	Severa (3)
1	3				3	0		0				0			
2	6	0				0					3	0			
3	1	0				0		0					1		
4	4	0				0			1			0			
5	2	0				0				2		0			
6	2	0				0		0					1		
7	5	0				0		0						2	
8	0	0				0		0				0			
9	1	0				0		0					1		
10	6				3	0		0				0			
11	2	0				0			1				1		
12	4		1			0		0				0			
13	2	0				0		0						2	
14	1	0				0		0				0			
15	5				3	0			1			0			
16	13		1			0				2				2	
17	0	0				0		0				0			
18	2	0				0		0						2	
19	3	0				0		0						2	
20	2	0				0		0						2	
21	1	0				0			1			0			
22	3	0				0			1				1		
23	0	0				0		0				0			
24	0	0				0		0				0			
25	3	0				0			1			0			
26	15				3		3		1			0			
27	5		1			0				2		0			
28	8		1			0			1			0			
29	1	0				0			1			0			
30	0	0				0		0				0			
31	6			2		0			1			0			
32	4	0				0			1			0			
33	3	0				0		0				0			
34	7		1			0			1					2	
35	3	0				0		0				0			
36	2	0				0		0						2	
37	8			2		0			1			0			
38	3	0				0			1				1		
39	2		1			0		0				0			
40	2	0				0		0						2	
41	4	0				0		0					1		
42	2	0				0		0					1		
43	3	0				0		0				0			

Tabla 19. Continuación de score desglosado 2

No Paciente	Score	Enfermedades autoinmunes			Otras complicaciones reumatológicas como atralgias			Granulomas			Linfoma		Cáncer (tumor sólido)		
		Ausente (0)	Sospecha (1)	Confirmado (3)	Ausente (0)	Sospecha (1)	Confirmado (3)	Ausente (0)	Sólo piel (1)	Pulmón, hígado, bazo (2)	SNC, ojo (3)	Ausente (0)	Presente (3)	Ausente (0)	Presente (3)
1	0	0			0			0				0		0	
2	3			3	0			0				0		0	
3	0	0			0			0				0		0	
4	3			3	0			0				0		0	
5	0	0			0			0				0		0	
6	1		1		0			0				0		0	
7	3			3	0			0				0		0	
8	0	0			0			0				0		0	
9	0	0			0			0				0		0	
10	3			3	0			0				0		0	
11	0	0			0			0				0		0	
12	3			3	0			0				0		0	
13	0	0			0			0				0		0	
14	1	0			0				1			0		0	
15	1		1		0			0				0		0	
16	8			3	0					2		0			3
17	0	0			0			0				0		0	
18	0	0			0			0				0		0	
19	1		1		0			0				0		0	
20	0	0			0			0				0		0	
21	0	0			0			0				0		0	
22	1	0				1		0				0		0	
23	0	0			0			0				0		0	
24	0	0			0			0				0		0	
25	2	0				1			1			0		0	
26	8	0			0					2			3		3
27	2	0			0					2		0		0	
28	6			3			3	0				0		0	
29	0	0			0			0				0		0	
30	0	0			0			0				0		0	
31	3			3	0			0				0		0	
32	3			3	0			0				0		0	
33	3			3	0			0				0		0	
34	3			3	0			0				0		0	
35	3			3	0			0				0		0	
36	0	0			0			0				0		0	
37	5			3	0					2		0		0	
38	1	0				1		0				0		0	
39	1		1		0			0				0		0	
40	0	0			0			0				0		0	
41	3			3	0			0				0		0	
42	1		1		0			0				0		0	
43	3			3	0			0				0		0	

Anexo 3

Análisis de la cohorte 3 agrupada de acuerdo con la clasificación de Freiburg

Tabla 20. Resultados clínicos de la cohorte de pacientes a la cual se le realizó la determinación de inmunoglobulinas, al clasificarlo de acuerdo con su porcentaje de células B de memoria.

	IDCV	IDCV grupo 1	IDCV grupo 2	IDCV grupo 1 vs IDCV grupo 2 p-value
Número de pacientes	22	13	9	
Sexo (femenino/masculino)	15/7	9/4	6/3	
Edad (media±SD)	29.9±5.1	26.1±9.5	35.3±19.1	
Manifestaciones clínicas (número de casos (%))				
Neumonía	17 (77.3)	12 (92.3)	5 (55.6)	<0.0001
Sinusitis	14 (63.6)	9 (69.2)	5 (55.6)	0.0793
Bronquiectasias	7 (31.8)	5 (38.5)	2 (22.2)	0.0036
Esplenomegalia	8 (36.4)	6 (46.2)	2 (22.2)	<0.0001
Linfadenopatías	12 (54.5)	7 (53.8)	5 (55.6)	0.8870
Granulomas	4 (18.2)	4 (30.8)	0 (0.0)	<0.0001
Enteropatías	7 (31.8)	4 (30.8)	3 (33.3)	0.8796
Enfermedades autoinmunes	10 (45.5)	6 (46.2)	4 (44.4)	0.8870
Cáncer (tumores sólidos)	2 (9.1)	2 (15.4)	0 (0.0)	<0.0001
Score de gravedad (media±SD)	7.5±5.1	8.3±5.8	6.2±3.8	0.4186
Niveles de inmunoglobulinas mg/dL (media)				
IgG	230.9	230.7	206.3	0.9864
IgA	27.8	30.4	15.4	0.7285
IgM	38.5	18.1	67.9	0.2135

Tabla 21. Resultados de poblaciones y subpoblaciones leucocitarias de la cohorte de pacientes a la cual se le determinaron inmunoglobulinas, al clasificarlos por su porcentaje de células B de memoria

	Media de números absolutos de células (cél/mm ³ ±SD)	Media de porcentajes (%±SD)	Media de porcentajes IDCV Grupo 1 (%±SD)	Media de porcentajes IDCV grupo 2 (%±SD)	IDCV grupo 1 vs IDCV grupo 2 p-value
Poblaciones de leucocitos					
Leucocitos totales	7737±4016				
Poblaciones de linfocitos					
Linfocitos totales	1869±1509	25.0±12.9	22.4±11.2	28.9±14.7	0.2994
Linfocitos B CD19+	222±268	13.1±9.7	10.2±9.3	17.3±9.1	0.0786
Subpoblaciones de células B					
Células B naive IgD+CD27-CD19+	179±254	70.4±20.0	75.8±17.5	62.7±21.9	0.2018
Células B sin cambio de isotipo IgD+ CD27+CD19+	16±19	9.7±10.1	7.7±7.6	12.4±12.9	0.3833
Células B con cambio de isotipo IgD-CD27+CD19+	11±10	9.1±10.8	6.4±9.8	12.9±11.5	0.0615
Células B transicionales CD38+CD24+CD19+	15±26	5.6±9.5	7.2±11.9	3.1±2.5	0.8079
Plasmablastos CD38+CD24-CD19+	1±3	0.6±0.7	0.4±0.6	0.8±0.8	0.1670
Células B CD21 ^{bajo} CD38-CD21 ^{bajo} CD19+	21±25	5.8±18.3	16.8±16.7	14.3±21.4	0.3830
Células B dobles negativas CD19+ CD27- IgD-	12±9	9.0±6.6	8.8±6.8	9.3±6.8	0.8825

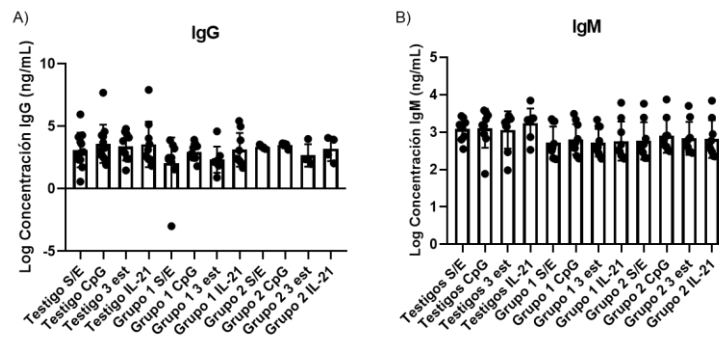


Figura 30. Resultados de la cuantificación de anticuerpos. Comparación de las concentraciones de inmunoglobulinas entre pacientes clasificados por su porcentaje de células B de memoria y testigos en las distintas condiciones. A) IgG. B) IgM

Anexo 4

Preparación de reactivos

- Medio RPMI suplementado

Suero fetal bovino	10 mL
Estreptomicina 1000µg/mL	1 mL
Penicilina 1000µg/mL	1 mL
Glutamina 2mM	1 mL
Antimicótico	1 mL
Aminoácidos no esenciales	1 mL
Piruvato	1 mL
2-mercaptoetanol	100 µL
RPMI cbp	100 mL

- PBS 10x

NaCl	80g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	29 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O bidestilada cbp	1000 mL
pH	7.4

Filtrado con membrana de 22 µm y diluido a 1x antes de utilizar

- Solución fijadora 1%

Paraformaldehído 37%	3.7 mL
PBS cbp	100 mL

- Solución de Turk

Ácido acético glacial	3.0 mL
H ₂ O bidestilada cbp	100 mL
Azul de metileno	2 gotas

- Solución fijadora 16%

- PBA
- Solución de SFB 8%

Suero Fetal Bovino descomplementado	0.8 mL
PBS cbp	10 mL

- Solución SFB 2%

Solución SFB 8%	1 mL
PBS cbp	4 mL

- Buffer de carbonatos

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
H ₂ O bidestilada cbp	1000 mL
pH	9.8

- Solución de lavado de ELISA

Tween 20	0.5 mL
PBS cbp	1000 mL

- Solución de bloqueo de ELISA

Leche	5 g
Tween 20	0.05 mL
PBS cbp	100 mL

- Buffer citrato fosfato

Na ₂ HPO ₄ 0.2 M	25.7 mL
Ác. Cítrico 0.1 M	23.4 mL
H ₂ O bidestilada cbp	100 mL
pH	5.0

