



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS B DOBLES
NEGATIVAS 1 (DN1) HUMANAS”**

PRESENTA:

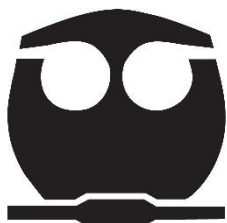
MANDUJANO LÓPEZ JORGE VLADIMIR

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LAURA BERRÓN RUÍZ

VOCAL: ALBERTO GARCÍA LOZANO

SECRETARIO: JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO

1er SUPLENTE: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

2do SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR
ZUBIRÁN”
RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN

ASESOR DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO

ASESOR TÉCNICO:

M. en C. RAÚL FERNANDO REYES HUERTA

SUSTENTANTE:

MANDUJANO LÓPEZ JORGE VLADIMIR

**Este proyecto recibió financiamiento del programa de proyectos UNAM-DGAPA-
PAPIIT [IN212122 e IN215424].**

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	1
Índice de figuras.....	3
Índice de tablas.....	3
Resumen.....	4
Antecedentes.....	5
Sistema inmune.....	5
Células B.....	5
Células B Dobles Negativas.....	7
Enfermedades autoinmunes y papel de células B.....	8
Lupus Eritematoso Generalizado.....	9
Antecedente directo.....	11
Justificación.....	12
Hipótesis.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos particulares.....	12
Material y métodos.....	13
Recolección de muestra.....	13
Citometría de flujo.....	14
Conteo celular.....	15
Análisis de datos.....	16
Resultados.....	17
1. Estrategia de análisis.....	17
2. Números absolutos y frecuencias de células DN1.....	19
3. Los números absolutos y frecuencias de las células DN1 correlacionan con la actividad de la enfermedad.....	20
Discusión.....	22
Conclusiones.....	26
Perspectivas.....	26
Referencias.....	27

Lista de abreviaturas

aNAV: Células Naïve activadas (activated Naive cells)

Anti-DNA_{dc}: Auto-anticuerpos anti-DNA de doble cadena

Anti-Sm: Auto-anticuerpos Smith

APCs: Células presentadoras de antígeno (Antigen Presenting Cells)

AR: Artritis reumatoide

ASC: Células secretoras de anticuerpos (Antibody Secreting Cells)

AVC: Accidente Cerebro Vascular

BSA: Albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumine)

C3: Fracción C3 del complemento.

C4: Fracción C4 del complemento.

Células NK: Células Natural Killer

DN: Dobles Negativas

DN1: Dobles Negativas 1

DN2: Dobles Negativas 2

DN3: Dobles Negativas 3

FMO: Fluorescencia Menos Uno

IFN- γ : Interferón gamma

IgD: Inmunoglobulina de clase D

IL-10: Interleucina 10

IL-18: Interleucina 18

IL-21: Interleucina 21

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

LEG: Lupus Eritematoso Generalizado

MZB: Células B de zona marginal (Marginal Zone B Cells)

NLR: Índice Neutrófilo/Linfocito (Neutrophil to Lymphocyte Ratio)

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS: Solución salina de fosfatos (Phosphate Buffered Saline Solution)

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptor)

rNAV: Células Naive en reposo (resting Naive cells)

SARS-COV-2: Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

SSC-A: Side Scatter-Area

SSC-H: Side Scatter-Height

SLEDAI: Índice de Actividad de la Enfermedad Lupus Eritematoso Generalizado (Systemic Lupus Eritematosus Disease Activity Index)

SWM: Células de memoria con cambio de isotipo (Switched memory cells)

TGF- β : Factor de crecimiento transformado beta (Transformed Growth Factor-beta)

TLR-7: Toll Like Receptor-7

Índice de figuras

Figura 1. Estrategia de análisis para la identificación de subpoblaciones de células B DN en PBMCs.....	17
Figura 2. Análisis comparativo de los números absolutos y frecuencias de células CD19+.....	19
Figura 3. Análisis comparativo de las frecuencias y números absolutos de células B DN1.....	20
Figura 4. Matriz de correlación entre números de células B DN1 y variables clínicas.....	21

Índice de tablas

Tabla 1. Relación de descriptores y puntuación en el SLEDAI.....	10
Tabla 2. Características clínicas/laboratorio de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado.....	13
Tabla 3. Fenotipo de subpoblaciones de células B.....	18

Caracterización de células B dobles negativo 1 (DN1) humanas.

Resumen

La expansión de células B dobles negativas (DN) que carecen de los marcadores de superficie IgD y CD27, es característica de algunos padecimientos como enfermedades virales y autoinmunes. Hasta ahora, se han realizado pocos estudios con el objetivo de identificar el papel de estas células y sus subclasificaciones (divididas por su expresión de CD11c y CD21 en DN1, DN2 y DN3). Por esto, se recolectaron muestras de donadores sanos y de pacientes diagnosticados con Lupus Eritematoso Generalizado, los cuales se clasificaron en activos o en remisión (inactivos). Con el diseño y aplicación de un panel de citometría de flujo para identificar las subpoblaciones de células B y concretamente la subpoblación de células B DN1, se demostró un cambio en la frecuencia de estas células, de tal suerte que los pacientes activos tienden a una baja en la frecuencia de células B DN1 en comparación a los pacientes en remisión y estos últimos tienen una frecuencia más alta comparada con los donadores sanos.

Del mismo modo, en este estudio se estableció una correlación entre estos números con el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI) y con el marcador de inflamación, NLR, en el cual se observa para ambos casos una correlación negativa estadísticamente significativa.

Antecedentes

a. Sistema inmune.

Para defenderse de patógenos, el cuerpo humano cuenta con mecanismos que se han estudiado, identificado y clasificado a través de los años. En la inmunología se cuenta, entonces, con una forma de catalogar la respuesta inmune según diferentes criterios, dando lugar a dos grupos: inmunidad innata y adaptativa (Turvey & Broide, 2010).

La inmunidad innata se conforma de barreras físicas como lo son piel, mucosas y secreciones; y de células capaces de reconocer de forma inmediata patrones conservados de patógenos, los cuales no están presentes en el organismo. Las células involucradas en este proceso son: células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y células NK. Adicionalmente, se cuenta con el sistema del complemento y con receptores de reconocimiento de patrones, denominados PRRs. Esta respuesta se caracteriza por ser “rápida” en la cual, en cuestión de minutos después de exponerse al patógeno, se inicia una respuesta inflamatoria (Turvey & Broide, 2010).

Por otra parte, la inmunidad adaptativa, que corresponde a una segunda línea de defensa, es una respuesta que tarda un poco más en darse: de 4 a 7 días después de la exposición, pero es altamente específica tras la primera exposición al patógeno (Cooper & Alder, 2006). Esta respuesta se ha clasificado de acuerdo con el mecanismo que la involucran. De este modo los linfocitos T componen la inmunidad celular, mientras que los anticuerpos producidos por los linfocitos B componen la respuesta humoral (Boehm & Swann, 2014; Farber et al., 2016).

b. Células B.

Se han identificado diferentes funciones de las células B, una de estas funciones y de las más importantes es la generación de anticuerpos, sin embargo, gracias a descubrimientos recientes se ha determinado que tienen capacidad de presentación antigénica, coestimulación

y producción de citocinas. La capacidad de producir citocinas le permite generar una protección antimicrobiana e inflamación de los tejidos, además de modular tanto la respuesta humoral como la celular (Hoffman et al., 2016).

