



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biomedicina Molecular

**“Identificación de las subpoblaciones de células B en pacientes con  
COVID-19”**

**T E S I S**

Que presenta

M. en C. Víctor Andrés Sosa Hernández

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de la tesis:

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dr. José Luis Maravillas Montero



## **Comité**

### **Director**

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Jefe e Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular.

CINVESTAV – IPN

### **Director**

Dr. José Luis Maravillas Montero

Investigador Titular A, Coordinación de la Investigación Científica.

UNAM

## **Asesores**

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular y Coordinadora Académica del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Investigadora Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV – IPN

Dra. Laura Berrón Ruiz

Investigadora Titular de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias

Instituto Nacional de Pediatría – Secretaría de Salud

Dr. Jesús Martínez Barnetche

Director e Investigador Titular del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas

Instituto Nacional de Salud Pública – Secretaría de Salud

## **Soporte académico**

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete del Departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav – IPN) y en el laboratorio asignado al Dr. José Luis Maravillas Montero de la Red de Apoyo a la Investigación perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (RAI - INCMNSZ).

Durante la realización de este proyecto de posgrado se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y la beca 756882 / CVU-854621 otorgada al C. Víctor Andrés Sosa Hernández. Esta investigación fue financiada por el proyecto CONACyT A3-S-36875 y F0005-2020-01-313252, al igual que los proyectos IN213020 Y IN212122 del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT.

## **Dedicatoria**

A mi mamá Isabel, que siempre ha cuidado de mí y ha sido un ejemplo de fortaleza. A mi hermana Valeria, por apoyarme en todo y creer en mí. A mi hermano Adrián, por ser un gran ejemplo de dedicación y superación. A mi papá Víctor, por ser mi ejemplo de esfuerzo y sacrificio, a todos ellos por estar siempre conmigo.

A mi familia abuelos, abuelas, tíos, tías, primos, primas, sobrinos, sobrinas, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente.

A todos mis amigos, colegas y profesores, por su amistad, su apoyo y por creer en mí.

A los pacientes, familiares y personal de salud que combatió la pandemia, por su valentía y esfuerzo de salir adelante.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Dr. José Luis Maravillas Montero por brindarme la oportunidad de contribuir con su laboratorio, por sus consejos, su apoyo incondicional y su supervisión en este largo camino, muchas gracias por ser un gran mentor y una gran persona.

Con gran admiración y aprecio al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, por brindarme la oportunidad de colaborar con él. Gracias por sus consejos y su orientación en este proyecto.

Gracias a los Dres.: Dra. Laura Berrón, Dra. Leticia Cedillo, Dra. Carmen Sánchez, Dr. Jesús Martínez, Dr. Nicolas Villegas, por sus consejos y asesoría en este proyecto, sus palabras siempre me ayudaron a mejorar mi perspectiva.

Gracias al Dr. Klaus Warnatz y a la Dra. Bärbel Keller, por abrirme las puertas de su laboratorio, por enseñarme nuevas técnicas, así como por compartirme su conocimiento en el área de las inmunodeficiencias. Además, agradezco a la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) por apoyarme para haber realizado esta colaboración.

A la Dra. Diana Gómez y al Dr. José Torres, muchas gracias por sus consejos, su apoyo en el área clínica y sus enseñanzas.

Gracias a los Dres.: Dra. Miriam Pescador, Dr. Adrián Sosa, Dr. José Páez, Dr. Guillermo Juárez, Dra. Nancy Mejía por colaborar y contribuir en este proyecto.

Gracias a la Dra. Sandra Romero y al Dr. Rodrigo Cervantes por guiarme, por su amistad y aconsejarme durante el posgrado. Además, agradezco al M. en C. Raúl por su escucha atenta y apoyo en el laboratorio. También agradezco al Dr. David Meza por su apoyo y consejo en el laboratorio.

A mis colegas y compañeros, gracias por sus consejos y apoyo en el posgrado.

## Contenido

<b>Comité.....</b>	<b>I</b>
<b>Soporte académico.....</b>	<b>III</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>IV</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>V</b>
<b>Contenido.....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>XII</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XVII</b>
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 COVID-19.....	2
1.1.1 SARS-CoV-2.....	2
1.1.2 Mecanismos de evasión del SARS-CoV-2.....	3
1.1.3 Clínica de la COVID-19.....	5
1.2 Respuesta inmune contra el SARS-CoV-2.....	6
1.2.1 Respuesta inmune innata .....	6
1.2.2 Respuesta inmune adaptativa.....	7
1.3 Células B.....	9
1.3.1 Ontogenia y activación de las células B.....	9

1.3.2 Funciones de células B.....	16
1.4 Células B DN (CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> ).....	16
1.4.1 Origen y función de las células B DN.....	16
1.5 Justificación.....	19
1.6 Hipótesis, objetivo general y objetivos particulares.....	20
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos .....</b>	<b>21</b>
Grupo de estudio.....	22
Criterios de exclusión.....	23
Criterios de eliminación.....	24
Obtención de células mononucleares de sangre periférica y suero.....	24
Medición de citocinas.....	24
Ensayo multiplex.....	24
Citometría de flujo.....	25
Tinción de superficie.....	25
Tinción intracelular.....	25
Adquisición y análisis.....	27
Análisis bioinformático y estadístico.....	29
<b>Capítulo 3. Subpoblaciones de células B asociadas a la severidad de pacientes con COVID-19.....</b>	<b>31</b>
3.1 Resultados.....	32
3.2 Discusión.....	52

<b>Capítulo 4. Alteraciones de las células B dobles negativas CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> acorde a la respuesta inmunológica contra SARS-CoV-2.....</b>	<b>59</b>
4.1 Resultados.....	60
4.2 Discusión.....	69
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>72</b>
5.1 Conclusiones.....	73
5.2 Trabajo a futuro.....	74
<b>Apéndice A. Información adicional.....</b>	<b>75</b>
<b>Apéndice B. Publicaciones y actividades académicas.....</b>	<b>85</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>90</b>

## Lista de figuras

<b>Figura I.</b> Estructura del SARS-CoV-2.....	3
<b>Figura II.</b> Desarrollo de las células B en periferia.....	10
<b>Figura III.</b> Vías de activación de las células B.....	15
<b>Figura 1.</b> Análisis de citometría de flujo de las subpoblaciones de células B.....	28
<b>Figura 2.</b> Los pacientes no presentan cambio en el porcentaje total de las células B (CD19+).....	34
<b>Figura 3.</b> Alteraciones en el compartimento transicional de las células B de los pacientes con COVID-19.....	35
<b>Figura 4.</b> Alteraciones en el compartimento efector de las células B de los pacientes con COVID-19 .....	37
<b>Figura 5.</b> Los compartimentos naïve y memoria no clásica de las células B no presentan alteraciones en los pacientes con COVID-19.....	38
<b>Figura 6.</b> Alteraciones en el compartimento DN de las células B de los pacientes con COVID-19.....	40
<b>Figura 7.</b> Análisis de agrupamiento de pacientes con COVID-19 frente a las subpoblaciones de células B.....	43
<b>Figura 8.</b> Los pacientes con COVID-19 presentan una disminución en la expresión de CXCR5 en el compartimento naïve.....	44
<b>Figura 9.</b> Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en la expresión de CXCR5 y T-bet en la población de células B de memoria.....	45
<b>Figura 10.</b> Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en la expresión de CXCR5 y T-bet en el compartimento DN de células B.....	47