- Fosfato ácido de sodio 0.2 M

Na ₂ HPO ₄	28.4 g
H ₂ O bidestilada cbp	1000 mL
pH	5.0

- Ácido cítrico 0.1 M

Ác. cítrico	19.2 g
H ₂ O bidestilada cbp	1000 mL
pH	5.0

- Solución de revelado

OPD	4 mg
H ₂ O ₂ 30%	4 µL
Buffer citrato-fosfato cbp	10 mL

- H₂SO₄ 2M

H ₂ SO ₄ 97%	11 mL
H ₂ O bidestilada cbp	100 mL

- Solución de bloqueo de ELISpot

Suero fetal bovino descomplementado	1 mL
PBS cbp	10 mL

Anexo 5

Fenotipificación celular

A continuación se detallan los análisis realizados para determinar las poblaciones y subpoblaciones leucocitarias, la identificación de poblaciones celulares se realizó mediante la tinción de CD14 y CD45, esta tinción permite identificar y linfocitos (CD45⁺⁺ CD14⁻), para este análisis se comienza con CD45 y granularidad (SSC), se selecciona la región donde se concentre la mayor cantidad de células, posteriormente se analiza CD45 y CD14 como se muestra en la figura 31, esto para poder identificar las distintas poblaciones celulares.

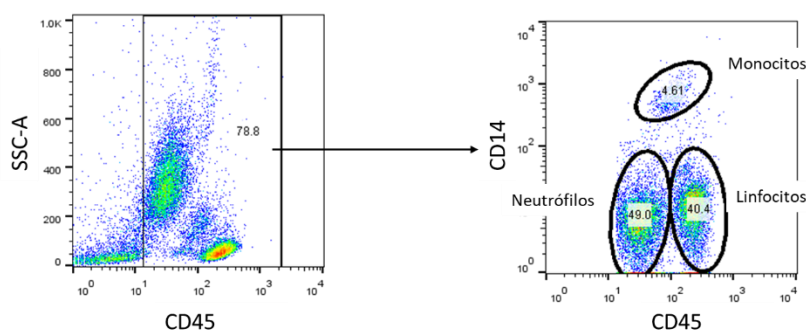


Figura 31. Población de linfocitos. Análisis de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica. Se emplea la siguiente mezcla de anticuerpos antiCD45 FITC, antiCD14 APC.

Para la determinación de los porcentajes de células B se empleó el siguiente análisis, se comenzó con CD45 y SSC, se seleccionó la población de linfocitos (CD45⁺ SSC⁻), posteriormente se analizó CD3 y CD19, la población CD19⁺ CD3⁻ corresponde a las células B, como se muestra en la figura 32.

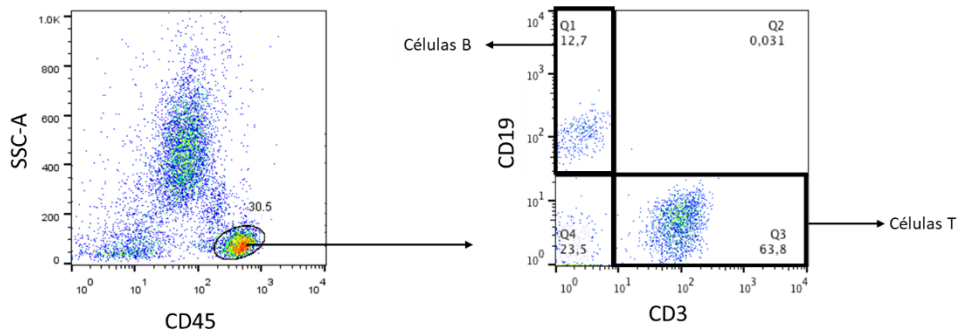


Figura 32. Poblaciones de células B. Análisis de la población de células B en sangre periférica. Se emplea la siguiente mezcla de anticuerpos antiCD45 PerCP, antiCD3 FITC y antiCD19 PE.

Además, se fenotipificaron las subpoblaciones de células B, para ello se seleccionó la región de células que expresa CD19 APC y mediante la combinación de los marcadores IgD y CD27 se identificó a las células B naive (IgD+ CD27-), las células de memoria sin cambio de isotipo (IgD+ CD27+), las de memoria con cambio de isotipo (IgD- CD27+) y las dobles negativas (IgD- CD27-) como se muestra en la figura 33.

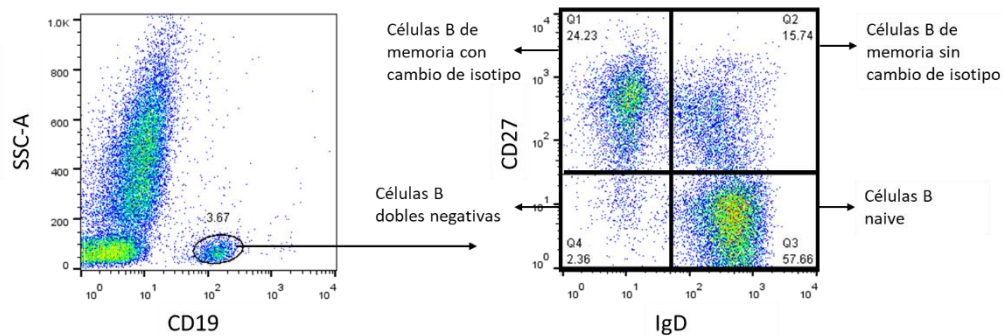


Figura 33. Subpoblaciones de células B de memoria, naive y dobles negativas. Análisis de las subpoblaciones de células B de memoria en sangre periférica. Se emplea la siguiente mezcla de anticuerpos antiCD19 APC, antiCD27 PE y antiIgD FITC.

A partir de las células B (CD19+) también se identificaron las células transicionales (CD38^{high} CD24^{high}), que están en un estado más inmaduro. A partir de células de memoria con cambio de isotipo se pudieron distinguir los plasmablastos (CD38⁺⁺ CD24⁻), que están en un estadio de maduración previo a las células plasmáticas, esto se muestra en la figura 34.

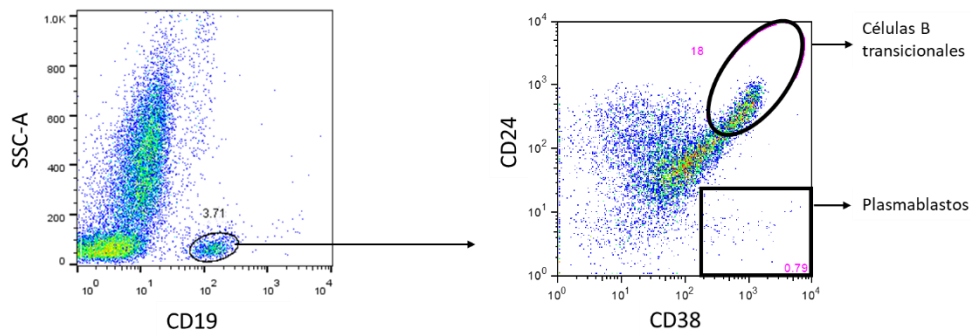


Figura 34. Subpoblaciones de células B transicionales y plasmablastos. Análisis de las subpoblaciones de células B transicionales y plasmablastos. Se emplea la siguiente mezcla de anticuerpos antiCD19 APC, antiCD24 PE y antiCD38 FITC.

A partir de CD21^{bajo} y con los marcadores CD21 y CD38 se pudo discernir entre las células activadas (CD21^{bajo} CD38⁻) y las transicionales inmaduras como se muestra en la figura 35.

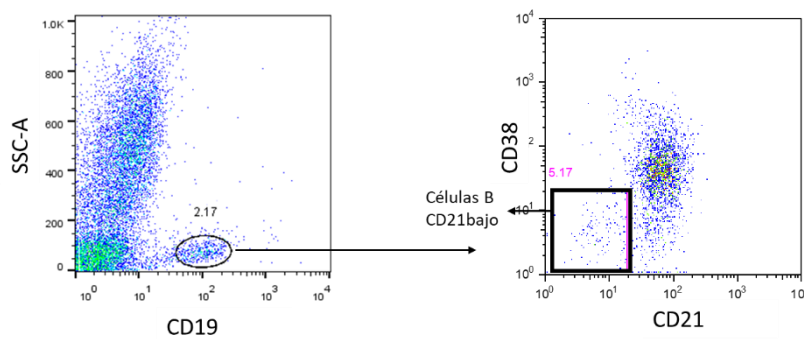
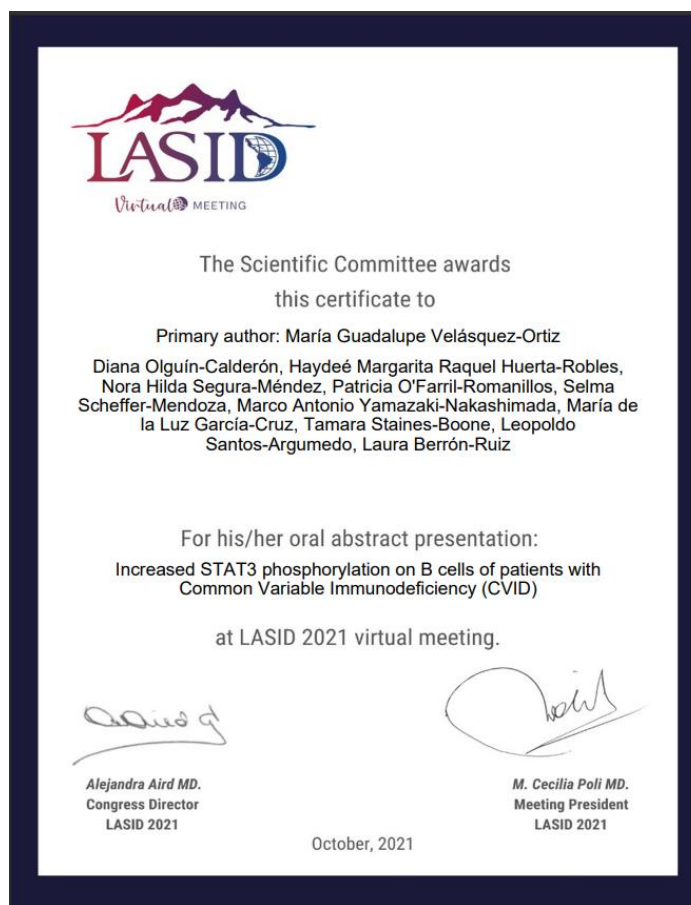


Figura 35. Subpoblaciones de células B CD21 bajo. Análisis de las subpoblaciones de células B CD21^{bajo} en sangre periférica. Se emplea la siguiente mezcla de anticuerpos antiCD19 APC, antiCD21 PE y antiCD38 FITC.