Debido a que existen en periferia células B en diferentes estados de desarrollo, se ha establecido un sistema de clasificación basado en marcadores de superficie. De este modo, las células inmaduras que han salido de médula ósea llamadas “transicionales” presentan expresión alta de marcadores de superficie como CD38 y CD24, una baja expresión de IgD y una nula expresión de CD27. Después de llegar a bazo, las células transicionales perderán la expresión de CD38 y CD24; hallándose ahora un aumento en la expresión de IgD y manteniendo la nula expresión de CD27 (Sanz et al., 2019). Estas células, llamadas “naïve”, se encontrarán con el antígeno que reconocen de forma específica y llevarán a cabo una respuesta T-dependiente, aunado a una reacción de centro germinal, dando lugar a dos diferentes tipos de célula B: uno llamado “De memoria” el cual perderá la expresión de IgD y obtendrá la expresión de CD27 y otro parecido llamado plasmablastos o células secretoras de anticuerpos (“ASCs” por sus siglas en inglés) que presentarán CD27 y CD38 en su superficie. Éstas últimas pueden establecerse en médula ósea para la producción de anticuerpos continua, garantizando una protección inmediata al momento de exponerse a patógenos; mientras que las células de memoria pueden estar en circulación o en tejidos para la rápida interacción con células T y diferenciarse a plasmablastos, provocando que haya una respuesta que genere anticuerpos de alta afinidad y con un cambio de isotipo (Ahmed & Gray, 1996).

Con el paso del tiempo, se han identificado nuevas subpoblaciones de células B que resultan tener cierto papel en la patología de algunas enfermedades. Tal es el caso de las células naive activadas o “aNAV”, las cuales por su generación de auto-anticuerpos cumplen un papel importante en la patogenia de lupus (Tipton et al., 2015). Por otro lado, las células B de zona marginal (MZB) pudieran diferenciarse en ASCs de corta vida para contribuir a los brotes en el Lupus Eritematoso Generalizado. Este comportamiento puede reproducirse en diferentes contextos como el Síndrome de Sjögren o COVID-19 (Velounias & Tull, 2022).

c. Células B Dobles Negativas

Adicionalmente a las poblaciones antes mencionadas, se encuentra una subpoblación de células B que tiene una baja frecuencia en sangre periférica de controles sanos pero que, en enfermedades autoinmunes, así como en enfermedades virales crónicas, aumentan significativamente. Esta subpoblación se caracteriza por la ausencia de CD27 y de IgD, por lo que se le denomina “Dobles Negativas” (DN) (Hurtado et al., 2022).

En adición, la expresión de las proteínas CD21 y CD11c puede variar en esta subpoblación DN, permitiendo clasificarlas en tres subtipos: DN1 (CD21+ CD11c-), DN2 (CD21- CD11c+) y DN3 (CD21- CD11c-) (Sosa-Hernández et al., 2020).

Se han propuesto diferentes teorías mediante las cuales estas células son producidas, dentro de las cuales destaca una reacción extra-folicular en la cual se lleva a cabo la diferenciación de células naïve a DN1 en presencia de IL-21 en el medio. (Jenks et al., 2018). Otra teoría consiste en un tipo de células B de memoria que han interactuado por un periodo prolongado con el antígeno de tal modo que llegan a un estado parecido al agotamiento, acuñado en un principio a las células T (Li et al., 2021).

En el estudio de las células B DN1, se ha descubierto mediante estudios de transcriptoma que se relacionan más a células de memoria con cambio de isotipo en vez de relacionarse con las DN2. Esto descarta la idea de que las DN1 puedan ser precursoras de las células DN2. Además, se ha encontrado que los números de las células DN1, se reducen conforme los números de las células B DN2 aumentan (Jenks et al., 2018; Woodruff et al., 2020).

Las células B DN2, más caracterizadas que las DN1 y DN3, se les han atribuido la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, además de una diferenciación a ASCs por la presencia de IL-21 e IFN- γ en el medio. Esto a través de la unión de estas moléculas con el receptor TLR-7 (Jenks et al., 2018). De este modo, la tolerancia de las células B se ve

afectada, propiciando la diferenciación a clonas autorreactivas, las cuales pueden secretar auto-anticuerpos específicos del Lupus, como es el caso del Anti-Sm (Jackson et al., 2014). Del mismo modo, se ha identificado una correlación positiva con la actividad del Lupus Eritematoso Generalizado, incidentes nefríticos y títulos de auto-anticuerpos. Estas células también guardan una correlación negativa con el desenlace de la enfermedad (Hurtado et al., 2022).

Las células B DN2 se comportan del mismo modo en padecimientos virales como es el caso de la enfermedad causada por el virus coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-COV-2, por sus siglas en inglés). En esta enfermedad, las células B DN2 han demostrado aumentar sus números y correlacionar positivamente con la severidad de la enfermedad, además de generar reacciones extra-foliculares y ser capaces de diferenciarse a ASCs en una vía dependiente de IL-21 e IFN- γ (Woodruff et al., 2020).

d. Enfermedades autoinmunes y el papel de las células B.

Las células B pueden producir auto-anticuerpos, los cuales pueden tener un efecto directo sobre sus objetivos o provocar efectos colaterales, como es el caso de la deposición de complejos autoinmunes en la nefropatía del lupus. Estos complejos también pueden observarse en artritis reumatoide (AR), esclerodermia y síndrome de Sjögren. (Hampe, 2012). Por otro lado, en la enfermedad de Graves, los auto-anticuerpos pueden activar los receptores de tirotropina, provocando un estado de hipertiroidismo (Chazenbalk et al., 2002).

Además de esto, las células pueden ser células presentadoras de antígeno por la captación de antígenos a través de su BCR. Este comportamiento se puede observar en enfermedades como la AR, (O'Neill et al., 2005) o diabetes tipo 1 (Wong et al., 2004).

Las células B efectoras también tendrán la capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IFN- γ , IL-4 o TGF- β . Estas citocinas pueden inducir la migración de células dendríticas, activar macrófagos, modular la regulación por parte de las células T y activar otras células B (Romero-Ramírez et al., 2019).

Durante un periodo de inflamación prolongado, se pueden generar centros germinales ectópicos en tejido inflamado. Estas estructuras se han descrito en padecimientos como lupus, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, AR, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple y diabetes tipo 1 (Hampe, 2012). Las células que salen a periferia de estas estructuras han demostrado la capacidad de secretar auto-anticuerpos como el Anti-Sm, característico de lupus (Jenks et al., 2018).

Sin embargo, dentro de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos B, existen también aquellas que poseen la capacidad de secretar citocinas anti-inflamatorias como IL-10. Estas células con un probable papel regulador se les ha denominado, Bregs. (Rosser & Mauri, 2015) Se han demostrado diferentes vías por las cuales estas células pueden actuar, desde la diferenciación de células CD4+ naive a células T reguladoras (FOXP3+) hasta la inhibición de diferenciación de células T a un perfil TH1/TH17. Estas vías se han visto afectadas en enfermedades como el lupus y el AR (Blair et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013).

e. Lupus Eritematoso Generalizado

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es un padecimiento crónico y autoinmune resultado de la combinación de factores genéticos, ambientales, endocrinos e inmunológicos. (Ameer et al., 2022) La falla en la tolerancia inmunológica deriva en una patología con manifestaciones variables siendo algunas de estas: artralgia, manifestaciones cutáneas, cambios en los niveles de poblaciones sanguíneas, alopecia, pericarditis, complicaciones neurológicas y daño renal. Además, presenta anomalías en parámetros de laboratorio como bajos niveles en el complemento y la presencia de autoanticuerpos: Anti-DNA de doble cadena (Anti-dsDNA); Anti-Smith (Anti-Sm) y Anti-nucleosomas. (Lazar & Kahlenberg, 2023).