<b>Figura 11.</b> Las subpoblaciones de células B se correlacionan con escalas clínicas de severidad y diferentes parámetros clínicos de pacientes con COVID-19.....	49
<b>Figura 12.</b> Cambios en los porcentajes de las subpoblaciones de memoria, transicionales, naïve y DN correlacionan con parámetros biológicos de pacientes con COVID-19.....	50
<b>Figura 13.</b> Cambios en el porcentaje de la subpoblación DN3 correlacionan con parámetros biológicos de pacientes con COVID-19.....	51
<b>Figura 14.</b> Alteraciones en porcentajes y números absolutos del compartimento total de células B DN de pacientes con COVID-19.....	60
<b>Figura 15.</b> Alteraciones en porcentajes y números absolutos de las subpoblaciones de células B DN de pacientes con COVID-19.....	62
<b>Figura 16.</b> Perfiles de correlación de las subpoblaciones de células B DN y parámetros biológicos de pacientes con COVID-19.....	65
<b>Figura 17.</b> Los parámetros biológicos (datos clínicos y de laboratorio) y las subpoblaciones DN se asocian con la severidad del COVID-19.....	66
<b>Figura 18.</b> Las subpoblaciones DN se asocian con la severidad del COVID-19.....	68
<b>Figura suplementaria 1.</b> Matriz de correlación entre las subpoblaciones de células B de los pacientes con COVID-19.....	83
<b>Figura suplementaria 2.</b> Gráfico de barras con la contribución acumulada de los componentes PC1-PC3 de todos los parámetros evaluados.....	84

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Criterios para categorizar la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19).....	22
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos y reactivos usados para el análisis de citometría de flujo.....	26
<b>Tabla 3.</b> Subpoblaciones de células B y fenotipos.....	33
<b>Tabla suplementaria 1.</b> Características clínicas de la enfermedad por Coronavirus de 2019 de los pacientes y de los individuos sanos (capítulo 3).....	76
<b>Tabla suplementaria 2.</b> Números absolutos de las subpoblaciones de las células B.....	78
<b>Tabla suplementaria 3.</b> Análisis comparativo de los porcentajes de las subpoblaciones de células B de pacientes con COVID-19 vs. controles sanos pareados por edad.....	80
<b>Tabla suplementaria 4.</b> Características clínicas de la enfermedad por Coronavirus 2019 de los pacientes y de los individuos sanos (capítulo 4).....	81