Anexo 6

Difusión del trabajo en congresos y artículo publicado





Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Research article

Atypical patterns of STAT3 phosphorylation in subpopulations B cells in patients with common variable immunodeficiency

Diana Olguin-Calderón^{a,1}, Ma. Guadalupe Velásquez-Ortiz^{b,1}, H. M. Raquel Huerta-Robles^c, Gabriela López-Herrera^c, Nora H. Segura-Méndez^{d,2}, Patricia O'Farrill-Romanillos^d, Selma Scheffler-Mendoza^e, Marco A. Yamazaki-Nakashimada^e, Ma. Lourdes García-Cruz^f, Sara E. Espinosa-Padilla^c, Tamara A. Staines-Boone^g, Leopoldo Santos-Argumedo^a, Laura Berrón-Ruiz^{c,*}

^aDepartamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV IPN, Ciudad de México, Mexico

^bPosgrado en Ciencias Biológicas UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico

^cLaboratorio de Inmunodeficiencias, Instituto Nacional de Pediatría SSA, Ciudad de México, Mexico

^dServicio de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI, IMSS, Mexico

^eServicio de Inmunología y Alergia, Instituto Nacional de Pediatría SSA, Ciudad de México, Mexico

^fDepartamento de Otorrinolaringología, INER, Ciudad de México, Mexico

^gServicio de Alta Especialidad, Centro Médico Noreste IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2021

Revised 9 January 2022

Accepted 24 January 2022

Available online xxxx

Keywords:

CVID

STAT3

IL-21

B cell

ABSTRACT

Background: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disorder characterized by defective B cell differentiation and antibody production. Interleukin (IL)-21 activates STAT3, a potent regulator of B cell differentiation into plasma cells. We have studied the phosphorylation of STAT3 in CVID patients and its contribution to B cells subsets.

Methods: We studied 23 CVID patients and 14 healthy donors (HD), determining pSTAT3 in naïve and memory B cells, stimulated with IL-21 at 15 and 60 min.

Results: pSTAT3 was increased in total ($p = 0.044$), naïve ($p = 0.023$), and memory ($p = 0.001$) B cells at 60 min in CVID patients compared with HD. We classified patients by the percentage of isotype-switched memory B cells. We observed an increase in pSTAT3 at 60 min in memory B cells in both CVID groups of patients ($p = 0.026$, $p = 0.007$, respectively). Interestingly, the analysis of each group individually; demonstrated that patients with decreased memory B cells exhibited an increase in pSTAT3 at 60 min ($p = 0.023$), while HD had an expected decrease in pSTAT3 ($p = 0.045$).

Conclusion: CVID patients showed an increased atypical of pSTAT3, which could affect the differentiation of B cells. Further studies in the IL-21 pathway are necessary to understand how this alteration could promote differentiation defects in patient B cells.

© 2022 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; IVIG, Intravenous Immunoglobulin G; PMBC, Peripheral Blood Mononuclear Cell; MFI, Mean Fluorescence Intensity; JAK3, Janus Kinase 3; Blimp-1, B lymphocyte-induced maturation protein-1; SOCS3, Suppressor of cytokine signaling 3; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; ERK, Extracellular signal regulated kinase; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase; AKT, Protein Kinase B; γ c, Common Gamma Chain.

* Corresponding author.

E-mail address: lberronruiz@yahoo.com.mx (L. Berrón-Ruiz).

¹ These authors contribute equally to this work.

² Segura-Méndez Nora H, MD, Rest in Peace, June, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.01.013>

0198-8859/© 2022 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the second most frequent primary immunodeficiency in humans. Heterogeneous clinical and immunologic manifestations characterize CVID. The patients have low serum antibody concentrations, increased susceptibility to respiratory infections, and inadequate vaccine response. Patients may also experience a wide variety of clinical complications, including autoimmunity, inflammation, and malignancy [1,2].

Have been described many immunological defects in CVID, including alterations in the frequency of T cells and functions

[3,4]. The most critical cellular defect in CVID patients is severe B cell deficiency, which leads to hypogammaglobulinemia. In B cells, the early and late differentiation stage may be affected, resulting in the defective formation of memory B cells and long-lived plasma cells (PC) [5,6]. Accordingly, patients have been classified depending on naïve, non-switched, and switched memory B cell numbers [7–9].

Interleukin 21 (IL-21), mainly produced by activated follicular T cells, promotes B cell differentiation more efficiently than IL-4 or IL-10 [10,11]. Several studies suggest that the signaling pathway activated by IL-21 requires STAT3 for the generation of long-lived plasma cells and T cell-dependent antigen responses and memory [12]. Furthermore, IL-21 has been recognized as a potent PC differentiation factor for human B cells [13]. Plasma cells express IL-21 receptor (IL-21R) and respond to IL-21, increasing their survival by activating STAT3 [14].

The importance of IL-21 on immune-regulation has been validated by the recent identification of IL-21R deficiency in humans, who exhibit infectious susceptibility to several pathogens [15]. The IL-21 activates STAT3 and MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways [11,16]. Recently, three potential gain-of-function mutations in *STAT3* have been identified among CVID patients. Interestingly, these patients have also presented autoimmunity, lymphoproliferation, and a decrease in switched memory B cells [17]. These findings lead us to investigate the role of IL-21/STAT3 in human B cell differentiation.

This study aimed to investigate if there were differences in STAT3 phosphorylation in naïve (CD27⁻) or memory (CD27⁺) B cells that accounted for the deficiencies previously described in CVID patients. These patients were classified according to their percentage of switched memory B cells.

2. Patients and methods

2.1. Patients

23 Patients with a diagnosis of CVID, based on the standard criteria suggested by the European Society for Immunodeficiency ESID and Pan-American group for Immunodeficiency (PAGID), were recruited after reading, accepting, and signing an informed consent letter. Briefly, CVID patients showed hypogammaglobulinemia and variable numbers of B cells (>2%), with the exclusion of other well-known, single gene defects [18].

All patients were receiving IVIG replacement therapy every 21 days at 400–600 mg/kg/dose. Peripheral blood samples were obtained before IVIG infusion in patients who were not suffering from any severe infection.

The local ethics committee approved this study (registration number 26/2016 (INP)). The study was conducted according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

2.2. Data collection

The questionnaire was completed for each patient to collect information such as demographic data, clinical manifestations, immunologic findings. We evaluated all patients based on frequency of isotype-switched memory B cells and select two groups. A group with NMB (normal numbers of memory B cells) comprising eight patients with an average percentage of isotype-switched memory B cells (>0.4% of the total lymphocyte population). Furthermore, another group DMB (diminished numbers of memory B cells), including 15 patients with an isotype-switched memory B cell <0.4% of the total lymphocyte population; as described by Warnatz K and coll [9]. The clinical severity of the disease was assessed by a CVID severity score, suggested by Mokhtar et al.

[19]. This score of clinical severity provides a numerical fact to the clinical manifestations; and it was used to be able to correlate the clinical manifestations with the phenotypic findings of the patients.

2.3. Flow cytometry

2.3.1. Lymphocyte population and subpopulation phenotyping:

We performed flow cytometric analysis of controls and CVID patients before IVIG infusion to assess the different populations and subpopulations of lymphocytes. Lymphocyte populations were enumerated in whole-blood samples from blood with anticoagulant (Acid Citrate/Dextrose BD Vacutainer[®]) and stained with the following mixtures of monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD45-FITC/anti-CD14-PE, anti-CD3-FITC/anti-CD19-PE/anti-CD45-PerCP, anti-CD4-FITC/anti-CD8-PE/anti-CD3-PerCP, anti-CD3-FITC/anti-CD19-PE/anti-CD45-PerCP, and anti-CD3-FITC/anti-CD16 + 56PE/anti-CD45-PerCP. The following antibodies were used to detect naïve (CD45RA⁺) and memory (CD45RO⁺) T cells: anti-CD45-RO-FITC/anti-CD45-RO-PE/anti-CD3-PerCP/anti-CD4-APC. In addition, γ 1-FITC/ γ 2-PE/anti-CD45-PerCP were used for isotype controls. All antibodies were purchased from BD Biosciences, San Diego, CA, USA. Samples were incubated for 20 min at room temperature in the dark. After incubation, erythrocytes were lysed by suspending the cells in 500 μ l FACS lysing solution (BD Biosciences) for 10 min. Cells were then washed with PBA (1% bovine serum albumin in PBS) and fixed using 1% formalin in PBS. To identify B cell populations, PBMC were isolated from blood with anticoagulant, using density gradient centrifugation with Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Isolated PBMCs were then stained with a mixture of anti-CD19-APC/anti-IgD-FITC/anti-CD27-PE, anti-CD19-FITC/anti-CD21-PE/anti-CD38-APC, and anti-CD19-FITC/anti-CD24-PE/anti-CD38-APC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA); samples were incubated for 20 min at room temperature in the dark. Next, the samples were washed using PBA and fixed in PBS containing 1% formalin.