La incidencia de esta enfermedad es más alta en pacientes femeninos que en pacientes masculinos y es de aproximadamente 10 por 100, 000 personas, mientras que la prevalencia es de aproximadamente 300 por 100,000 personas en América (Fatoye et al., 2022).

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en hallazgos clínicos y los resultados correspondientes a estudios de laboratorio. Los criterios clínicos contemplan la presencia lesiones cutáneas, úlceras orales, alopecia, sinovitis, serositis, afectación renal, afectación neurológica, hematológica. Mientras que los criterios inmunológicos consideran la presencia de autoanticuerpos o niveles del complemento bajos. La presencia de 4 de estos criterios dará como resultado un diagnóstico confirmatorio de LEG (Lazar & Kahlenberg, 2023).

Debido a la heterogeneidad de la enfermedad se han diseñado índices para determinar la actividad y el tratamiento de esta. El Índice de Actividad de la Enfermedad de Lupus Eritematoso Generalizado (SLEDAI, por sus siglas en inglés) es el más usado. Este índice toma en cuenta 24 criterios de los cuales 16 son considerado clínicos y 8 son hallazgos de laboratorio. Cada uno de estos criterios cuenta con un puntaje asignado por los médicos evaluadores, de tal suerte que de estar presente una de estas manifestaciones se le asignará el puntaje correspondiente (ver tabla 1) (Arora et al., 2020).

Tabla 1. Relación de descriptores y puntuación en el SLEDAI.

Descriptor	Puntuación	Descriptor	Puntuación
Convulsiones	8	Proteinuria	4
Psicosis	8	Piruria	4
Síndrome Orgánico-Cerebral	8	Exantema nuevo	2
Alteraciones visuales	8	Alopecia	2
Alteraciones Pares craneales	8	Úlceras bucales	2
Cefalea lúpica	8	Pleuritis	2
AVC	8	Pericarditis	2
Vasculitis	8	Complemento	2
Miositis	4	Anti-DNA	2
Artritis	4	Fiebre	1
Cilindros urinarios	4	Trombopenia	1
Hematuria	4	Leucopenia	1

Debido a que existen pacientes que presentan mejoría, pero tienen cambios en los criterios inmunológicos, el puntaje máximo para considerar la inactividad de la enfermedad será de 4. En caso de pacientes que tomen antimaláricos, pero no inmunosupresores o glucocorticoides, un rango de 1-2 se considerará como remisión de la enfermedad. Un puntaje mayor a 6 será considerado como “Actividad elevada” de la enfermedad. Y un puntaje entre 4-6 será considerado una actividad moderada de la enfermedad. (Arora et al., 2020)

f. Antecedente directo

Contrario a estudios anteriores, en nuestro grupo de investigación se han estudiado todos los sub-tipos de células B DN: DN1, DN2 y DN3. En este caso, en la enfermedad por el virus SARS-CoV-2. En estos estudios se encontraron cambios en los números de las DN1 con respecto a la actividad de la enfermedad. Además de correlacionar estos números con criterios clínicos, donde las células DN1 demostraron tener una correlación positiva con parámetros de mejora como la saturación de oxígeno o el índice PaFi. Además, guardan una correlación negativa con el marcador de inflamación, IL-18, la cual es una citocina pro-inflamatoria.

Además, el grupo de pacientes con números de células B DN1 parecidos a los donadores sanos demostraron una tendencia a la mejora, mientras que los pacientes con números abatidos fallecieron. (Cervantes-Díaz et al., 2022)

Justificación: Se ha identificado que las células B cumplen con un papel tanto regulador como efector en varios padecimientos. Aunque ya se han descrito en enfermedades virales, las Dobles Negativas 1 no han sido caracterizadas completamente en un contexto de enfermedades autoinmunes, por lo que identificar los cambios en los números y las correlaciones de estos con variables clínicas o índices de la actividad, permitirá dilucidar con mayor precisión su presunto papel regulador. Determinar los cambios en sus números, responderá si existe una menor respuesta moduladora del sistema inmune debido a una menor cantidad de estas células y dirigirá la investigación a la contribución de este posible nuevo compartimento de células B reguladoras en padecimientos autoinmunes, además de incentivar su caracterización funcional.

Hipótesis: La frecuencia y números absolutos de las células B DN1 se encuentran reducidas en pacientes diagnosticados con Lupus Eritematoso Generalizado activos; los pacientes inactivos no presentan alteración con respecto a los donadores sanos

Objetivo general

Determinar alteraciones en frecuencias y números absolutos de las células B DN1 en pacientes con LEG activos e inactivos.

Objetivos particulares

- i. Estandarizar la metodología para obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos.
- ii. Desarrollo de un panel de citometría de flujo multiparamétrica que permita identificar subpoblaciones de células B.
- iii. Determinar diferencias estadísticamente significativas entre pacientes diagnosticados con LEG activos, inactivos y donadores sanos.

- iv. Determinar correlaciones estadísticamente significativas entre la actividad de la enfermedad y la frecuencia y números absolutos de DN1.

Materiales y métodos

- Recolección de muestra.

Se reclutaron muestras de 11 pacientes diagnosticados previamente con Lupus Eritematoso Generalizado y un total de 7 donadores sanos en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. A los pacientes se les realizaron análisis clínicos en los cuales se determinó: cuenta de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, presencia de autoanticuerpos y niveles del complemento. Adicionalmente se les asignó un puntaje de acuerdo con el SLEDAI-2k. A partir de este puntaje se clasificaron los pacientes en “remisión/inactivos” (SLEDAI \leq 4) o “activos” (SLEDAI $>$ 4). Muestras de pacientes que reportaran cursar con un padecimiento viral fueron excluidas.

Los individuos que no tuvieran alguna enfermedad autoinmune se consideraron como controles sanos. Muestras de controles que se reportaran con embarazo, enfermedad autoinmune o cáncer no fueron incluidas en el estudio. La información se encuentra recopilada en la tabla 2.

Este estudio fue aprobado por los Comités Institucionales de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ref. 2306).