## **Lista de abreviaturas**

**ABCs:** *age-associated B cells*

**ACE2:** enzima convertidora de angiotensina 2

**ADE:** *antibody-dependent enhancement*

**AID:** desaminasa de citosina inducida por activación

**ALT:** alanina aminotransferasa

**ARN:** ácido ribonucleico

**AST:** aspartato aminotransferasa

**BAFF:** factor activador de células B

**BCR:** receptor de células B

**CD:** *cluster of differentiation*

**CG:** centro germinal

**COVID-19:** enfermedad por coronavirus de 2019

**CPA:** célula presentadora de antígeno

**CPK:** creatina fosfocinasa

**CoVs:** coronavirus

**DAMP:** patrones moleculares asociados a daño

**DMV:** vesículas de doble membrana

**DN:** doble negativa

**E:** proteína de envoltura

**EBI2:** receptor acoplado a proteínas G inducido por el virus de Epstein-Barr 2

**EF:** extrafolicular

**FA:** fosfatasa alcalina

**FC:** frecuencia cardiaca

**Fib:** fibrinógeno

**FiO<sub>2</sub>**: fracción inspirada de oxígeno

**FR**: frecuencia respiratoria

**FMO**: *Fluorescence minus one*

**HCO<sub>3</sub>**: bicarbonato

**HHV-8**: herpesvirus humano 8

**ICOS**: coestimulador de células T inducible

**IDCV**: inmunodeficiencia común variable

**IFN**: interferón

**Ig**: inmunoglobulina

**IL**: interleucina

**INR**: índice internacional normalizado

**IRF**: factor regulador de interferón

**LDH**: lactato deshidrogenasa

**LEG**: lupus eritematoso generalizado

**M**: proteína de membrana

**MCP**: proteína quimioatrayente de monocitos

**MERS-CoV**: coronavirus del síndrome respiratorio del medio oriente

**MHC**: complejo mayor de histocompatibilidad

**MO**: médula ósea

**N**: proteína de nucleocápside

**NEWS**: puntuación nacional de alerta temprana

**NF-κB**: factor nuclear kappa B

**NK**: células asesinas naturales

**Nt/Lt**: índice neutrófilos/linfocitos

**Nsp**: proteína no estructural

**OLS:** órganos linfoides secundarios

**ORF:** marco abierto de lectura

**PaCO<sub>2</sub>:** presión arterial de dióxido de carbono

**PAM:** presión arterial media

**PAMP:** patrones moleculares asociados a patógenos

**PaO<sub>2</sub>:** presión arterial de oxígeno

**PaO<sub>2</sub>/Fi O<sub>2</sub>:** índice de Kirby

**PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica

**PCA:** análisis de componentes principales

**PCR:** proteína C reactiva

**Pre-B:** precursor de célula B

**PRR:** receptor de reconocimiento de patrones

**Pro-B:** progenitor de célula B

**PSI-PORT:** índice de gravedad de neumonía/equipo de investigación de resultados de pacientes con neumonía

**qSOFA:** evaluación rápida de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis

**RBD:** *receptor binding domain*

**RIG:** gen inducible por ácido retinoico

**RT-PCR:** reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa

**S:** proteína espiga

**SpO<sub>2</sub>:** saturación de oxígeno

**SARS-CoV:** coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo

**SARS-CoV-2:** coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo

**STAT:** *signal transducer and activator of transcription*

**TBK1:** proteína quinasa serina/treonina 1

**TGF-β:** factor de crecimiento transformante beta

**Th:** célula T cooperadora

**TLR:** receptores tipo Toll

**TMPRSS2:** serina-proteasa transmembrana de tipo 2

**TNFα:** factor de necrosis tumoral alfa

**TP:** tiempo de protrombina

**TPT:** tiempo parcial de tromboplastina

**Tph:** célula T cooperadora periférica

**Treg:** célula T reguladora

**TYK2:** tirosina quinasa 2

**UCI:** unidad de cuidados intensivos

**VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana

**ZC:** zona clara

**ZO:** zona oscura

## RESUMEN

La enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) es un proceso infeccioso de etiología viral que se convirtió en un problema mundial de salud pública afectando a millones de personas. En su forma más grave, presenta daño al tejido pulmonar provocando un cuadro severo de hipoxia y una respuesta inflamatoria deletérea. Las células B son un componente importante del sistema inmune, su principal función es diferenciarse a células plasmáticas para la producción de anticuerpos neutralizantes. Independiente de la producción de anticuerpos contra SARS-CoV-2, su papel biológico en la enfermedad aún no se comprende del todo. Por esta razón decidimos analizar subpoblaciones de células B circulantes de sangre periférica a través de citometría de flujo multiparamétrica en pacientes con COVID-19 y su posible relación con la severidad de la enfermedad y sus características. Categorizamos a los pacientes en casos leve/moderados, graves y críticos, y comparamos con un grupo control (individuos sanos). Encontramos una expansión notable del compartimento transicional en casos con enfermedad leve/moderada, en contraste con el compartimento de memoria que disminuyó en los pacientes más graves, mientras que los plasmablastos incrementaron. Por otro lado, la subpoblación DN1 disminuyó en los pacientes más graves, en contraste la subpoblación DN3 aumentó en estos mismos pacientes en relación con los casos leves/moderados y los controles. Estos cambios en las subpoblaciones definieron grupos asociados a la severidad de la enfermedad. Además, el compartimento total de células DN, naïve y células B con cambio de isotipo ( $CD27^+IgD^-$ ) presentan una disminución de la expresión de CXCR5; quimiorreceptor importante en la activación folicular. Mientras que el compartimento total de células DN y memoria presenta un incremento en la expresión de T-bet; factor de transcripción asociado a la respuesta en modelos infecciosos virales. Interesantemente, los números de la subpoblación DN3 se asociaron con un ambiente proinflamatorio e hipóxico, en contraste con las células DN1 que se asocian a un cuadro clínico de menor severidad. En conclusión, la severidad de la enfermedad es seguida por cambios en las subpoblaciones de células B, tanto en células inmaduras o diferenciadas. Además, la existencia de correlaciones entre las subpoblaciones de células B y parámetros biológicos, propone a estos linfocitos como potenciales biomarcadores y componentes activos en la patología de la enfermedad.

## **Abstract**

The Coronavirus disease 2019 (COVID-19), is an infectious process of viral etiology and represents a public health problem worldwide, affecting millions of people. In most cases, its clinic form is innocuous, however some patients can develop damage in the lung tissue, causing a severe hypoxic condition and a deleterious inflammatory response. B cells are an important component of the immune system, their main function is to differentiate into plasma cells to produce neutralizing antibodies. Beyond the specific production of antibodies against SARS-CoV-2, its biological role in the disease is still not fully understood. For this reason, we decided to analyze subpopulations of B cells in peripheral blood through multiparametric flow cytometry COVID-19 patients and the possible relationship with COVID-19 severity and its features. We categorized the patients into mild/moderate, severe, and critical cases, comparing them against the control group (healthy individuals). We found a remarkable expansion of the transitional compartment in cases with mild/moderate disease. Regarding the memory compartment, it was impaired in the patients with severe or critical illness while plasmablasts were increased. On the other hand, the DN1 subpopulation decreased in the most severe/critical patients, in contrast the DN3 subpopulation increased in these same patients in relation to mild/moderate cases and controls. These changes in the subpopulations defined groups associated with the severity of the disease. In addition, the total compartment of DN cells, naïve, and switched memory B cells (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) showed low expression of the chemoreceptor CXCR5 important for follicular activation. While the total compartment of DN and memory cells presents increased T-bet expression, a transcription factor associated with the immune response in viral infectious models. Respiratory parameters, inflammation markers, and clinical scores exhibited significant correlations with several subpopulations. Interestingly, the numbers of the DN3 subpopulation were associated with a proinflammatory and hypoxic environment, in contrast to DN1 cell numbers, which were associated with the less severe clinical form. In conclusion, disease severity is followed by changes in B cell subpopulations, both immature and effector cells. In sum the correlation between B cell subpopulations and biological parameters, suggested these lymphocyte subpopulations as potential biomarkers and active components in the pathology of the disease.



## **Capítulo 1.**

### **Introducción**

## 1.1 COVID-19

### 1.1.1 SARS-CoV-2

La familia de los coronavirus particularmente los géneros alfacoronavirus y betacoronavirus causan infecciones en el tracto gastrointestinal y respiratorio, en animales y humanos <sup>[1,2]</sup>. Anteriormente, no fueron considerados agentes patogénicos importantes hasta el brote por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) en el 2002-2003, en la región de Guangdong, China. 10 años más tarde, otro agente viral de la misma familia emergió en algunos países del medio oriente, el coronavirus del síndrome respiratorio del medio oriente (MERS-CoV). Ambos brotes fueron problemas de salud públicos importantes, debido a su transmisibilidad y patogenicidad en el ser humano <sup>[1,2]</sup>.

A finales del año 2019 se detectó un nuevo miembro, el SARS-CoV-2 en la región de Wuhan, China <sup>[3]</sup>. Como nuevo miembro de los betacoronavirus, el SARS-CoV-2 comparte el 79% de su secuencia con el SARS-CoV y el 50% con el MERS-CoV. Estructuralmente se caracteriza por ser un virus envuelto por una membrana lipídica en forma de corona, de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla en sentido positivo como material genético <sup>[1]</sup>. Posee 4 proteínas estructurales la proteína espiga, proteína de membrana, proteína de nucleocápside y la proteína de envoltura; además codifica diferentes proteínas no estructurales y accesorias (Fig. 1) <sup>[4]</sup>. La proteína espiga está compuesta de 2 subunidades, S1 y S2. La subunidad S1 posee el dominio de unión a receptor (por sus siglas en inglés *RBD*) que reconoce e interactúa con la proteína del hospedero, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2); mientras que la subunidad S2 media la fusión de la membrana viral con la célula del hospedero <sup>[4,5]</sup>.

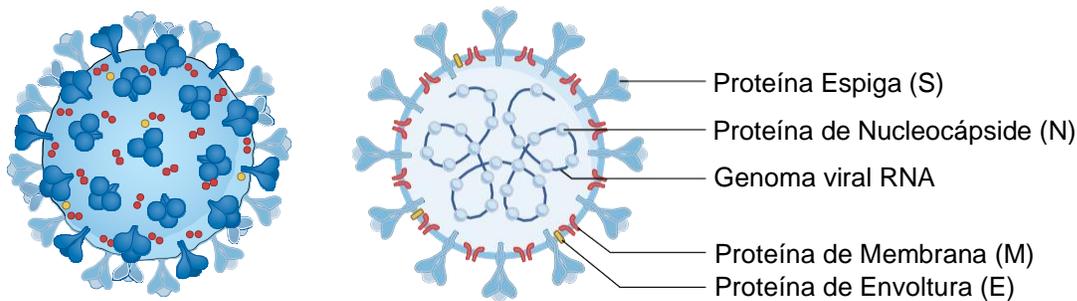


Figura 1. **Estructura del SARS-CoV-2.** El virión del SARS-CoV-2 posee una arquitectura con las siguientes proteínas: proteína espiga (S), proteína de nucleocápside (N), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura [5].

La enfermedad producida por este agente viral se ha denominado enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) [1-5].