2.3.2. Intracellular staining to evaluate phosphorylation in tyrosine residue (pY705) of STAT3 (pSTAT3).

To evaluate pSTAT3, the cells were stained 30 min with anti-CD19 APC and anti-CD27 FITC and then washed with phosphate buffer saline (PBS). PBMCs were stimulated with human recombinant IL-21 (80 ng/ml) for 15 and 60 min, and controls of unstimulated cells were incubated under similar conditions. The cells were fixed with formaldehyde solution for 10 min and washed with PBS with bovine serum albumin (PBA). After that, the cells were permeabilized with cold methanol for 30 min and washed with PBA, followed by 1 hr of intracellular staining with anti-STAT3 (y705)-PE (Becton Dickinson). Non-specific intracellular staining was evaluated with PE-labeled mouse IgG2a monoclonal antibody (Becton Dickinson) as isotype control. Healthy donor samples were used in every assay as control of kinetic pattern. Unstimulated condition has been included to show phosphorylation value to verify unspecific active by technical processes. pSTAT3 median fluorescence intensity (MFI) was measured in previously gated CD19⁺ CD27⁻ and CD19⁺ CD27⁺ B cells. Flow cytometry was performed on Arias1[®] (BD, San Jose, CA). The data were transformed to logarithm base 10, and the cells were analyzed using FlowJo 8.8 software (TreeStar[®], Ashland, OR).

2.4. Statistical analysis

Fisher's exact test was used to evaluate classified variables to demonstrate independence from clinical parameters and U Mann-Whitney to immunological phenotypes. All pSTAT3 MFI data were transformed to logarithm base 10 (Supplementary Table 1

and 2). Statistical significance was calculated with unpaired two-tailed Student's *t*-test, one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Scheffe post-hoc test for multiple comparisons (between groups), employing IBM SPSS Statistics 25 software. The association between two variables was determined by Pearson's correlation (R squared), using GraphPad Prism v8.0.1, correlations were validated by calculating statistical power ($1-\beta \geq 0.8$), employing GPower 3.1.9.7. The results are expressed as mean and standard deviation. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical, demographic, and immunologic characteristics of CVID patients.

A total of 23 CVID patients, including eight males and 15 females, were enrolled in the study. The mean age at the time of study was 28 ± 17 . The most common phenotype was infectious processes leading to pneumonia (74%), followed by sinusitis (61%) and enteropathies (52%). The group NMB had a higher percentage of pneumonia cases than group DMB, with a significant difference ($p = 0.0341$). The group DMB had more inflammatory complications, autoimmune diseases, and malignant processes of solid tumors. This group had a high percentage of splenomegaly (27%), granulomas (13%), autoimmune diseases (40%), and cancer (25%). All have a significant difference compared to group NMB ($p = 0.0208$, $p = 0.0002$, $p = 0.0001$, $p = 0.0001$, respectively).

The mean clinical severity score of CVID in this study group was 5.6. The assessed clinical severity in groups NMB (4.2) and DMB (6.4); was higher in group DMB, but there was no significant difference.

In serum immunoglobulin levels, both CVID groups lack significant differences. Within the immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes, only group NMB patients had significantly higher absolute numbers of B cells than group DMB ($p = 0.0337$). Other immunologic characteristics for patients in group DMB were a reduced percentage of not switched memory B cells and switched B cells compared with NMB ($p = 0.013$, $p = 0.0106$, respectively). As was expected, the percentage of naïve B cells in the DMB group was increased in frequency compared to NMB ($p = 0.0347$). Demographic, clinical manifestations, and immunophenotype are summarized in Table 1.

3.2. Defective STAT3 phosphorylation (pSTAT3) in total, naïve and memory B cells from CVID patients.

We examined pSTAT3 (y705) levels in total (CD19 +), naïve (CD19 + CD27-) and memory B cells (CD19 + CD27 +) stimulated with IL-21 by flow cytometry (Fig. 1). Patient cells were compared with healthy controls. In both, pSTAT3 levels peaked around 15 min and gradually decreased toward baseline at 60 min.

We evaluated the contribution of the IL-21 stimulus at 15 and 60 min, measuring pSTAT3 in total, naïve, and memory B cells. At 15 min, IL-21 induced higher levels of pSTAT3 in every B cell subset from both HD and CVID patients, and there are no significant differences (Supplementary Table 3). At 60 min, CVID patients increased pSTAT3, while HD returned to their baseline state as expected. Therefore, significant differences in total, naïve, and memory B cell populations are observed ($p = 0.044$, $p = 0.023$, $p = 0.001$; respectively) (Fig. 2 a, b, and c).

3.3. Different patterns of pSTAT3 in CVID patients classified by memory B cell percentages.

The patients were divided into two groups; the group NMB which comprised eight patients, and the group DMB, which included 15 patients. Patients with undetectable memory B cells were excluded for analysis. Multiple comparisons among groups were applied regarding stimulation time. In total and naïve B cells, no significant differences were found between the CVID groups and HD analyzed in both times (Fig. 3 a and b). In healthy donors, there are significant differences in log of MFI pSTAT3 between stimulation with IL-21 at 15 and 60 min in memory B cells, as expected ($p = 0.045$) (Fig. 3 c, circle dots 15 min vs 60 min). NMB and DMB patients (Fig. 3, triangle dots and square dots, respectively) did not show significant difference in pSTAT3 in unstimulated and 15 and 60 min in total or naïve B cells. However, at 60 min, both groups maintained high pSTAT3 and did not return to their basal level compared with HD. ($p = 0.026$, $p = 0.007$) (fig, 3c 60 min). Interestingly, memory B cells of DMB patients exhibit an opposite pattern, compared to healthy donors, with a significant difference between non-stimulated cells and cells stimulated 60 min with IL-21 ($p = 0.0023$,) (Fig. 3 c, square dots N/S vs 60 min).

3.4. Atypical pSTAT3 increase in DMB group at 60 min after stimulation with IL-21 positively correlates with a score of clinical severity.

We did a correlation analysis to evaluate pSTAT3 and its association with populations and subpopulations of lymphocytes and clinical severity score. From this analysis, the correlation in all patients, as in grouped NMB and BMD, are shown in Supplementary Fig. 1.

The most exciting correlation with significant differences was the association between the log MFI of pSTAT3 in DMB, in total B cells, naïve and memory at 60 min of stimulation with IL-21 with clinical severity score. In the group of DMB patients, the increase in STAT3 phosphorylation was directly proportional to a high clinical severity score ($r = 0.6815$, $p = 0.0073$; $r = 0.6527$, $p = 0.0114$; $r = 0.7341$, $p = 0.0156$, respectively) (Fig. 4 b, d, f); while in the patients of the NMB group, there was no correlation in these parameters (Fig. 4 a, c, e).

4. Discussion

The pathogenesis of CVID is not well known despite multiple investigation efforts. It's both clinical diversity and heterogeneous cellular phenotype shown are the main factors that make difficult the study of this immunological disease. Nevertheless, a common defect observed in CVID patients is abnormal antibody production. Since the first description of CVID, the function of B cell has been studied in search of understanding its participation in this immunodeficiency.

The proper activation of B cells induces the differentiation of naïve B cells into memory B cells, to allow a rapid and efficient response during immune reaction [20]. In the last few years, several studies have been demonstrated signaling defects in a diversity of immune cells in CVID patients, including the B cell receptor (BCR), cell-mediated signaling [21], the Toll-like receptor pathway, and other molecules associated to signaling through tumor necrosis factor (TNF) family receptor [22–24].

The IL-21 was described for the first time in 2000 by Parrish-Novak et al. and Ozaki et al. [25,26] as a key cytokine for B cell expansion in secondary lymphoid organs. Furthermore, the normal memory B cell development depends on media conditions, being the IL-21 one of the most important signals to induce memory of

Table 1
Clinical and Immunologic features of total CVID patients and grouped by memory B cells frequency.