Tabla 2. Características clínicas/laboratorio de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado

Característica	Individuos sanos (n=7)	Pacientes totales (n=11)	Activos (n=6)	Inactivos (n=5)
<i>Género – número (%)</i>				
<i>Femenino</i>	4 (57.14%)	10 (90.9%)	6 (100%)	4 (80%)
<i>Masculino</i>	3 (42.8%)	1 (9.09%)		1 (20%)
<i>Edad en años – media (intervalo)</i>	29.57 (22-48)	31.36 (19-51)	26.16 (19-39)	37.6 (26-51)
<i>SLEDAI 2k- media±SD</i>	NA	9.09 ± 9.80	16.33 ± 7.94	0.4 ± 0.89
<i>Cuenta de leucocitos (cél/μL) - media±SD</i>	6668 ± 1667	6027 ± 1945	7083 ± 1899	4760 ± 1128
<i>Cuenta de linfocitos (cél/μL) - media±SD</i>	2199 ± 772	1209 ± 613	970 ± 731	1496 ± 291
<i>Cuenta de neutrófilos (cel/μL) - media±SD</i>	NA	4292 ± 1879	5602 ± 1364	2720 ± 915
<i>Índice Neutrófilo/Leucocito - media±SD</i>	NA	5.05 ± 4.26	7.72 ± 4.13	1.86 ± 0.69
<i>Anti-Sm (UI/mL)- media±SD</i>	NA	219.5 ± 241.01	219.5 ± 241.01	ND
<i>Anti-DNAc (UI/mL)- media±SD</i>	NA	341.66 ± 558.91	674.68 ± 652.37	8.64 ± 4.85
<i>Anti-Nucleosomas (UI/mL) - media±SD</i>	NA	1800.22 ± 2327.60	2247.35 ± 2427.10	11.7 ± 0.0
<i>Complemento C3 (mg/dL)- media±SD</i>	NA	101.27 ± 49.65	66.17 ± 37.36	143.4 ± 18.71

Complemento C4 (mg/dL)-
media \pm SD

NA	26.62 \pm 15.46	18.67 \pm 10.97	31.4 \pm 16.80

NA= No Aplica; ND: No Disponible

- Citometría de flujo.

Mediante un gradiente de densidad utilizando Lymphoprep, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Una vez purificadas las células mononucleares, estas se resuspendieron en buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se contaron para proceder con el protocolo de tinción utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados al fluorocromo indicando el siguiente arreglo: APC

anti-human CD19, BV650 anti-human CD38, APC-Cy 7 anti-human CD27, BV421 anti-human CD24, PerCP-Cy 5.5 anti-human IgD, FITC anti-human CD21, PE-Dazzle 594 anti-human CD11c y Zombie UV (Todos de la marca BioLegend).

Para la tinción, se tomaron 1.5×10^6 PBMCs y se incubaron con FcX blocker (BioLegend) por 10 minutos. Después del lavado con PBS, se incubó por 20 minutos a las células con Zombie UV a temperatura ambiente y en oscuridad para determinar las células viables. Posteriormente las células se lavaron con albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) y se tiñeron con el coctel de anticuerpos antes mencionados durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Después de este tiempo de incubación, las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se resuspendieron en 100 uL de cell staining buffer para su análisis inmediato por citometría de flujo en el citómetro de flujo BD LSRFortessa. Con el apoyo del programa FACSDiva (BD Biosciences) se adquirieron un mínimo de 1×10^6 eventos identificados por su tamaño y granularidad como linfocitos. Los archivos generados fueron analizados utilizando el software FlowJoV10 (BD Biosciences). Para determinar los puntos de corte de cada fluorocromo, se utilizaron controles de fluorescencia menos uno (FMO) así como controles de compensación utilizando las perlas CompBeads (BD Biosciences).

- Conteo celular

Para realizar el conteo de números absolutos de las muestras obtenidas de donadores sanos, se realizó una dilución de la muestra a razón de 1:10 utilizando el líquido de Turk. Se tomaron 45 μL de solución de Turk y 5 μL de sangre. Posteriormente se colocaron 10 μL en la cámara de Neubauer, donde el promedio de dos cuadrantes sería multiplicado por 100 para obtener los leucocitos totales.

En el caso de los pacientes, se realizó biometría hemática para determinar el conteo de leucocitos y linfocito.

- Análisis de datos.

La diferencia estadística de las poblaciones celulares de cada paciente en los grupos de interés se evaluó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis acompañada de la prueba post-hoc de Dunn. Esta prueba, junto con la matriz de correlación, se realizaron en el software GraphPad Prism 9.

Resultados

1. Estrategia de análisis.

Como primer paso dentro de nuestra estrategia de análisis de los resultados obtenidos de la citometría multiparamétrica, se seleccionaron a los linfocitos tomando como criterio de selección su tamaño y granularidad, los cuales además provenían de una selección de eventos sencillos, seleccionados utilizando los parámetros Side Scatter-Area (SSC-A) vs Side Scatter Height (SSC-H). Posteriormente, utilizando un marcador de viabilidad, se seleccionaron las células viables. Para la identificación de los linfocitos B, se utilizó la proteína de membrana CD19, la cual se encuentra presente en diferentes sub-poblaciones de células B y no es expresada por otras células del sistema inmunológico como las células T (Sanz et al., 2019). Finalmente se utilizaron los diferentes marcadores que permitieran caracterizar diferentes sub-poblaciones de linfocitos B, obteniendo las siguientes poblaciones: de memoria (CD27+ CD38-), células secretoras de anticuerpos (ASC) (CD27+ CD38++) y una subpoblación que con los siguientes *gates* será definida (CD27- CD38+/-).

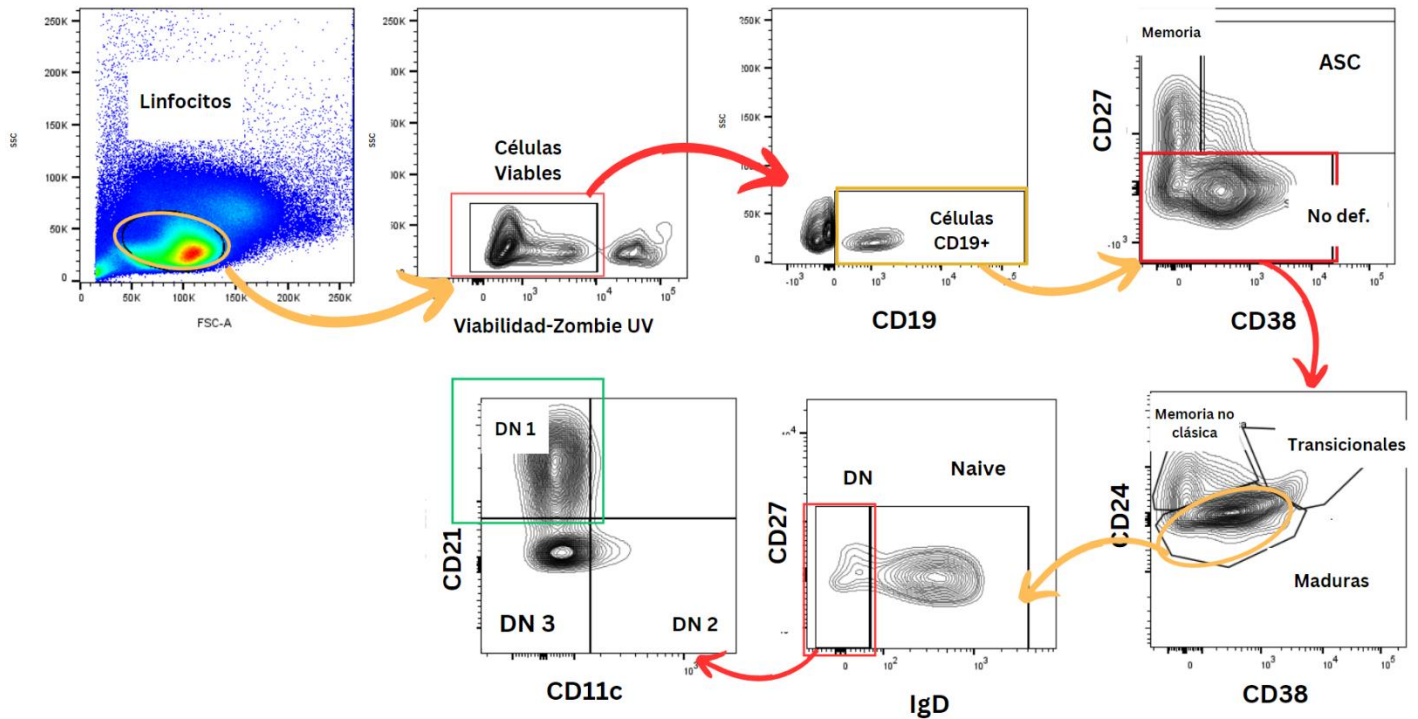


Figura 1. Estrategia de análisis para la identificación de subpoblaciones de células B DN en PBMCs (Imagen representativa de un donador sano).