### 1.1.2 Mecanismos de evasión del SARS-CoV-2

Similar a otros coronavirus, el SARS-CoV-2 requiere un procesamiento proteolítico de la proteína espiga para activar la vía endocítica. Se ha descrito que las proteasas del huésped participan en la escisión de la proteína S y activan la vía de entrada, incluyen a la serina-proteasa transmembrana de tipo 2 (TMPRSS2), la catepsina L y la furina [4-6]. Las primeras células blanco por el SARS-CoV-2, acorde a una primoinfección en humanos son las células multiciliadas de la nasofaringe o tráquea, o las células sustentaculares del epitelio olfativo. Posterior a su entrada, el genoma viral es liberado en el citosol, donde comienza la traducción de los marcos de lectura ORF1a y ORF1b produciendo dos poliproteínas, pp1a y pp1b, respectivamente. Las poliproteínas son escindidas por una proteasa codificada por el virus. La replicación comienza en vesículas de doble membrana generadas por el virus, provenientes del retículo endoplásmico [4-6]. El genoma en sentido positivo funciona como molde para un ARN de sentido negativo completo y ARN subgenómico. Este último da origen a las proteínas estructurales y accesorias que se acoplan en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico para ensamblar el virión. Finalmente, los ARN de sentido positivo subsecuentes se acoplan a los viriones *de novo*, para emerger de la membrana plasmática [4-6].

Todos los virus dependen de la fuente de energía de las células del hospedero, materias primas y acceso a complejos proteicos. Para poder completar un ciclo viral efectivo, es necesario que el virus antagonice o bloquee diferentes mecanismos de defensa del huésped. Los coronavirus (CoVs) han desarrollado múltiples mecanismos para antagonizar los diferentes componentes de las vías de PRR-IFN para subsistir en la célula del hospedero. Específicamente pueden evitar el reconocimiento inmune por: (1) la formación de vesículas de doble membrana (DMV) que esconden el material viral de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR); y (2) antagonizar directamente las moléculas de la señalización de la respuesta inmune a través de las proteínas virales [1,5,6]. Se han identificado diferentes proteínas del virus SARS-CoV-2 para bloquear la respuesta antiviral del huésped mediante los mecanismos previamente mencionados. Respecto al bloqueo de los receptores de reconocimiento de patrones del huésped, la proteína Nsp1 previene la fosforilación de IRF3, posiblemente apagando la traducción de proteínas, esto agota los factores celulares requeridos para la cascada de señalización del receptor de reconocimiento [5,6]. También Nsp5 tiene la capacidad de bloquear el reconocimiento por diferentes mecanismos como inhibir la formación de gránulos de estrés, escindiendo el dominio N-terminal de RIG-I o prevenir su interacción con la señalización mitocondrial antiviral [5,6]. Otra proteína que evita el reconocimiento es la proteína Nsp6 a través de su interacción con TBK1, previniendo su activación. Además de las proteínas no estructurales, la proteína S participa en la evasión de la respuesta del huésped, promoviendo la degradación por el proteasoma de IRF3 [5,6]. Por otro lado, referente al bloqueo de la vía de señalización de interferón (IFN), se ha descrito que la proteína Nsp1 puede antagonizar la vía, depletando las proteínas TYK2 y STAT2. Asimismo, la proteína Nsp6 contribuye al bloquear la fosforilación de STAT1 y STAT2. De igual forma la proteína Nsp13 puede bloquear la fosforilación de las proteínas previamente mencionadas, y además reduce los niveles endógenos de la cadena alfa del receptor de IFN [5,6].

Además de los mecanismos descritos, existen otros en estudio. De este modo, evadiendo sensores de reconocimiento y bloqueando vías de respuesta antiviral, el SARS-CoV-2 logra tener una replicación viral productiva, transmitirse y desarrollar un daño severo en el huésped.

### 1.1.3 Clínica de la COVID-19

El SARS-CoV-2 se transmite por gotas de *flügge* o aerosoles a través de las vías respiratorias superiores, con un tiempo medio de incubación de 4-5 días antes del inicio de los síntomas. Aunque en algunos casos el proceso infeccioso suele ser asintomático, la mayoría de los individuos desarrollan síntomas respiratorios asociados a un resfriado común, no obstante, una parte de ellos puede progresar a un distrés respiratorio agudo, neumonía, falla orgánica múltiple y la muerte [4,6,7].

El diagnóstico confirmatorio es detectando el material viral a través de RT-PCR, la muestra puede ser de un hisopado nasofaríngeo. No obstante, existe otra herramienta diagnóstica que puede corroborar la infección: la detección de antígenos (proteínas) virales; una de las ventajas es el tiempo para conocer el resultado, sin embargo, no posee la misma sensibilidad y especificidad que la prueba de RT-PCR [4-6]. Adicional a estas pruebas diagnósticas, existen otras herramientas que nos ayudan a orientar la terapéutica que se emplea y en algunos casos pronosticar la severidad de la enfermedad. Comenzando por los estudios de imagen, la tomografía axial computarizada y la radiografía de tórax son utilizadas para observar alteraciones en el parénquima pulmonar, usualmente el proceso neumónico presenta daño bilateral y se observan opacidades en ambos pulmones [4-6].

Otras herramientas importantes son los análisis de laboratorio clínico. Dentro de ellos destacan el conteo total de linfocitos, que en la mayoría de los pacientes que mostraron un decremento de este compartimento celular desarrollaron una enfermedad grave. Un elevado cociente Neutrófilos/Linfocitos fue asociado a pacientes que tienen mayor susceptibilidad a presentar un cuadro grave [6,8,9]. La proteína C reactiva también ha sido propuesta como un marcador de progresión de la enfermedad. Adicionalmente, el dímero-D (producto de la degradación de la fibrina) es un factor para evaluar trastornos de la coagulación, ha sido encontrado elevado en pacientes que presentaron coagulación intravascular diseminada [6,8,9].

En cuanto a la clínica, los síntomas más comunes son tos seca, fiebre, cefalea, mialgia y diarrea. Además, los pacientes pueden desarrollar disminución en el sentido del olfato

y el gusto (hiposmia e hipogeusia, respectivamente). Usualmente los pacientes que desarrollan una enfermedad más grave, ocurren posterior a 1 semana de iniciados los síntomas. El síntoma cardinal de la enfermedad grave es la disnea (dificultad para respirar), uno de los datos principales de la hipoxia <sup>[5,6]</sup>.

## **1.2 Respuesta inmune contra el SARS-CoV-2**

### 1.2.1 Respuesta inmune innata

Fisiológicamente hablando, una respuesta inmune certera se caracteriza por neutralizar y eliminar un patógeno sin perjudicar el tejido del huésped. Una respuesta inmune antiviral tiene componentes celulares y solubles que actúan como mecanismo de defensa. En primer lugar, la respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra el SARS-CoV-2. Después de invadir las células del huésped, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los patrones moleculares asociados a daño (DAMP) que representan pequeños motivos moleculares virales, son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR) o PRR <sup>[10]</sup>. Esto activa vías de señalización intracelular, como: los factores reguladores de interferón (IRF) y el factor nuclear kappa B (NF-κB), con el fin de producir citocinas proinflamatorias e interferones tipo I (IFN-I) <sup>[11-12]</sup>. Comúnmente, el IFN en las células infectadas induce apoptosis y limita la replicación viral para proteger a las células no infectadas y limitar la propagación viral. Sin embargo, el SARS-CoV-2, como lo comentamos anteriormente posee mecanismos de defensa para suprimir la producción de IFN-I <sup>[5,6]</sup>. Esto retrasa la respuesta antiviral promoviendo su propagación y la progresión de la enfermedad <sup>[8,13]</sup>. Otro mecanismo es el sistema del complemento, un sistema de vigilancia soluble que une las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas <sup>[14]</sup>. No obstante, en pacientes con COVID-19, se ha descrito que una activación deletérea, se asocia con trastornos de la coagulación, disfunción de las células endoteliales y un proceso inflamatorio crónico <sup>[15]</sup>.