	Total CVID	CVID group NMB memory B cells > 0.4%*	CVID group DMB memory B cells < 0.4%**	CVID group NMB vs. CVID group DMB p-value***
Number	23	8	15	
Sex (female/male)	15/8	6/2	9/6	
Age (mean ± SD)	27,86 ± 16,69	30,13 ± 17,93	26,5 ± 16,48	0,6460
<i>Clinical manifestations (number of cases (%))</i>				
Pneumonia	17 (74)	6 (75)	9 (60)	0,0341
Sinusitis	14 (61)	5 (63)	9 (60)	0,1722
Bronchiectasis	6 (26)	2 (25)	4 (27)	0,872
Splenomegaly	5 (22)	1 (13)	4 (27)	0,0208
Lymphadenopathy	7 (30)	2 (25)	5 (33)	0,2753
Granulomas	2 (9)	0 (0)	2 (13)	0,0002
Enteropathies	12 (52)	4 (50)	8 (53)	0,7773
Autoimmune diseases	6 (26)	0 (0)	6 (40)	0,0001
Cancer (solid tumors)	2 (9)	0 (0)	2 (25)	0,0001
Severity score (mean ± SD)	5,636 ± 4,0	4,25 ± 2,3	6,429 ± 4,6	0,176
<i>Immunoglobulin levels mg/dL (means ± SD)</i>				
IgG	281 ± 160,9	244,4 ± 143,4	301,9 ± 171,6	0,4334
IgA	31,65 ± 68,43	19,73 ± 33,55	32,04 ± 59,41	0,5341
IgM	81,89 ± 136,4	101 ± 132,7	71,15 ± 142,1	0,3219
<i>Leukocytes populations (absolute cells count means/ mm³ ± SD)</i>				
Total leukocytes	7381 ± 3613	7589 ± 2537	7270 ± 4154	0,8221
<i>Lymphocytes populations (absolute cells count means/ mm³ ± SD)</i>				
Total lymphocytes	1943 ± 1375	2273 ± 1369	1768 ± 1393	0,3918
T lymphocytes CD3+	1467 ± 1066	1677 ± 1093	1355 ± 1073	0,6813
T lymphocytes CD4+	668,8 ± 707,9	859,5 ± 907,3	567 ± 586,6	0,2132
T lymphocytes CD8+	737,1 ± 719,1	728,7 ± 748,7	741,6 ± 729,5	0,5910
NK lymphocytes CD16 + 56+	222,5 ± 270,3	302 ± 404,9	180 ± 165,3	0,6355
B lymphocytes CD19+	184,3 ± 154,1	283,2 ± 171,6	131,5 ± 118,5	0,0337
<i>T CD4 + cell subpopulations (percentage means)</i>				
T lymphocytes CD4 + CD45RA+	19,30 ± 20,24	23,88 ± 24,32	16,25 ± 17,48	0,5826
T lymphocytes CD4 + CD45RO+	61,55 ± 28,40	55,13 ± 29,78	65,8 ± 27,91	0,4324
<i>B cells subpopulations (percentage means)</i>				
Naive B cells IgD + CD27- CD19+	72,65 ± 18,97	61,88 ± 18,77	78,4 ± 16,96	0,0347
Not-switched B cells IgD + CD27 + CD19+	10 ± 11,78	16 ± 13,74	6,81 ± 9,60	0,013
Switched B cells IgD- CD27 + CD19+	7,27 ± 8,70	11,13 ± 6,51	5,22 ± 9,21	0,0106
Transitional B cells CD38 + CD24 + CD19+	8,21 ± 10,65	2,3 ± 2,17	10,48 ± 11,79	0,0768
CD21 low B cells CD38- CD21lowCD19+	15,07 ± 19,17	16,30 ± 29,58	14,72 ± 16,40	0,1791

*Represented patients contain an isotype-switched memory B cell fraction of above 0.4% of total lymphocytes. ** Represented patients containing an isotype-switched memory B cell fraction of below 0.4% of total lymphocytes. Fisher exact test were used to analyzed clinical manifestations and U Mann-Whitney to immunological phenotypes. *** P-value significant at the level < 0.05.

B cells. Also, it has been demonstrated that IL-21 is a crucial cytokine for establishing, maintaining, and regulating antibody responses in mice and human B cells [27,28]. Several studies have revealed that several cytokines activating STAT3, predominantly IL-21, are critical mediators of human B cells in humoral immune responses [11].

The abnormal signaling through IL-21R/ γ c / JAK-3 / STAT3 pathway has been associated with the deficient response of specific antibodies subsequent to vaccination and a defective memory B cell establishment in diseases related to inborn errors of immunity [29]. Moreover, increased susceptibility to infections by capsulated bacteria has been also related to IL-21R/ γ c / JAK-3 / STAT3 axis, as showed by patients diagnosed with hyper-IgE syndrome, X-linked forms and JAK3 related deficiencies in severe combined immunodeficiency, loss of function mutations in IL-21 receptor gene and mutations of function gain in STAT3 protein [30–32]. The IL-21/STAT3 axis is essential in developing B cells, but this mechanism in CVID patients has been little studied.

According to the mentioned background, we support the hypothesis that deficient development of B cells in CVID is related to unsuitable immune responses IL-21-activated, focusing on phosphorylation of STAT3 protein with recombinant IL-21 stimulation.

In compliance with our experimental design in which the determination of STAT3 phosphorylation at three different moments,

without stimuli, 15 min, and 60 min for the purpose of evaluating how patients B cells performance activation in total B cells, naïve and memory; and if phosphorylation has a normal pattern as healthy donors or atypical, whether increased or diminished. In the first instance, the results exhibit differences between healthy donors and the total patients, regardless of B cell subpopulations groups, at 60 min in all three B cell subsets studied. Patient STAT3 phosphorylation has been increased when should decline.

Following these findings, patients were classified according to memory B cell frequencies; in which patients with low percentages in memory B cells were within the group susceptible with autoimmune processes (40%); meanwhile, the patient's group with normal frequencies of memory B cells have not autoimmune manifestations. Both groups showed statistical differences compared with healthy donors, with pSTAT3 increase at 60 min in memory B cells only.

In addition, patients with a low percentage of memory B cells indicate a significant difference between pSTAT3 without stimuli and pSTAT3 at 60 min, with increased phosphorylation when should decline to basal levels as in healthy donors at 60 min. The patient group with normal percentages of memory B cells rises STAT3 phosphorylation at 15 min and 60 min does not decrease as it should. although in this group there was no significant difference in the three times

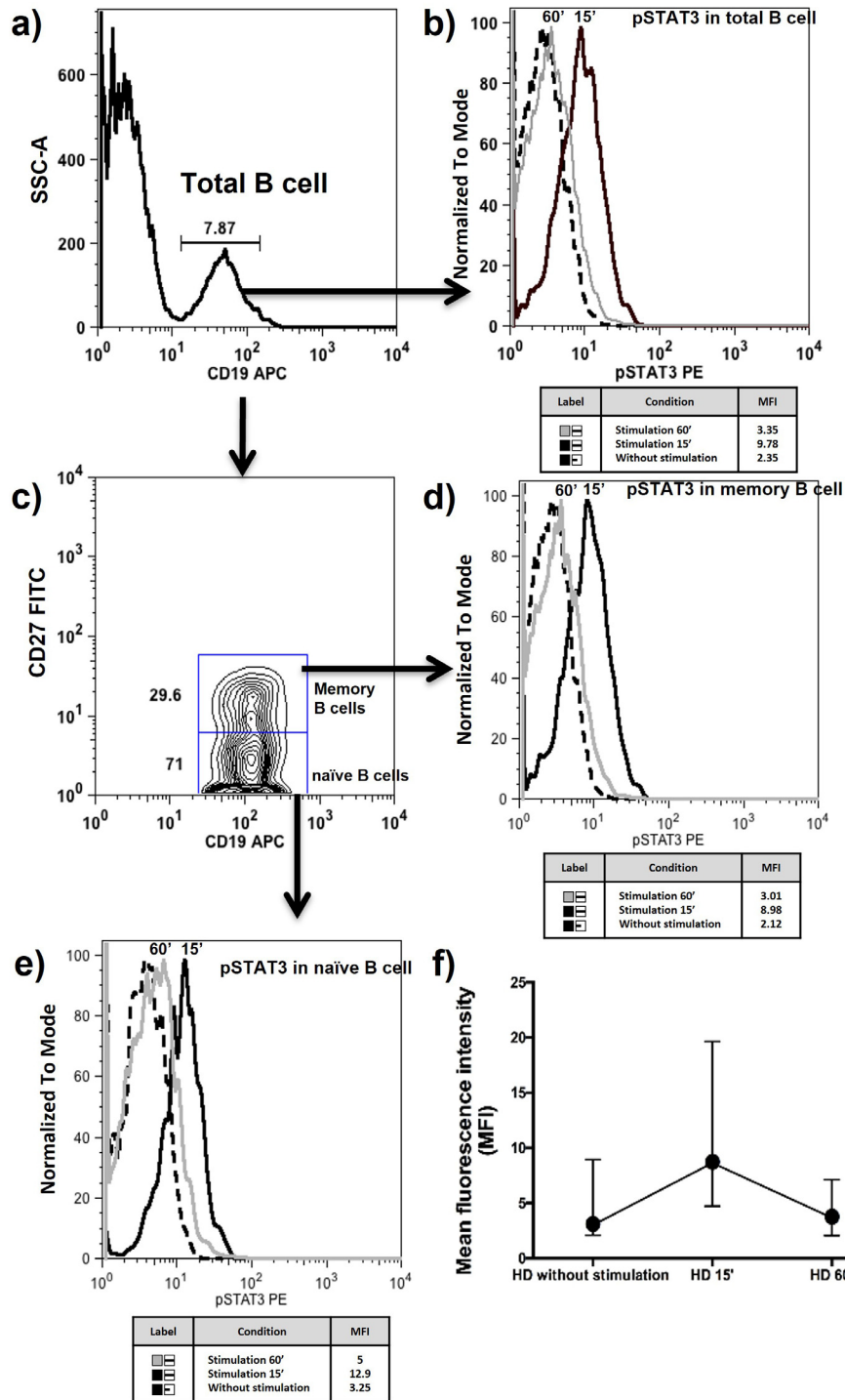


Fig. 1. Analysis STAT3 phosphorylation (pSTAT3) in B cells peripheral blood by flow cytometry. a) CD19 + B cells were gated within the lymphocytes side- and forward-scatter region. b) pSTAT3 in MFI in total B cells. c) Using CD27 expression, the B cells can be subdivided into naïve and memory B cells. d) pSTAT3 in MFI in memory B cells. Histograms are representative of independent experiments of unstimulated (long dashes histograms) or 15' (gray histograms) and 60' IL-21 stimulated (black histograms) pSTAT3 levels. f) Demonstration of pSTAT3 in healthy donors (n = 14) unstimulated, 15' and 60' stimulated with IL-21 in total B cells only. ● Represent median with interquartile range.