La sub-población no definida fue sometida a la comparación de la expresión de los marcadores de superficie CD38 y CD24, de lo cual pudimos discernir entre las células de memoria no clásica (CD24+ CD38-), las células maduras (CD24-CD38+/-) y las células transicionales (CD24++ CD38++). Posteriormente, las células maduras se clasificaron según su expresión de CD27 y de IgD en células naíve (CD27-IgD+) o células dobles negativas (DN) (CD27-IgD-). Finalmente, a esta última población se le analizó la expresión de CD11c y de CD21 para obtener las sub-clasificaciones de células dobles negativas: DN1 (CD21+ CD11c-), DN2 (CD21- CD11c+) y DN3 (CD21-CD11c-). Las sub-poblaciones y sus fenotipos desglosados se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Fenotipo de subpoblaciones de células B

Subpoblación de células B (CD19+)	Fenotipo
Memoria	CD27+ CD38-
Secretoras de anticuerpos (ASC)	CD27+ CD38++
Transicionales	CD27- CD38++ CD24++
Memoria no clásica	CD27- CD38- CD24+
Naíve	CD27- CD38+/- CD24+/- IgD+
Dobles Negativas (DN)	CD27- CD38+/- CD24+/- IgD-
DN1	CD27- CD38+/- CD24+/- IgD- CD11c- CD21+
DN2	CD27- CD38+/- CD24+/- IgD- CD11c+ CD21-
DN3	CD27- CD38+/- CD24+/- IgD- CD11c- CD21-

2. Números absolutos y frecuencias de las células DN1

Analizando las PBMCs de pacientes activos, inactivos y donadores sanos a través de citometría de flujo, se obtuvieron las frecuencias y números absolutos de células B, donde no se observa diferencia estadísticamente significativa en los números absolutos entre los tres grupos. En cambio, sí hay diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias de los pacientes inactivos con respecto a los controles ($p \leq 0.01$) y los pacientes activos con respecto a los controles. ($p \leq 0.001$)

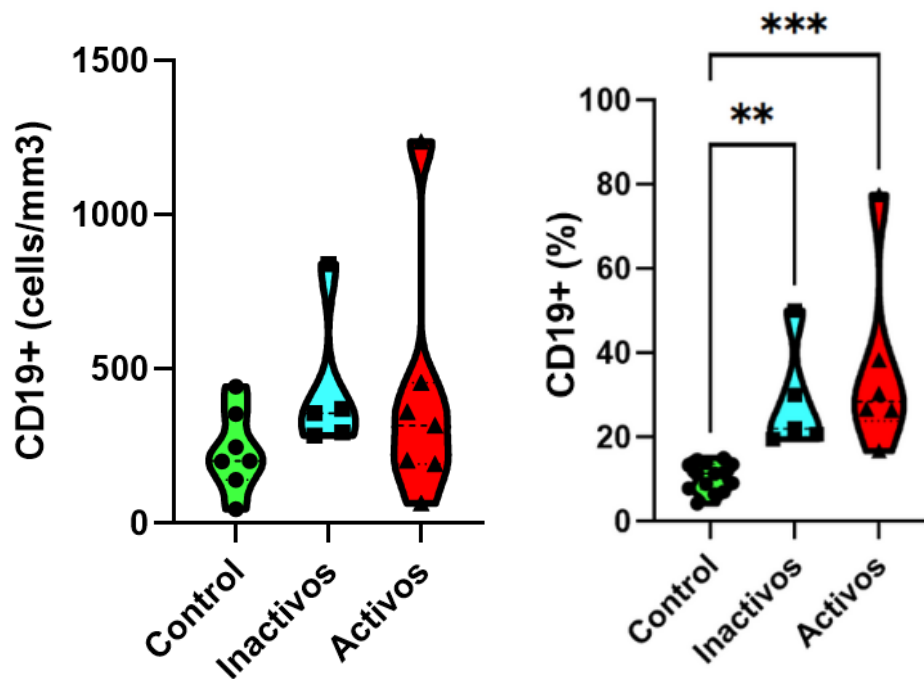


Figura 2. Análisis comparativo de los números absolutos (izquierda) y frecuencias (derecha) de células CD19+. Los valores de frecuencia y de números absolutos se muestra como media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (línea punteada). Los pacientes diagnosticados con LEG, (n=11), fueron sub-divididos de acuerdo con la actividad de la enfermedad en inactivos (n=5) y activos (n=6), además del grupo control de individuos sanos (n=7). Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba post-hoc de Dunn * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

De las diferentes sub-poblaciones de células B, centramos la atención a las células DN1, donde no se observa diferencia estadísticamente significativa en los números absolutos, pero sí en la frecuencia de los pacientes inactivos con respecto a los donadores sanos y una

reducción significativa ($p \leq 0.01$) de la frecuencia de los pacientes activos con respecto a los pacientes inactivos.

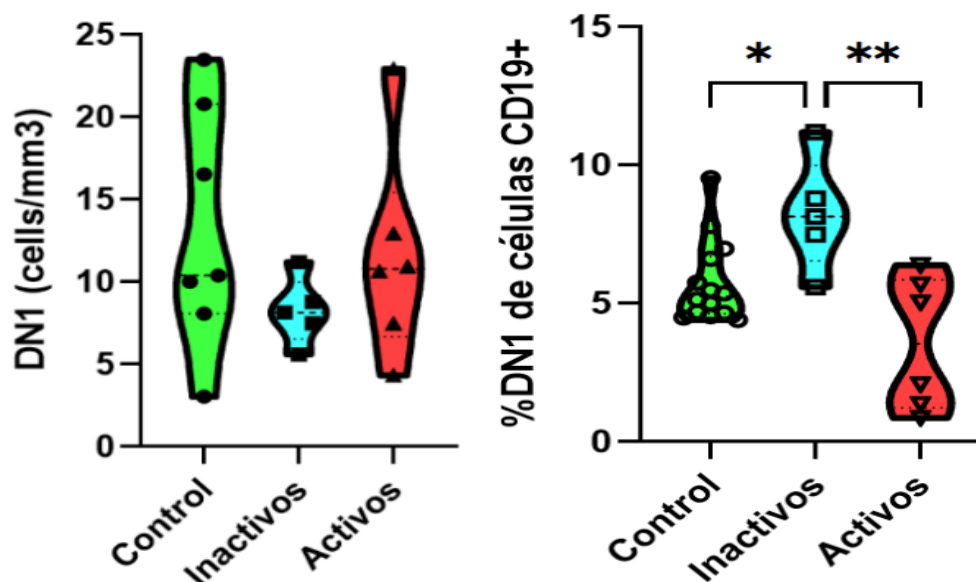


Figura 3. Análisis comparativo de las frecuencias (derecha) y números absolutos (izquierda) de células B DN1. Los valores de frecuencia y de números absolutos se muestra como media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (línea punteada). Los pacientes diagnosticados con LEG, (n=11), fueron sub-divididos de acuerdo a la actividad de la enfermedad en inactivos (n=5) y activos (n=6), además del grupo control de individuos sanos (n=7). Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba post-hoc de Dunn * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