Por otra parte, el reconocimiento de partículas virales por parte de las células inmunitarias residentes en los tejidos da como resultado una respuesta local que conlleva al reclutamiento de más células inmunitarias innatas con la intención de

eliminar la amenaza. El control de la infección en el tracto respiratorio superior (el principal punto de entrada del SARS-CoV-2), la dirección del aclaramiento viral y la consiguiente resolución de la respuesta inmunitaria activa es un factor clave para la evitar la propagación viral al pulmón y subsecuentemente el daño pulmonar. Los pacientes con COVID-19, en general, muestran un flujo esperado de células inmunes innatas, particularmente neutrófilos y monocitos en la mucosa nasofaríngea en respuesta a la secreción de quimiocinas producidas por las células epiteliales infectadas (por ejemplo, CXCL1, CXCL3, CXCL6, CXCL15, CXCL16 y CXCL17) [7,8,16].

### 1.2.2 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta adaptativa es la segunda línea de defensa para la eliminación del SARS-CoV-2 a través de la destrucción de las células infectadas y la producción de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus por parte de las células T y B activadas, respectivamente. Sin embargo, se ha reportado linfopenia en pacientes críticos con COVID-19 principalmente en los compartimentos T CD4<sup>+</sup> y las células T CD8<sup>+</sup> [17]. Varios procesos han sido asociados a este fenómeno causado por COVID-19, como la piroptosis inducida por citocinas y apoptosis de los linfocitos, daños estructurales en órganos linfáticos, el secuestro de linfocitos en los pulmones u otros órganos, y la hematopoyesis reducida en la médula ósea, entre otros [9, 17,18].

Respecto al compartimento de células T, se ha observado un infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> en el tejido infectado, considerando estas células como uno de los componentes claves [19]. Sin embargo, en un punto del desarrollo de la infección, las células infiltradas presentan un fenotipo exhausto y a su vez, en pacientes con enfermedad grave o crítica presentan un decremento en periferia de este compartimento [20]. Además, la sobreactivación de las células T CD8<sup>+</sup> induce respuestas de citotoxicidad deletéreas, lo que provoca daño tisular [21].

Por otro lado, un fenómeno importante es la reducción de este último compartimento. Se ha reportado que el SARS-CoV-2 puede interactuar a través de la proteína S con las moléculas de superficie CD147 o CD26 en las células T y así afectar sus proporciones [22]. Otro mecanismo puede deberse a la secreción de citocinas como IFN-

$\alpha$  e IFN- $\beta$  secretadas por macrófagos, que pueden causar inducir apoptosis en las células T [23]. Adicionalmente, las células T reguladoras (Treg), que desempeñan un papel fundamental en regular la respuesta inmune, también presentan alteraciones en pacientes con COVID-19 [24,25]. Respecto a las células T cooperadoras (Th1 y Th17) se ha documentado una sobreactivación que promueve la activación de células B para la producción de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 [26,27]. También se ha reportado la existencia de células T CD4<sup>+</sup> de memoria, posterior a estimularlas, activan a las células B y otras células del sistema inmune mediante de la producción de citocinas, mientras que las células T citotóxicas de memoria contribuyen a la destrucción de las células huésped infectadas durante la infección posterior por COVID-19 [16, 24, 28].

Finalmente, se sabe que al finalizar la infección primaria por SARS-CoV-2, la respuesta humoral está activa mediante la estimulación de las células cooperadoras T CD4<sup>+</sup> o la interacción directa con el virus. Se ha encontrado que la respuesta humoral contra el SARS-CoV-2 es similar a la de otras infecciones por coronavirus, lo que implica la producción característica de IgG e IgM. Al inicio de la infección por SARS-CoV, las células B provocan una respuesta temprana contra la proteína N, mientras que los anticuerpos contra la proteína S pueden detectarse después de 4 a 8 días desde la aparición de los síntomas iniciales [29,30]. Se ha descrito que los anticuerpos secretados por las células plasmáticas pueden contribuir a la eliminación de las células infectadas al unirse a los antígenos virales y conducir a la citotoxicidad dependiente de anticuerpos por las células asesinas naturales (NK) [31]. Aunque los anticuerpos son componentes vitales en la eliminación de virus, se ha descrito que algunos anticuerpos pueden promover la entrada de las partículas virales en un fenómeno llamado ADE (Antibody-Dependent Enhancement) [32].

Como se mencionó, la respuesta inmune de los sitios blancos de entrada es importante para prevenir el progreso de la enfermedad. En este contexto, la inmunoglobulina A secretora (IgA) protege la mucosa del tracto respiratorio contra el SARS-CoV-2, y se considera la inmunoglobulina clave para neutralizar la entrada del SARS-CoV-2. En pacientes con COVID-19, la IgA se libera antes que otras inmunoglobulinas, permanece más tiempo que la IgM y estimula la producción de citocinas proinflamatorias como la