Our results strongly support that there is clearly an activation defect within IL-21/STAT3 pathway and is reflected as an atypical pattern in STAT3 phosphorylation, mainly in memory B cells at 60 min after stimulation with recombinant IL-21. Similar results have been reported in several research works, Clemente A and collaborators concluded that the detected pSTAT3 increase in B cells of CVID patients and the reduced expression of memory B cells

in these patients could be due to the susceptibility of these cells to die by apoptosis [33,34]. Even though techniques and stimuli were not similar as used by our study, observations obtained exhibit the same defects within the IL-21/STAT3 signaling pathway in CVID patients.

Furthermore, our patient cohort with CVID is characterized by a high frequency of inflammatory or autoimmune processes;

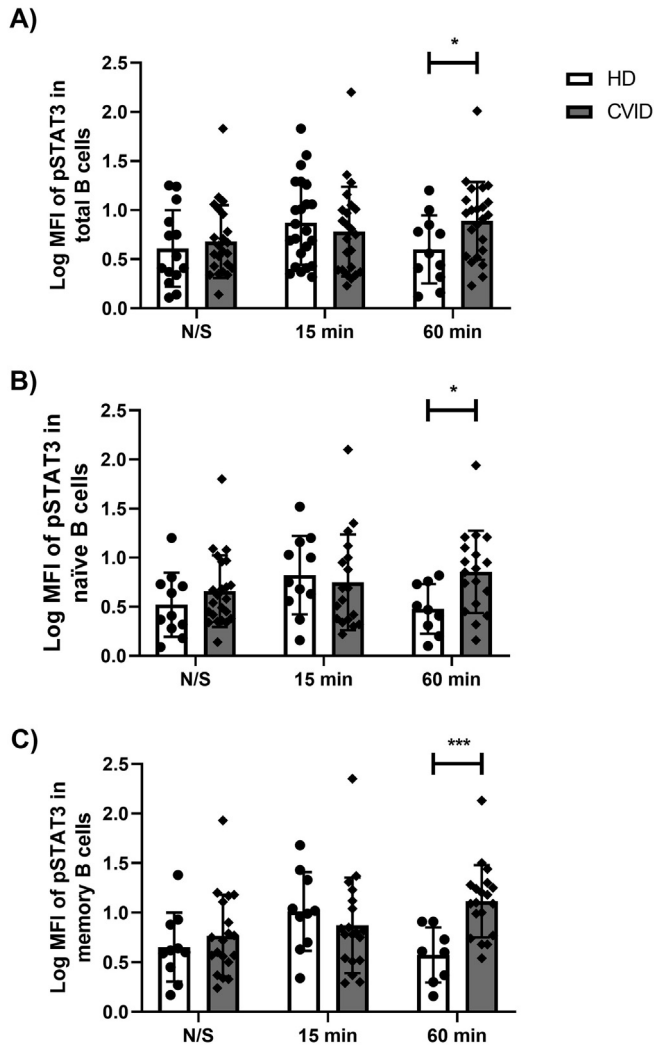


Fig. 2. Comparison of pSTAT3 MFI in B cell subsets between HD and total CVID patients. STAT3 phosphorylation (pSTAT3) were detected by flow cytometry on CD19 + total B cells, CD27- naive B cells, and CD27 + memory B cells of HD (n = 14) and CVID patients (n = 23) in unstimulated cells or stimulated cells at 15 and 60 min with IL-21. Some patients with CVID did not present detectable memory B cells, for that reason the number of samples in the analysis changed. Data is displayed as Log10 of MFI of pSTAT3. (A) pSTAT3 in CD19 + B cells of CVID patients (n = 23) compared CD19 + B cells of HD (n = 14) at 15 min and 60 min (HD; n = 13 and n = 11, respectively). (B) pSTAT3 in CD27- naive B cells of CVID patients (n = 23) compared CD27- naive B cells of HD at 15 min and 60 min (HD; n = 11 and n = 9, respectively). (C) pSTAT3 in CD27 + memory B cells of CVID patients (n = 19) compared CD27 + memory B cells of HD at 15 min and 60 min (HD; n = 10 and n = 8, respectively). Data are given as means and standard deviation. Statistical differences between patients and HD were compared using unpaired two-tailed Student's *t*-test. (*) Significant, *p* = 0.05; (**) very significant, *p* = 0.01; and (***) highly significant, *p* = 0.001. HD = Healthy Donors; CVID = Common Variable Immunodeficiency; MFI = mean fluorescent intensity.

autoimmune diseases (26%), splenomegaly (22%), granuloma (9%), and lymphadenopathy (30%). In recent years, evidence has been accumulated of the key participation of IL-21 in autoimmune diseases, allergies, and inflammatory disorders [35]. Among these functions, a relevant role of this interleukin in the autoimmunity context is to participate as a major regulator of proliferation and differentiation of B cells and antibody secreted cells [28]. Rasmussen T.K. and collaborates demonstrated that patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) have a reduction of STAT3 phosphorylation in T cells CD4 + after IL-21 stimulation and high levels of SOCS1 compared to healthy donors [36]. On the other

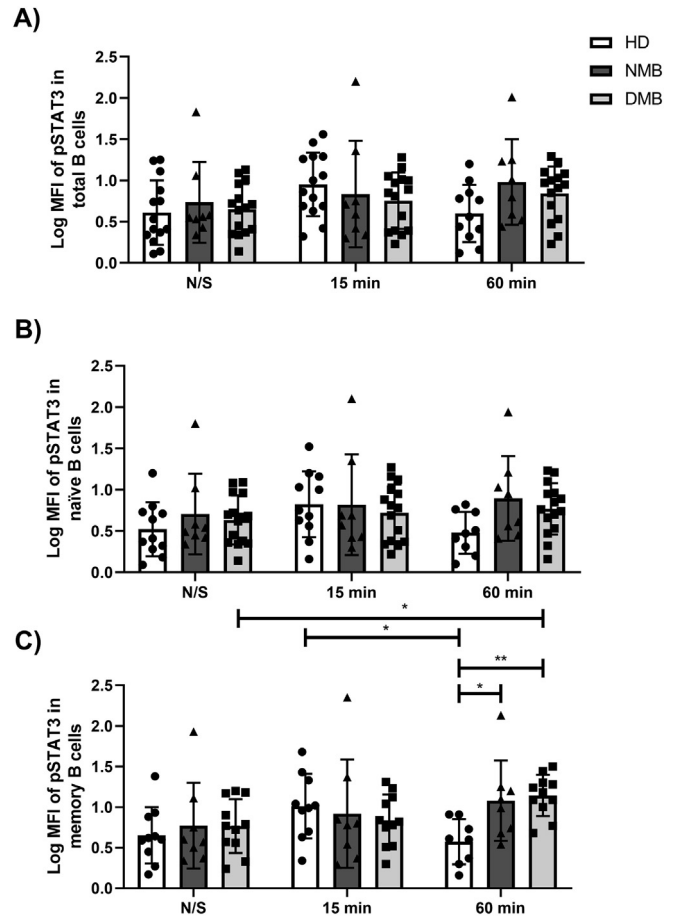


Fig. 3. Comparison of Log pSTAT3 MFI in unstimulated and stimulated B cells subsets between HD and CVID subgroups. Log10 MFI of pSTAT3 were detected by flow cytometry on CD19 + CD27 + memory B cells of healthy donors (n = 14) and CVID subgroups, classified according to memory B cell percentages as NMB (n = 8) (>0.4% of the total lymphocyte population) and DMB (n = 15) (<0.4% of the total lymphocyte population). Comparison of Log10 MFI of pSTAT3 are shown in unstimulated cells or stimulated cells at 15 and 60 min with IL-21. (A) pSTAT3 in CD19 + B cells of total CVID patients (n = 23) or classified in NMB (n = 8) and DMB (n = 15), compared CD19 + B cells of HD (n = 14) at 15 min and 60 min (HD; n = 13 and n = 11, respectively) (B) pSTAT3 in CD27- naive B cells of total CVID patients (n = 23) or classified NMB (n = 8) and DMB (n = 15), compared CD27- naive B cells of HD at 15 min and 60 min (HD; n = 11 and n = 9, respectively). (C) pSTAT3 in CD27 + memory B cells of total CVID patients (n = 19) or classified NMB (n = 8) and DMB (n = 11), compared CD27 + memory B cells of HD at 15 min and 60 min (HD; n = 10 and n = 8, respectively). Data are given as means and standard deviation. Statistical differences between patients and HD were compared using ANOVA followed by Scheffe post-hoc test for multiple comparisons (between groups).(*) Significant, *p* = 0.05; (**) very significant, *p* = 0.01; and (***) highly significant, *p* = 0.001. HD = Healthy Donors; CVID = Common Variable Immunodeficiency; MFI = mean fluorescent intensity.

hand, Huang X and collaborates observed high levels of total STAT3 and phosphorylated STAT3 in T cells CD4+ as well after stimulation with other activators of the STAT3 axis, like IL-6 or IL-10 [37].