3. Los números de las células B DN1 correlacionan con la actividad de la enfermedad.

Para determinar un posible papel de estas células, se procedió a realizar un análisis de correlación con algunos parámetros característicos de la enfermedad, de los cuales sólo hubo correlación con el SLEDAI (%DN1 $r = -6.25$, $p = 0.0447$; #DN1 $r = -6.22$, $p = 0.0455$) y el NLR. (%DN1 $r = -0.565$; $p = 0.010$)

Además, se halló la correlación con la frecuencia de las células DN2 %DN2 (%DN1 $r = -0.555$, $p = 0.082$; #DN1 $r = -0.651$, $p = 0.034$) y los números absolutos #DN2 (%DN1 $r = -0.736$; $p = 0.013$; #DN1 $r = -0.711$, $p = 0.017$)

Las correlaciones con auto-anticuerpos y con fracciones del complemento no fueron de importancia estadística.

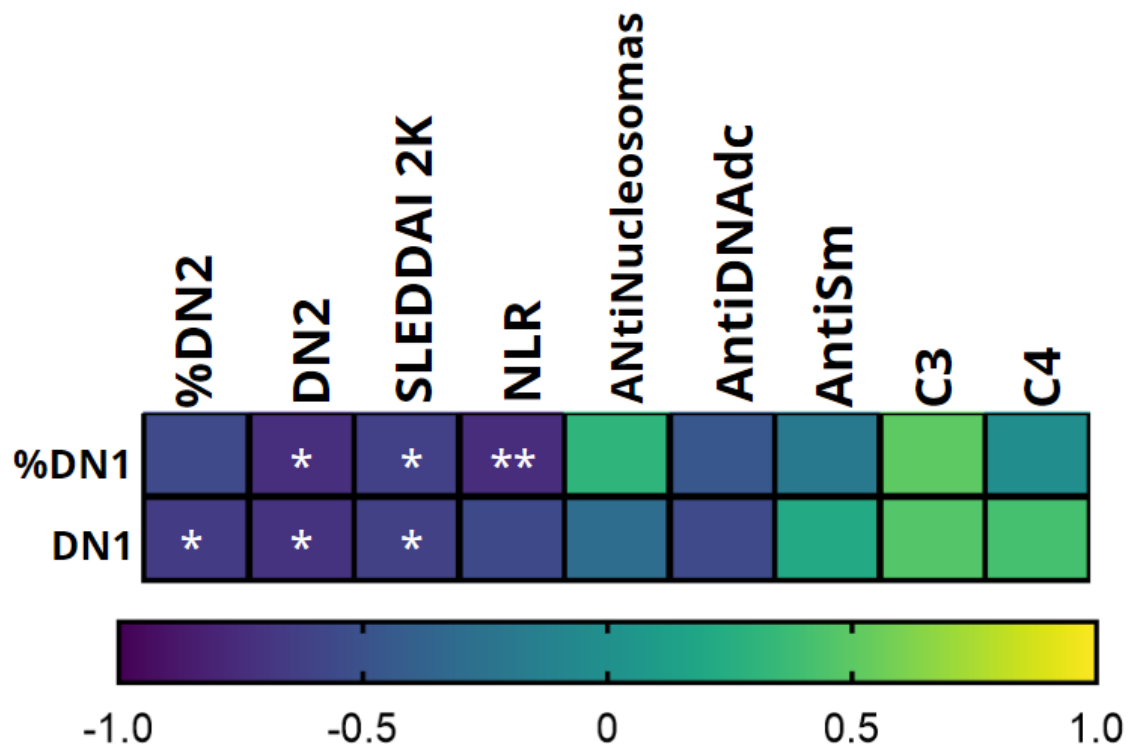


Figura 4. Matriz de correlación entre números de células B DN1 y variables clínicas. Matriz de correlación que muestra gráficamente el coeficiente de Spearman calculado entre los números de las células DN1 y las variables serológicas y SLEDAI indicadas para los pacientes con LEG de la cohorte (n=11). La escala que se incluye indica el valor de los coeficientes de correlación de Spearman. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001.

Discusión

La estrategia de análisis resulta de gran importancia al momento de estudiar subpoblaciones de células B. Tanto la elección de los marcadores como de los fluorocromos acoplados resultarán cruciales, ya que de estos depende la segregación de cada grupo.

Los fluorocromos utilizados fueron seleccionados tomando en cuenta las características del citómetro utilizado, evitando que los marcadores estuvieran en un mismo canal. Este panel se compensó utilizando perlas de compensación, permitiendo hacer ajustes en los cuales los eventos positivos y negativos se pudieran diferenciar sin el riesgo de una sobrecompensación.

La ventaja más remarcable de esta estrategia de análisis reside en el hecho de que se puede observar el comportamiento de diferentes poblaciones, lo que permite identificar la expansión de una población a costas de la reducción de otra. Además, esta selección permite excluir las células que pudieran considerarse eventos positivos sin que realmente lo sean. Un ejemplo de esto es que, de no ser seleccionadas, las células transicionales son capaces de expresar CD21 (Sanz et al., 2019) lo que en el momento de analizar las sub-clasificaciones de las células DN puede traer un falso aumento de las células CD21+.

Además, es un panel que permitiría observar, por ejemplo, las células de memoria que han cambiado de isotipo, debido a que del *gate* de células CD27+ es posible generar otro *gate* en el que comparemos la expresión de IgD o las células naive activadas (aNAV) contra las naive en reposo (rNAV) por su expresión de CD11c (Woodruff et al., 2020).

En esta estrategia de análisis se hace énfasis en un error que pudiera llegar a suceder y que es importante considerar: los anticuerpos deben añadirse en un volumen que no aumente incertidumbre al resultado. Esto debido a que, si no es agregado o mezclado en una forma adecuada, las células que no sean teñidas podrían hacerse pasar como células DNs, aumentando así su frecuencia, afectando los resultados considerablemente.

Con respecto a los números de las células B DN1, en Lupus Eritematoso Generalizado se ha identificado que la linfopenia es un factor común entre los pacientes. Sin embargo, el grupo más afectado son las células T (Martin et al., 2017). Esta puede ser la razón de que aunque se observe un cambio en la frecuencia de células CD19+ no hay cambios estadísticamente significativos en los números absolutos en las células CD19+ (Fig. 1) ni en células DN1 entre los grupos de estudio.

Varios estudios de las subclasificaciones de células B DN se han llevado a cabo con el fin de determinar su relación en la vía de diferenciación. Se ha encontrado entonces, que las células DN1 son, por medio de comparación de transcriptoma, más parecidas a las células de memoria con cambio de isotipo (SWM) y las DN2 son más parecidas a las células naive activadas (aNAV), por lo que estas células son producidas por diferentes vías (Woodruff et al., 2020). De las células B DN2 es conocida su capacidad de generar auto-anticuerpos, citocinas pro-inflamatorias y el aumento de sus frecuencias en pacientes con LEG (Jenks et al., 2018). Caso contrario a las células DN1, las cuales se han caracterizado muy poco.