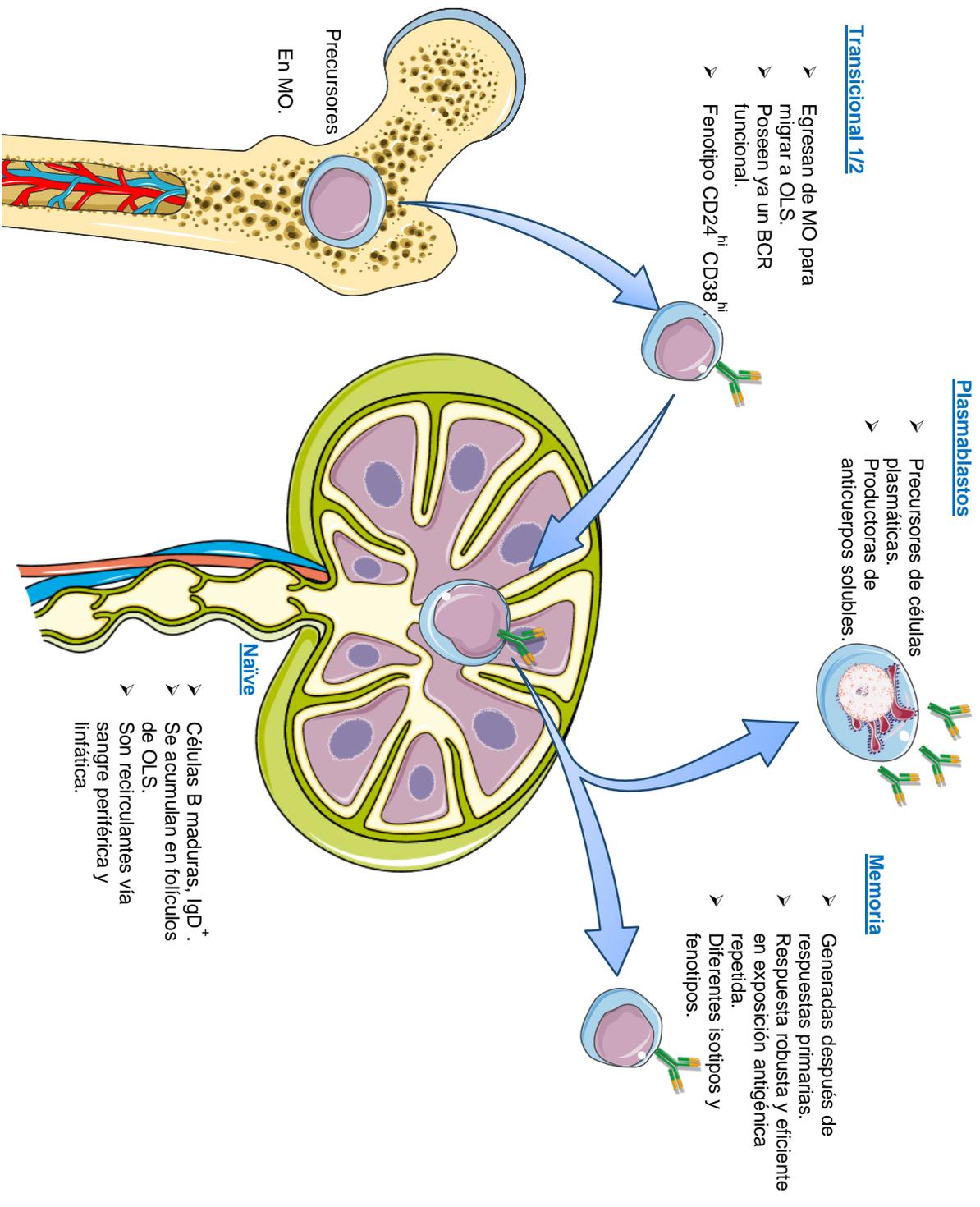
proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) y la interleucina-6 (IL-6) [33, 34]. A razón con la temporalidad, se reportó que la IgA anti-SARS-CoV-2 presente en la saliva de los pacientes puede permanecer durante tres meses después de la aparición de los síntomas [35]. Interesantemente, los títulos elevados de IgG e IgA están asociados con casos graves, cuestionando la capacidad para neutralizar las partículas virales [36].

La presencia de las células B así como el título de anticuerpos se ha relacionado con promover la expresión varias citocinas como IL-2, IL-6, MCP, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en pacientes con SARS-CoV-2 [37,38]. A pesar de que se ha documentado la respuesta de las células B asociada con la producción de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2, aún se desconoce los cambios en los diferentes compartimentos de las células B debido al entorno inflamatorio, así como la vía de activación y los mecanismos moleculares subyacentes en los pacientes con COVID-19.

### **1.3 Células B**

#### **1.3.1 Ontogenia y activación de las células B**

Las células B o linfocitos B representan un compartimento celular que a través del microscopio se observa como células monótonas y simples, pero posee un desarrollo complejo y múltiples funciones para proteger al organismo. Este compartimento celular requiere de una serie de estadios celulares para poder efectuar su función y generar memoria (Fig. II). Posterior a un primer encuentro contra un antígeno, tiene la capacidad de generar células B de memoria y células plasmáticas, estas últimas son productoras de anticuerpos (inmunoglobulinas) contra diferentes epítomos de un antígeno que ayudan a neutralizar la amenaza.



**Transicional 1/2**

- Egresan de MO para migrar a OLS.
- Poseen ya un BCR funcional.
- Fenotipo  $CD24^{hi} CD38^{hi}$

**Plasmablastos**

- Precursores de células plasmáticas.
- Productoras de anticuerpos solubles.

**Memoria**

- Generadas después de respuestas primarias.
- Respuesta robusta y eficiente en exposición antigénica repetida.
- Diferentes isotipos y fenotipos.

**Naive**

- Células B maduras,  $IgD^{+}$ .
- Se acumulan en folículos de OLS.
- Son recirculantes vía sangre periférica y linfática.

Figura II. **Desarrollo de células B en la periferia.** Las células B inmaduras que poseen un BCR funcional emigran de médula ósea, en periferia se denominan células B transicionales. Después de una serie de check-points para eliminar células autorreactivas y entrar a circulación, estas células se convierten en células B naïve, las cuales recirculan en vasos sanguíneos y linfáticos para encontrar su antígeno. Una vez que entran en contacto con su antígeno, comienza su fase de activación para diferenciarse hacia células B de memoria y células secretoras de anticuerpos. Imagen elaborada en © 2023 BioRender.

El primer paso del desarrollo de las células B, comienza en la médula ósea, donde realizan un proceso de maduración para generar un receptor antigénico funcional (receptor de célula B – BCR). En este nicho están involucradas las células estromales que a partir de citocinas y un contacto directo, promueven la maduración de este linaje. El primer estadio de este linaje es el progenitor de células B (pro-B), esta fase se caracteriza por iniciar las primeras uniones de los arreglos  $D_HJ_H$  en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*). Posteriormente, la siguiente fase se denomina precursor de células B (pre-B), que se caracteriza por presentar un rearrreglo completo V(D)J en el locus de la *IGH* y subsecuentemente un pre-BCR [39,40]. Este receptor provisional es expresado transitoriamente en la membrana para probar su funcionalidad de la combinación  $V_HD_HJ_H$ . Solamente los precursores que presentan un BCR con sus cadenas H y L completamente funcionales, pueden sobrevivir y egresar como células B inmaduras [39,40]. Para poder emigrar de la médula ósea expresan nuevas moléculas de adhesión y receptores de búsqueda para viajar a través del torrente sanguíneo o vasos linfáticos y llegar a tejido linfoide secundario para terminar su maduración y diferenciación [39,40]. En este estadio se identifican como células B transicionales, estas células migran hacia el bazo para seguir madurando, donde a través de una producción local de la citocina BAFF (factor activador de las células B), esencial para su transición y sobrevivencia. Existen dos ejes para su maduración, uno de ellos es recircular por el sistema linfoide, para convertirse en células B foliculares. Por otra parte, otras células se mueven de la pulpa roja del bazo hacia la zona marginal, y se convierten en células B de zona marginal [41,42]. Al establecerse en los folículos linfoides o en la zona marginal del bazo, se les denomina células B naïve. Este estadio de células B puede activarse de 2 formas. La primera es independiente de la cooperación con células T. Esta forma promueve relativamente una respuesta rápida frente a los invasores. Usualmente las células B de zona marginal del bazo responden de esta forma a la mayoría de los

antígenos. Sin embargo, no realizan cambios de isotipo o hipermutación somática, por lo tanto, producen en su mayoría IgM con una diversidad limitada [39,41]. Por otro lado, la segunda forma requiere la cooperación de las células T. Para iniciar su activación y diferenciación es importante que las células B naïve reconozcan su antígeno a través del BCR, establezcan una sinapsis inmunológica con una célula T cooperadora CD4<sup>+</sup> y sus receptores de membrana interaccionen con las citocinas del medio. En busca de tener su primer encuentro con el antígeno las células B viajan hacia los folículos del nódulo linfático por un gradiente de CXCL13 [43]. Ahí, posterior al reconocimiento a través del BCR, estimulan y preservan la expresión de CD40. Mientras que algunas células presentadoras de antígeno (CPAs) que han fagocitado y procesado el antígeno, lo presentan mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T cooperadores naïve para promover su proliferación y la expresión de CD40L [44]. Adicional a estos estímulos, diversas citocinas como IL-4, IL-2, IL-5, IL-10, IFNs y TGF- $\beta$  promueven su proliferación y su diferenciación hacia células plasmáticas y células B de memoria [44].