More recently, Lemarquis A.L. et al. determined that the IgA selective deficiency (sIgAD) has defects in B cells responses, whether T dependent or T independent; moreover, those results indicate a reduction of STAT3 phosphorylation induced for IL-21 in B cells of patients with sIgAD. The conclusion that reached is that the diminish of pSTAT3 could represent an aberrant germinal center formation or an interruption in its development [38]. Despite the limited work about STAT3 in B cells, it could be concluded that the defect is related to an effector B cell, such as memory B cell or plasma cell. We supposed that differences in response

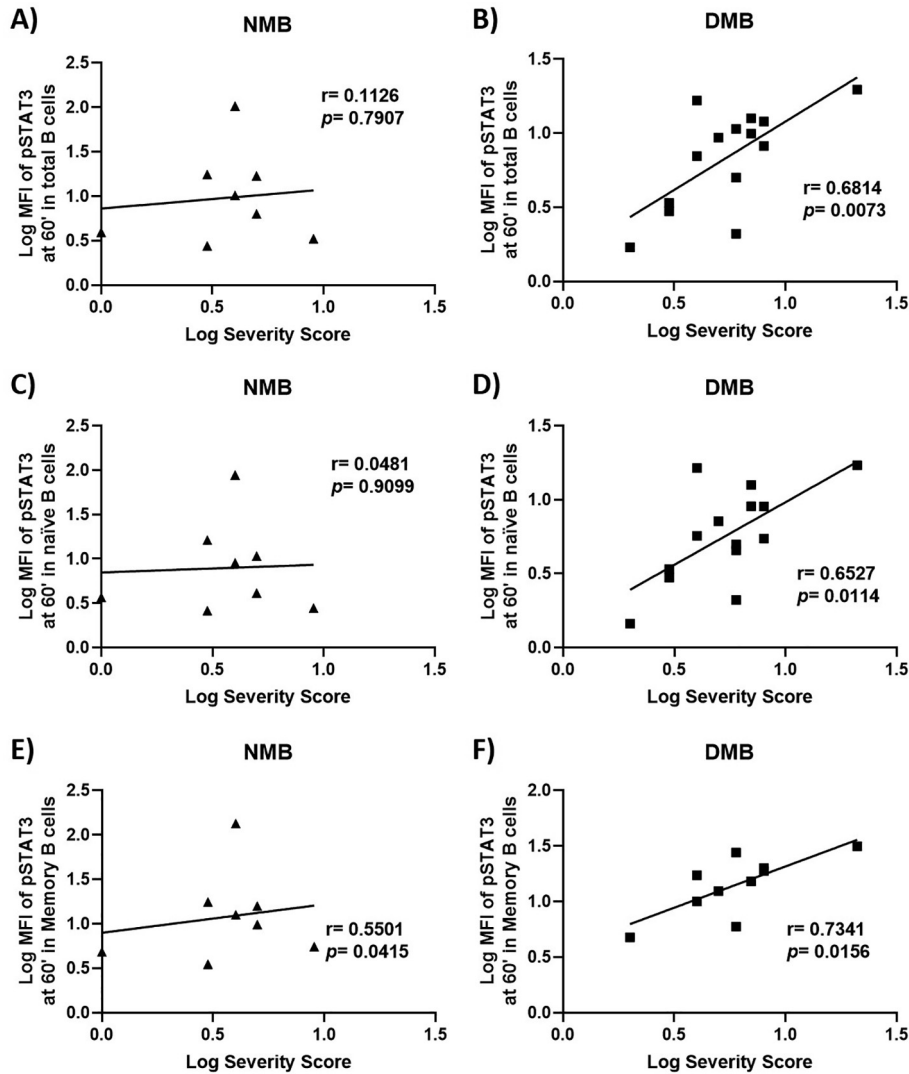


Fig. 4. STAT3 phosphorylation of B cell subpopulations at 60' correlates with disease severity score in the DMB subgroup. pSTAT3 was detected by flow cytometry on CD19 + total B cells, CD27- naïve B cells, and CD27 + memory B cells of CVID subgroups, NMB, and DMB at 60' post-stimulation with IL-21. Data is displayed as Log₁₀ MFI of pSTAT3. (A, C and E) Correlation between Log₁₀ MFI of pSTAT3 after 60' post-IL-21 stimulation and disease Log₁₀ severity score of total (n = 8), naïve (n = 8), and memory B cells (n = 8) of NMB subgroup, respectively. (B, D, and F) Correlation between Log₁₀ MFI of pSTAT3 after 60' post-IL-21 stimulation and disease Log₁₀ severity score of total (n = 14), naïve (n = 14), and memory B cells (n = 9) of DMB subgroup, respectively. In all graphs, calculated Pearson's correlation (r) and p values are shown. Statistical significance p < 0.05. NMB = Normal Memory B cells; DMB = Diminished Memory B cells; MFI = mean fluorescent intensity.

capacity observed in CVID are downstream activation of the IL-21 receptor, which highlights the potential role of IL-21 and STAT3 in antibody deficiency. These could be also related to TLR-9 defects observed in CVID. It has been demonstrated that a CpG and IL-21 co-stimulation improve STAT3 phosphorylation in human B cells [39,40].

Among our findings, we describe a correlation between the severity of clinical manifestations with a high percentage of STAT3 phosphorylation in memory B cells. Meanwhile, the predomination of respiratory infections is increasing; many patients of CVID also have other noninfectious complications as splenomegaly and autoimmune diseases highly related to mortality. For this reason, the clinical severity score has elevated levels due to inflammatory and autoimmune processes. Furthermore, correlating an increase of STAT3 phosphorylation with a higher clinical severity score could affirm that the pSTAT3 atypical pattern indicates CVID patients with severe clinical manifestations such as inflammatory and autoimmune diseases.

Recently, it has been demonstrated that the induction capacity of human B cell differentiation is a consequence of altered signal-

ing via IL-21R/STAT3 about humoral immunity. Supporting this fact, there exist patients with genetic variants that impact within the axis; those mutations reveal mechanisms of action, which in future days will serve to develop new treatment strategies [41]. According to our findings, we suggest that defects in cell signaling, presented as atypical patterns in STAT3 phosphorylation, could be one of the causes of disease, allowing defective memory B cells and plasma cell differentiation. Thus, this alteration could contribute to hypogammaglobulinemia and inflammatory processes in CVID patients. Although is needed to perform a deeper study of involved molecules in this pathway, such as Blimp-1, SOCS3, IL-21R, etc., to understand the way defects participate in IL-21R/STAT3 axis in CVID patients.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

M.G. Velásquez-Ortiz and D. Olguín-Calderón are DSc. students who received a doctoral scholarship from CONACyT, México. This work was partially supported by the (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) (CONACyT, México) [grant CB # 256471] and the Fundación Mexicana para los Niños con Inmunodeficiencia Primaria (FUNEMI, A.C.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.01.013>.