En este estudio se observó una reducción estadísticamente significativa de las células DN1 en pacientes activos contra pacientes inactivos y un ligero aumento en pacientes inactivos contra donadores sanos. Estos cambios en las frecuencias pueden deberse al aumento en los números de alguna otra sub-población, de lo cual se sabe que las células DN2, por ejemplo, tienen un aumento significativo en sus números absolutos en pacientes con LEG (Hurtado et al., 2022).

Relacionando estos números con algunos parámetros clínicos, la presencia de auto-anticuerpos resulta relevante para la clínica, ya que pueden fungir como un criterio de diagnóstico (Anti-DNA_{dc}) (Admou et al., 2022) o como marcadores de la severidad de la enfermedad (Anti-nucleosomas) (Ng et al., 2006). De este modo, habría sido interesante encontrar una correlación entre estos y los números de las células DN1 para dilucidar un poco más respecto a la patología de la enfermedad, sin embargo, esto no fue posible debido al tamaño de la muestra y la ausencia de algunos auto-anticuerpos en algunos pacientes.

El sistema del complemento también tiene un papel importante en la patología de la enfermedad. Al haber daño en los tejidos, el complemento se activa por la presencia de complejos inmunes, provocando una reducción en los niveles de la fracción C3 y C4 en suero. Esto es relevante ya que los pacientes que se encuentran en remisión, recuperan sus niveles del complemento (Sandhu & Quan, 2017). Debe notarse entonces que, aunque no es estadísticamente significativa, existe una correlación positiva entre los números de las células B DN1 y los niveles de ambas fracciones del complemento, dando entender el posible papel que pudieran tener las células B DN1 en la recuperación del paciente.

Como se ha indicado anteriormente, el SLEDAI es un índice diseñado para determinar la actividad de la enfermedad e incluso tomar decisiones con respecto al tratamiento a elegir (Arora et al., 2020). El hecho de que exista una correlación negativa estadísticamente significativa ($\%DN1 = -6.25, p = 0.0447$; $\#DN1 = -6.22, p = 0.0455$) podría darnos a entender que al momento en que la enfermedad se encuentra activa (indicado por un SLEDAI alto), las células reducirían sus números; caso contrario que, si las células aumentan sus números, el SLEDAI se vería reducido, lo que se traduciría en una inactividad de la enfermedad.

Algo parecido sucede con el índice de neutrófilos-leucocitos (NLR) el cual solamente guarda correlación estadísticamente significativa con los números absolutos. El NLR es un valor que nos permite conocer el estado y pronosis de los pacientes en diferentes patologías como son infecciones y enfermedades inflamatorias (Buonacera et al., 2022). Debido a que no tenemos datos de citocinas, estos son los datos más cercanos que tenemos del estado inflamatorio del paciente. El hecho de que exista una correlación negativa con la frecuencia nos habla de que una posible estabilización de sus frecuencias o una reducción en otros compartimentos, permitiendo un aumento en la frecuencia de las células DN1, promoverá una reducción en el valor de NLR, lo que se traduce como un pronóstico de mejora y un estado inflamatorio menor.

Tomando en cuenta estas dos correlaciones, hipotetizamos que las células DN1 pudieran tener una relación con la regulación del sistema inmune y el estado anti-inflamatorio

de los pacientes. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación, en el cual, se ha determinado la correlación negativa de los números de las células DN1 con citocinas pro-inflamatorias, como IL-18, así como marcadores de inflamación (dímero D) (Cervantes-Díaz et al., 2022).

La correlación negativa de los números de las células DN1 y DN2 pudiera hablarnos del antagonismo de estas dos sub-clasificaciones de células DN, donde las células DN1 podrían actuar como linfocitos Bregs. Retomando los números absolutos, a pesar de no ser estadísticamente significativo, el aparente aumento de números absolutos de células B DN1 en pacientes activos con respecto a los inactivos podría hablarnos de un intento de regulación por parte del sistema inmune mediante la diferenciación de más células DN1. Una posible falla en este mecanismo podría derivar en la nula reducción de las células pro-inflamatorias, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad.

El papel anti-inflamatorio que se propone, por el cual las células DN1 actuarían, puede darse por diferentes vías, desde la regulación a través de la secreción de citocinas anti-inflamatorias, como es el caso de las células transicionales, que inhiben la diferenciación de células CD4+ naive a un perfil TH1/TH17 (Blair et al., 2010). O que estas células induzcan la diferenciación de células T a células T reguladoras (Blair et al., 2010). Cualquiera que sea el caso, es evidente que estos sistemas pueden verse comprometidos en esta patología, lo cual deriva en una expansión exagerada de las células DN2.

Dentro de las limitaciones que se encuentran en este estudio se encuentran: el número de muestra tan limitado, lo cual quita un poco de fuerza al estudio. Será necesario aumentar el número de pacientes y controles para hacer más robustos los datos. Del mismo modo, el hecho de que algunos pacientes no contaran con la presencia de algunos auto-anticuerpos, se podría pensar que este estudio no es concluyente respecto a la correlación que existe entre las células DN1 y los auto-anticuerpos presentes.

Aun considerando esto, se observa que el patrón reportado en el caso de COVID-19 se repite en este patrón: existen cambios en la frecuencia de las células DN1 de acuerdo con

la actividad de la enfermedad, existe una correlación negativa entre los números y el SLEDAI y existe una correlación negativa con un marcador de inflamación, el NLR. Al igual que las DN2, las DN1 tienen un comportamiento similar en enfermedades autoinmunes y en enfermedades virales.

Conclusiones

- Se desarrolló un panel de citometría de flujo que permitiera discernir entre diferentes subpoblaciones de células B.
- Se determinaron cambios en las frecuencias de las células B DN1, mostrando un ligero aumento de las células B DN1 en pacientes inactivos con respecto a los donadores sanos, así como una ligera reducción en pacientes activos en comparación a pacientes inactivos.
- Se determinaron las correlaciones entre los números de células B DN1 y el marcador de inflamación NLR, así como con el índice de actividad de la enfermedad, SLEDAI.

Perspectivas

Dentro de las perspectivas de este estudio se contempla el aislamiento y el estudio funcional de las células DN1 mediante estímulos que permitan saber su capacidad de producir citocinas anti o pro-inflamatorias, además de determinar su capacidad reguladora mediante cocultivos con otras células del sistema inmune.