#### Reacción de centro germinal

La reacción de centro germinal (CG) es un fenómeno biológico que se caracteriza por ser un proceso selectivo. El microambiente de este nicho se caracteriza por una competencia a muerte entre las células B para utilizar los escasos recursos del medio, con el fin de prevalecer en la posteridad a través de rondas de división celular, mutación somática y selección. En efecto, las células B que sobreviven se caracterizan por ser altamente eficientes en subsecuentes encuentros a través de su alta afinidad en el BCR. Previo a la lucha por sobrevivir, las células B deben tener una interacción exitosa con las células T, posteriormente regulan a la baja la presencia de EB12 (receptor acoplado a proteínas G inducido por el virus de Epstein-Barr 2) para poder acceder a la reacción de CG [45]. El proceso incluye diferentes estructuras anatómicas dentro del CG: la zona oscura (ZO) es donde las células B llevan a cabo la expansión clonal y la hipermutación somática, después se trasladan a la zona clara (ZC) donde interaccionan con las células dendríticas foliculares y células T foliculares, para evaluar su afinidad [46,47]. Los factores que se han estudiado a lo largo de los años y que están implicados en la reacción de

CG son: la señalización del BCR, los mediadores solubles presentes (citocinas y quimiocinas), la interacción con las células dendríticas foliculares y las células T CXCR5+BCL6+PD-1<sup>+</sup>; estas últimas claves en diferentes fases de la reacción de CG mediante la secreción de citocinas y envío de señales de supervivencia. La interacción con estas células se da mediante moléculas coestimuladoras como CD40 e ICOS, mediadores solubles como BAFF, y citocinas de soporte como IL-4 e IL-21 [48]. Dependiendo de la afinidad mostrada, las células B pueden circular entre las dos zonas mediante un gradiente de citocinas y quimiocinas. La proteína encargada de generar diversidad es la desaminasa de citosina inducida por activación (AID) que se expresa altamente en células B naïve activadas que se encuentran en la ZO; así, la diversidad es generada por la acumulación de mutaciones en el BCR y la tendencia a errores [47]. En caso de que el BCR no sea funcional, las células B de CG pueden regresar a la ZO para más procesos de división/hipermutación, con el fin de egresar como células de memoria o células plasmáticas o en su defecto mueren por apoptosis [49].

#### Vía Extrafolicular (T-independiente)

Independientemente de la reacción de CG, se han descrito otras formas para adquirir una respuesta humoral. Un factor importante implicado es el tipo de antígeno, se ha descrito que los polisacáridos pueden activar las células B para una robusta y rápida secreción de anticuerpos, incluso en ausencia de células T y fuera de los folículos [49]. A esta vía se conoce como activación extrafolicular (EF). Acerca de esta vía, algunos trabajos han descrito deficiencias en el desarrollo de memoria, sin embargo, se ha reportado que es posible generar memoria a partir de antígenos T-independientes, como dextranos o lipopolisacáridos [50-52]. Esto se reportó en un modelo murino experimental con *Streptococcus pneumoniae*, en el cual identifican una subpoblación de células B de memoria T-independiente que se expande posterior a la inoculación, además de presentar una respuesta antígeno-específica dependiente de IgG [53]. Esto resulta un fenómeno interesante que no ha sido descrito a profundidad, ya que podría desempeñar un papel fundamental en la defensa contra patógenos.

#### Vía extrafolicular (T-dependiente)

Por otro lado, se sabe que uno de los factores claves para determinar el desarrollo de una célula B es la sinapsis inmunológica con la célula T. Aunque en gran medida la respuesta de CG se debe a una cuestión de afinidad del BCR, ahora se ha descrito que la interacción con las células T y las vías de señalización de receptores innatos tienen un papel importante. Se ha reportado que la secreción de IL-21 en el borde de células T-B por una subpoblación temprana de células T foliculares BCL6<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>, es esencial para el cambio de isotipo en el inicio de la respuesta EF en órganos linfoides secundarios (OLS) [54]. Hoy en día, también se ha descrito un fenotipo de células T cooperadoras periféricas como apoyo a la respuesta EF en tejido inflamado. En contraste con las células que ingresan al CG, las células B de la respuesta EF parece ser que mantienen su expresión de EBI2, además de expresar otros quimiorreceptores como CXCR4 y CXCR3. La expresión de estos quimiorreceptores evita el ingreso al folículo. En otros sitios anatómicos como el bazo, se ha descrito que las células dendríticas de la zona marginal brindan soporte a la respuesta EF T-dependiente al habilitar a las células B para la presentación antigénica [49]. Las células B activadas se diferencian en precursores de células plasmáticas para después convertirse en células secretoras de anticuerpos funcionales.

Aunque las células plasmáticas derivadas de la vía EF se consideran de baja afinidad (por la ausencia de hipermutación somática y selección clonal) y vida corta, trabajos recientes muestran que, en modelos murinos y en algunos procesos infecciosos en humanos, se ha demostrado que son esenciales en el control temprano de la infección en orden de establecer una respuesta humoral tradicional [53,55]. Además, las características de esta respuesta EF pueden prevalecer como en el caso de lupus eritematoso generalizado (LEG) [49,53,56].

También, se ha descrito esta vía con diversos antígenos virales. Respecto a infecciones con retrovirus, la vía EF promueve una respuesta compleja con probable relación con la patogénesis de la enfermedad. En relación con ello, en un modelo de virus del tumor mamario de ratón, la adquisición temprana de antígenos por parte de las células B y la formación de plasmablastos vía EF son factores clave en la diseminación del retrovirus a través de tejidos linfoides y no linfoides, además, inician una respuesta deletérea anti-

retroviral de las células B <sup>[57]</sup>. Por otro lado, se ha descrito que el herpesvirus humano 8 (HHV-8), en coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causa un trastorno linfoproliferativo llamado enfermedad de Castleman, caracterizado por una sobreproducción policlonal extrafolicular derivada de células B semejantes a plasmablastos <sup>[58]</sup>. Ciertamente ahora se conocen más detalles acerca de estas vías de activación (Fig. III), sugiriendo que independientemente de lo descrito en condiciones patológicas también podrían tener un papel protector en procesos infecciosos.