References

- [1] C. Cunningham-Rundles, P.J. Maglione, Common variable immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (5) (2012) 1425–1426.e3, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.025>.
- [2] C. Cunningham-rundles, C. Bodian, Common variable immunodeficiency : clinical and immunological features of 248 patients, *Clin. Immunol.* 92 (1999) 34–48.
- [3] A. Giovannetti, M. Pierdominici, F. Mazzetta, M. Marziali, C. Renzi, A.M. Mileo, M. De Felice, B. Mora, A. Esposito, R. Carello, A. Pizzuti, M.G. Paggi, R. Paganelli, W. Malorni, F. Aiuti, Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency, *J. Immunol.* 178 (6) (2007) 3932–3943, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3932>.
- [4] N. Kutukculer, E. Azarsiz, G. Aksu, N.E. Karaca, CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells, Th1 (CCR5, IL-2, IFN- γ) and Th2 (CCR4, IL-4, IL-13) type chemokine receptors and intracellular cytokines in children with common variable immunodeficiency, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 29 (2) (2016) 241–251, <https://doi.org/10.1177/0394632015617064>.
- [5] K. Agematsu, S. Hokibara, H. Nagumo, A. Komiya, CD27: A memory B-cell marker, *Immunol. Today.* 21 (5) (2000) 204–206, [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01605-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01605-4).
- [6] Q. Pan-Hammarström, H. Abolhassani, L. Hammarström, Defects in plasma cell differentiation are associated with primary immunodeficiency in human subjects, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (4) (2018) 1217–1219, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.025>.
- [7] C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt, B. Ferry, T. Witte, E. Eren, M. Hernandez, D. Detkova, P.R. Bos, G. Poerksen, H. Von Bernuth, U. Baumann, S. Goldacker, S. Gutenberger, M. Schlesier, F. Bergeron-van, D. Cruyssen, M. Le Garff, P. Debré, R. Jacobs, J. Jones, E. Bateman, P.M. Van Hagen, A. Plebani, R.E. Schmidt, V. Thon, T. Espanol, A.D. Webster, H. Chapel, M. Vihinen, E. Oksenhendler, H. Peter, K. Warnatz, C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt, B. Ferry, T. Witte, E. Eren, M. Vlkova, M. Hernandez, D. Detkova, P.R. Bos, G. Poerksen, H. Von Bernuth, U. Baumann, S. Goldacker, S. Gutenberger, M. Schlesier, F.B. Der Cruyssen, M. Le Garff, R. Jacobs, J. Jones, E. Bateman, J. Litzman, P.M. Van Hagen, A. Plebani, R.E. Schmidt, V. Thon, I. Quinti, T. Espanol, A.D. Webster, H. Chapel, M. Vihinen, E. Oksenhendler, H.H. Peter, K. Warnatz, The EUROclass trial : defining subgroups in common variable immunodeficiency, *Blood* (2012) 77–85, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-091744>.
- [8] B. Piqueras, L. Galicier, F.B.D.E.R. Cruyssen, Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B Cell memory differentiation correlates with clinical aspects, *J. Clin. Immunol.* 23 (2003) 385–400.
- [9] K. Warnatz, A. Denz, R. Dräger, M. Braun, C. Groth, G. Wolff-Vorbeck, H. Eibel, M. Schlesier, H.H. Peter, 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.* 99 (2002) 1544–1551, <https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1544>.
- [10] E.K. Deenick, S.J. Pelham, A. Kane, C.S. Ma, Signal transducer and activator of transcription 3 control of human T and B cell responses, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00168>.
- [11] D.T. Avery, E.K. Deenick, C.S. Ma, S. Suryani, N. Simpson, G.Y. Chew, T.D. Chan, U. Palendira, J. Bustamante, S. Boisson-Dupuis, S. Choo, K.E. Bleasel, J. Peake, C. King, M.A. French, D. Engelhardt, S. Al-Hajjar, S. Al-Muhsen, K. Magdorf, J. Roessler, P.D. Arkwright, P. Hissaria, D.S. Riminton, M. Wong, R. Brink, D.A. Fulcher, J.L. Casanova, M.C. Cook, S.G. Tangye, B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 155–171, <https://doi.org/10.1084/jem.20091706>.
- [12] M. Croce, V. Rigo, S. Ferrini, IL-21: A pleiotropic cytokine with potential applications in Oncology, *J. Immunol. Res.* 2015 (2015) 1–15, <https://doi.org/10.1155/2015/696578>.
- [13] R. Ettinger, G.P. Sims, A.-M. Fairhurst, R. Robbins, Y.S. da Silva, R. Spolski, W.J. Leonard, P.E. Lipsky, IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells, *J. Immunol.* 175 (12) (2005) 7867–7879, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7867>.
- [14] B. Rodríguez-Bayona, A. Ramos-Amaya, J. Bernal, A. Campos-Caro, J.A. Brieva, Cutting edge: IL-21 derived from human follicular helper T cells acts as a survival factor for secondary lymphoid organ, but not for bone marrow, plasma cells, *J. Immunol.* 188 (4) (2012) 1578–1581, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102786>.
- [15] D. Kotlarz, N. Ziętara, J.D. Milner, C. Klein, Human IL-21 and IL-21R deficiencies: Two novel entities of primary immunodeficiency, *Curr. Opin. Pediatr.* 26 (2014) 704–712, <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000160>.
- [16] H. Asao, C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, K. Sugamura, Cutting edge: The common γ -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex, *J. Immunol.* 167 (1) (2001) 1–5, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.1>.
- [17] P. Maffucci, C.A. Filion, B. Boisson, Y. Itan, L. Shang, J.L. Casanova, C. Cunningham-Rundles, Genetic diagnosis using whole exome sequencing in common variable immunodeficiency, *Front. Immunol.* 7 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00220>.
- [18] M.E. Conley, Diagnostic guidelines - An international consensus document, *Clin. Immunol.* 93 (3) (1999) 189, <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4798>.
- [19] M. Mokhari, A. Shakeri, B. Mirminachi, H. Abolhassani, R. Yazdani, B. Grimbacher, A. Aghamohammadi, Important Factors influencing severity of common variable immunodeficiency, *Arch. Iran. Med.* 19 (2016) 544–550.
- [20] R. Yazdani, H. Abolhassani, N. Rezaei, G. Azizi, L. Hammarström, A. Aghamohammadi, Evaluation of known defective signaling-associated molecules in patients who primarily diagnosed as common variable immunodeficiency, *Int. Rev. Immunol.* 35 (1) (2016) 7–24, <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1136306>.
- [21] C. Foerster, N. Voelxen, M. Rakhmanov, B. Keller, S. Gutenberger, S. Goldacker, J. Thiel, S. Feske, H.-H. Peter, K. Warnatz, B Cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency, *J. Immunol.* 184 (12) (2010) 7305–7313, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000434>.
- [22] V. Thon, H.M. Wolf, M. Sasgary, J. Litzman, A. Samstag, I. Hauber, J. Lokaj, M.M. Eibl, Defective integration of activating signals derived from the T cell receptor (TCR) and costimulatory molecules in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of common variable immunodeficiency (CVID) patients, *Clin. Exp. Immunol.* 110 (1997) 174–181, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1997.tb08314.x>.
- [23] D. Escobar, J. Pons, A. Clemente, J. Iglesias, V. Regueiro, J.A. Bengoechea, N. Matamoros, J.M. Ferrer, Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae extracts in common variable immunodeficiency patients, *Cell. Immunol.* 262 (2) (2010) 105–111, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.01.002>.
- [24] L. del Pino Molina, J.M. Torres Canizales, O. Pernía, R. Rodríguez Pena, I. Ibanez de Caceres, E. López Granados, Defective Bcl-2 expression in memory B cells from common variable immunodeficiency patients, *Clin. Exp. Immunol.* 203 (3) (2021) 341–350, <https://doi.org/10.1111/cei.13522>.
- [25] J. Parrish-Novak, S.R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J.A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J.L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S.R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F.J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Raymond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R.D. Holly, D. Foster, Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function, *Nature.* 408 (6808) (2000) 57–63, <https://doi.org/10.1038/35040504>.
- [26] K. Ozaki, K. Kikly, D. Michalovich, P.R. Young, W.J. Leonard, Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 11439–11444, <https://doi.org/10.1073/pnas.200360997>.
- [27] W.J. Leonard, C.K. Wan, IL-21 Signaling in Immunity, *F1000Research.* 5 (2016) 1–10, <https://doi.org/10.12688/f1000research.7634.1>.
- [28] R. Ettinger, S. Kuchen, P.E. Lipsky, The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease, *Immunol. Rev.* 223 (2008) 60–86, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00631.x>.
- [29] M. Desjardins, B.D. Mazer, B-cell memory and primary immune deficiencies: Interleukin-21 related defects, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 13 (2013) 639–645, <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000009>.
- [30] M. Recher, L.J. Berglund, D.T. Avery, M.J. Cowan, A.R. Gennery, J.M. Smart, J. Peake, M. Wong, S.Y. Pai, S. Baxi, J.E. Walter, U. Palendira, G.A. Tangye, M. Rice, S. Brothers, W. Al-Herz, H. Oettgen, H. Eibel, J.M. Puck, F. Cattaneo, J.B. Ziegler, S. Giliani, S.G. Tangye, L.D. Notarangelo, IL-21 is the primary common gamma chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo, *Immunobiology.* 118 (2011) 6824–6835.
- [31] A.M. Miggelbrink, B.R. Logan, R.H. Buckley, R.E. Parrott, C.C. Dvorak, N. Kapoor, H. Abdel-Azim, S.E. Prockop, D. Shyr, H. Decaluwe, I.C. Hanson, A. Gillio, B.J. Dávila Saldaña, H. Eibel, G. Hopkins, J.E. Walter, J.S. Whangbo, D.B. Kohn, J.M. Puck, M.J. Cowan, L.M. Griffith, E. Haddad, R.J. O'Reilly, L.D. Notarangelo, S.Y. Pai, B-cell differentiation and IL-21 response in IL2RG/JAK3 SCID patients after hematopoietic stem cell transplantation, *Blood.* 131 (2018) 2967–2977, <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-809822>.
- [32] J.D. Milner, T.P. Vogel, L. Forbes, C.A. Ma, A. Stray-Pedersen, J.E. Niemela, J.J. Lyons, K.R. Engelhardt, Y. Zhang, N. Topcagic, E.D.O. Roberson, H. Matthews, J. W. Verbsky, T. Dasu, A. Vargas-Hernandez, N. Varghese, K.L. McClain, L.B. Karam, K. Nahmod, G. Makedonas, E.M. Mace, H.S. Sorte, G. Perminov, V. Konetni Rao, M.P. O'Connell, S. Price, H.C. Su, M. Butrick, J. McElwee, J.D. Hughes, J. Willet, D. Swan, Y. Xu, M. Santibanez-Koref, V. Slowik, D.L. Dinwiddie, C.E. Ciaccio, C.J. Saunders, S. Septer, S.F. Kingsmore, A.J. White, A.J. Cant, S. Hambleton, M.A. Cooper, Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations, *Blood* 125 (2015) 591–599, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-602763>.

- [33] A. Clemente, J. Pons, N. Lanio, V. Cunill, G. Frontera, C. Crespi, N. Matamoros, J. M. Ferrer, Increased STAT3 phosphorylation on CD27+ B-cells from common variable immunodeficiency disease patients, *Clin. Immunol.* 161 (2) (2015) 77–88, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.09.004>.
- [34] A. Clemente, J. Pons, N. Lanio, N. Matamoros, J.M. Ferrer, CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling, *Clin. Exp. Immunol.* 174 (2013) 97–108, <https://doi.org/10.1111/cei.12150>.
- [35] D. Long, Y. Chen, H. Wu, M. Zhao, Q. Lu, Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity, *J. Autoimmun.* 99 (2019) 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.01.013>.
- [36] T.K. Rasmussen, T. Andersen, R.O. Bak, G. Yiu, C.M. Sørensen, K. Stengaard-Pedersen, J.G. Mikkelsen, P.J. Utz, C.K. Holm, B. Deleuran, Overexpression of microRNA-155 increases IL-21 mediated STAT3 signaling and IL-21 production in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res. Ther.* 17 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0660-z>.
- [37] X. Huang, Y. Guo, C. Bao, N. Shen, P.T. Bozza, Multidimensional single cell based STAT phosphorylation profiling identifies a novel biosignature for evaluation of systemic lupus erythematosus activity, *PLoS One.* 6 (7) (2011) e21671, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021671>.
- [38] A.L. Lemarquis, F. Theodors, H.K. Einarsdottir, B.R. Ludviksson, Mapping of signaling pathways linked to slgAD reveals impaired IL-21 driven STAT3 B-cell activation, *Front. Immunol.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00403>.
- [39] A. Borzutzky, I. Rauter, A. Fried, R. Rachid, D.R. McDonald, L. Hammarstrom, B. Grimbacher, R.S. Abraham, R.S. Geha, Defective TLR9-driven STAT3 activation in B cells of patients with CVID, *Clin. Immunol.* 197 (2018) 40–44, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.08.008>.
- [40] B.-S. Liu, J.N. Stoop, T.W. Huizinga, R.E.M. Toes, IL-21 enhances the activity of the TLR–MyD88–STAT3 pathway but not the classical TLR–MyD88–NF-κB pathway in human B cells to boost antibody production, *J. Immunol.* 191 (8) (2013) 4086–4094, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300765>.
- [41] S.G. Tangye, C.S. Ma, Regulation of the germinal center and humoral immunity by interleukin-21, *J. Exp. Med.* 217 (2020), <https://doi.org/10.1084/jem.20191638>.