Referencias

- Admou, B., Eddehbi, F., Elmoumou, L., Elmojadili, S., Salami, A., Oujidi, M., Brahim, I., & Hazime, R. (2022). Anti-double stranded DNA antibodies: A rational diagnostic approach in limited-resource settings. *Practical Laboratory Medicine*, *31*, e00285. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2022.e00285>
- Ahmed, R., & Gray, D. (1996). Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. *Science*, *272*(5258), 54–60. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.54>
- Ameer, M. A., Chaudhry, H., Mushtaq, J., Khan, O. S., Babar, M., Hashim, T., Zeb, S., Tariq, M. A., Patlolla, S. R., Ali, J., Hashim, S. N., & Hashim, S. (2022). An Overview of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Pathogenesis, Classification, and Management. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.30330>
- Arora, S., Isenberg, D. A., & Castrejon, I. (2020). Measures of Adult Systemic Lupus Erythematosus: Disease Activity and Damage. *Arthritis Care and Research*, *72*(S10), 27–46. <https://doi.org/10.1002/acr.24221>
- Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, *32*(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Boehm, T., & Swann, J. B. (2014). Origin and Evolution of Adaptive Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, *2*(1), 259–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114201>
- Buonacera, A., Stancanelli, B., Colaci, M., & Malatino, L. (2022). Neutrophil to Lymphocyte Ratio: An Emerging Marker of the Relationships between the Immune System and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), 3636. <https://doi.org/10.3390/ijms23073636>
- Cervantes-Díaz, R., Sosa-Hernández, V. A., Torres-Ruíz, J., Romero-Ramírez, S., Cañez-Hernández, M., Pérez-Fragoso, A., Páez-Franco, J. C., Meza-Sánchez, D. E., Pescador-Rojas, M., Sosa-Hernández, V. A., Gómez-Martín, D., & Maravillas-Montero, J. L. (2022). Severity of SARS-CoV-2 infection is linked to double-negative (CD27– IgD–) B cell subset numbers. *Inflammation Research*, *71*(1), 131–140.

<https://doi.org/10.1007/s00011-021-01525-3>

- Chazenbalk, G. D., Pichurin, P., Chen, C.-R., Latrofa, F., Johnstone, A. P., McLachlan, S. M., & Rapoport, B. (2002). Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(2), 209–217. <https://doi.org/10.1172/JCI15745>
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, *124*(4), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- Farber, D. L., Netea, M. G., Radbruch, A., Rajewsky, K., & Zinkernagel, R. M. (2016). Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nature Reviews Immunology*, *16*(2), 124–128. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.13>
- Fatoye, F., Gebrye, T., & Mbada, C. (2022). Global and regional prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in low-and-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology International*, *42*(12), 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s00296-022-05183-4>
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2013). CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting T_H 1 and T_H 17 Differentiation. *Science Translational Medicine*, *5*(173). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407>
- Hampe, C. S. (2012). B Cells in Autoimmune Diseases. *Scientifica*, *2012*, 1–18. <https://doi.org/10.6064/2012/215308>
- Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *11*(1), 137–154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Hurtado, C., Rojas-Gualdrón, D. F., Urrego, R., Cashman, K., Vásquez-Trespalcacios, E. M., Díaz-Coronado, J. C., Rojas, M., Jenks, S., Vásquez, G., & Sanz, I. (2022). Altered B cell phenotype and CD27⁺ memory B cells are associated with clinical features and environmental exposure in Colombian systemic lupus erythematosus patients. *Frontiers in Medicine*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.950452>
- Jackson, S. W., Scharping, N. E., Kolhatkar, N. S., Khim, S., Schwartz, M. A., Li, Q.-Z., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., Liggitt, D., & Rawlings, D. J. (2014). Opposing Impact of B Cell–Intrinsic TLR7 and TLR9 Signals on Autoantibody Repertoire and Systemic

- Inflammation. *The Journal of Immunology*, 192(10), 4525–4532. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400098>
- Jenks, S. A., Cashman, K. S., Zumaquero, E., Marigorta, U. M., Patel, A. V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M. C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E. L., Scharer, C. D., Tipton, C. M., Wei, C., Lim, S. S., Petri, M., Niewold, T. B., Anolik, J. H., Gibson, G., ... Sanz, I. (2018). Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 49(4), 725–739.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>
- Lazar, S., & Kahlenberg, J. M. (2023). Systemic Lupus Erythematosus: New Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Annual Review of Medicine*, 74(1), 339–352. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-032611>
- Li, Y., Li, Z., & Hu, F. (2021). Double-negative (DN) B cells: an under-recognized effector memory B cell subset in autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 205(2), 119–127. <https://doi.org/10.1111/cei.13615>
- Martin, M., Guffroy, A., Argemi, X., & Martin, T. (2017). Lupus érythémateux systémique et lymphopénie : aspects cliniques et physiopathologiques. *Revue de Medecine Interne*, 38(9), 603–613. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2017.01.005>
- Ng, K. P., Manson, J. J., Rahman, A., & Isenberg, D. A. (2006). Association of antinucleosome antibodies with disease flare in serologically active clinically quiescent patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care & Research*, 55(6), 900–904. <https://doi.org/10.1002/art.22356>
- O'Neill, S. K., Shlomchik, M. J., Glant, T. T., Cao, Y., Doodles, P. D., & Finnegan, A. (2005). Antigen-Specific B Cells Are Required as APCs and Autoantibody-Producing Cells for Induction of Severe Autoimmune Arthritis. *The Journal of Immunology*, 174(6), 3781–3788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3781>
- Romero-Ramírez, S., Navarro-Hernandez, I. C., Cervantes-Díaz, R., Sosa-Hernández, V. A., Acevedo-Ochoa, E., Kleinberg-Bild, A., Valle-Rios, R., Meza-Sánchez, D. E., Hernández-Hernández, J. M., & Maravillas-Montero, J. L. (2019). Innate-like B cell subsets during immune responses: Beyond antibody production. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(5), 843–856. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-227R>
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function.

- Immunity*, 42(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Sandhu, V., & Quan, M. (2017). SLE and Serum Complement: Causative, Concomitant or Coincidental? *The Open Rheumatology Journal*, 11(1), 113–122. <https://doi.org/10.2174/1874312901711010113>
- Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., Hom, J., & Lee, F. E.-H. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>
- Sosa-Hernández, V. A., Torres-Ruiz, J., Cervantes-Díaz, R., Romero-Ramírez, S., Páez-Franco, J. C., Meza-Sánchez, D. E., Juárez-Vega, G., Pérez-Fragoso, A., Ortiz-Navarrete, V., Ponce-de-León, A., Llorente, L., Berrón-Ruiz, L., Mejía-Domínguez, N. R., Gómez-Martín, D., & Maravillas-Montero, J. L. (2020). B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611004>
- Tipton, C. M., Fucile, C. F., Darce, J., Chida, A., Ichikawa, T., Gregoret, I., Schieferl, S., Hom, J., Jenks, S., Feldman, R. J., Mehr, R., Wei, C., Lee, F. E.-H., Cheung, W. C., Rosenberg, A. F., & Sanz, I. (2015). Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology*, 16(7), 755–765. <https://doi.org/10.1038/ni.3175>
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Velounias, R. L., & Tull, T. J. (2022). Human B-cell subset identification and changes in inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 210(3), 201–216. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac104>
- Wong, F. S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L. G., Janeway, C. A., & Shlomchik, M. J. (2004). Investigation of the Role of B-Cells in Type 1 Diabetes in the NOD Mouse. *Diabetes*, 53(10), 2581–2587. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.10.2581>
- Woodruff, M. C., Ramonell, R. P., Nguyen, D. C., Cashman, K. S., Saini, A. S., Haddad, N. S., Ley, A. M., Kyu, S., Howell, J. C., Ozturk, T., Lee, S., Suryadevara, N., Case, J. B., Bugrovsky, R., Chen, W., Estrada, J., Morrison-Porter, A., Derrico, A., Anam, F. A., ...

Sanz, I. (2020). Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nature Immunology*, 21(12), 1506–1516. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>