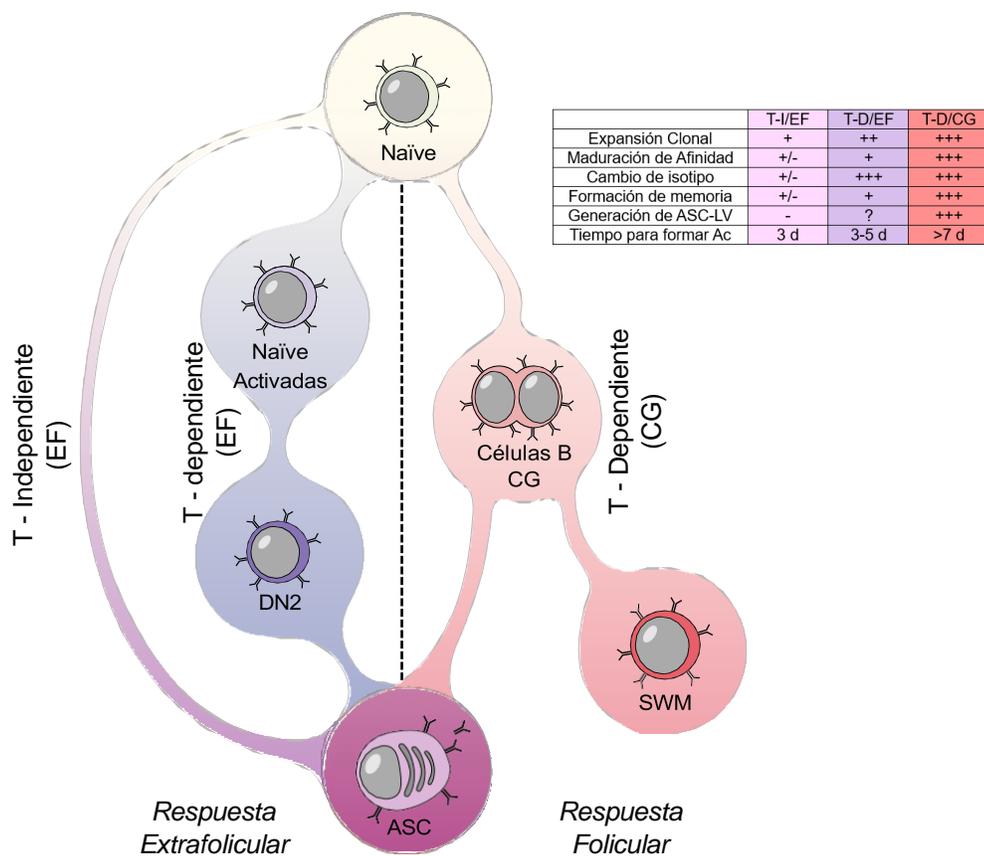


Figura III. **Vías de activación de las células B.** Esquema de las 3 vías de activación y diferenciación efectora. Las características de la vía extrafolicular se ha descrito principalmente en modelos animales, ha sido poco determinada en humanos. La respuesta independiente de células T (izquierda/rosa) da como proceso el cambio directo de células B naïve a ASC en un periodo corto de tiempo. La respuesta dependiente de células T EF (centro/violeta), presenta un proceso más largo, mayor expansión clonal, cambio de isotipo y formación de memoria en su contraparte con la T-I. La reacción de centro germinal (CG) (derecha/rojo), presenta, mayor afinidad, formación de memoria, desarrollo de células plasmáticas de larga vida, pero requiere mayor tiempo. Imagen obtenida de Scott A. J. et al., 2019 <sup>[49]</sup>.

### 1.3.2 Funciones de células B

Además de su principal función como mediador de la inmunidad humoral, se ha demostrado y descrito que las células B pueden efectuar otras funciones independientemente de la producción de anticuerpos. En primer lugar, mediante la estimulación del BCR, receptores tipo Toll (TLR) y/o CD40L, las subpoblaciones de células B en humano y ratón, son activadas y pueden secretar citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-35 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), así como su contraparte, citocinas proinflamatorias como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) [58-62]. Como se ha documentado, estas citocinas, a su vez, ejercen un efecto en la respuesta de diversas células del sistema inmunológico, también participan directamente en el desarrollo y la supresión de procesos autoinmunes tanto en humanos como en modelos murinos [63-65]. Además, tras la activación vía BCR y la estimulación con IL-21, las células B pueden secretar la molécula citotóxica granzima B, que puede desempeñar un papel importante en las respuestas tempranas antivirales y en la regulación de procesos autoinmunes [66]. Las células B también tienen un impacto directo en la funcionalidad de las células T, a través de la sinapsis inmunológica, ya que pueden servir como células presentadoras de antígenos, por lo tanto, promueven la respuesta mediada por células T y proporcionan señales coestimuladoras a las células T [67-70]. Además, las células B humanas expresan receptores TLR, como TLR7 y TLR9, los cuales pueden reconocer material genómico viral. En las células B, el reconocimiento de ligandos por parte de los TLR promueve su activación, la presentación antigénica, la proliferación, el cambio de isotipo y su diferenciación a células secretoras de anticuerpos [71,72].

## 1.4 Células B DN (CD27-IgD<sup>-</sup>)

### 1.4.1 Origen y función de las células B DN

Considerando que las células B son un componente esencial en el sistema inmunológico, desempeñando un papel crucial en la respuesta adaptativa por su capacidad para diferenciarse a células secretoras de anticuerpos brindando una

respuesta antígeno-específica de larga duración. Adicionalmente posee habilidades compartidas con otras linajes de células del sistema inmune como secretar citocinas y presentar antígenos.

Sin embargo, independientemente de sus funciones protectoras, las células B pueden desempeñar un papel fisiopatológico. Por un lado, problemas en su desarrollo o activación merman su actividad o función generando trastornos de inmunodeficiencias. En contraparte, estas células pueden desempeñar un papel perjudicial en las enfermedades autoinmunes, produciendo autoanticuerpos y la secretando citocinas, estableciendo así microambiente proinflamatorio.

En este contexto, un atípico compartimento de células B ha sido identificado, y se ha tratado de caracterizar a lo largo de los últimos 20 años. En primera instancia, al evaluar el efecto terapéutico del anticuerpo anti-CD40L en pacientes con nefropatía lúpica, se detectó una expansión en las células B CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> denominadas dobles negativas (DN) [73-75]. A la par, en otro estudio realizado por Warnatz y colaboradores, analizando pacientes con inmunodeficiencia común variable (IDCV) y un grupo de pacientes LEG, encontraron un incremento en las células B CD21<sup>lo/-</sup> [73-75]. Así mismo, en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), presentaron una expansión de las células B CD21<sup>lo/-</sup> [73-75]. Igualmente, además de pacientes con VIH, infección por *Plasmodium falciparum*, infecciones por los virus de la hepatitis B y C, pacientes con tuberculosis han presentado alteraciones en las proporciones de células B circulantes T-bet<sup>hi</sup>CD21<sup>lo</sup> [73-75].

Alrededor de una década y múltiples reportes en diferentes condiciones patológicas, procesos infecciosos y trastornos inmunológicos, se identificó su homólogo en el modelo murino; las células B CD21<sup>lo/-</sup> homologas fueron identificadas en un ratón femenino de edad avanzada y con predisposición a la autoinmunidad [76]. Entonces se denominaron *age-associated B cells* (ABCs) [73-76]. Independientemente del modelo, las células B CD21<sup>lo/-</sup> y las ABCs, presentaban un fenotipo similar incluido la baja expresión de CD21 y la presencia del factor de transcripción T-bet (regulador clave en las células Th1). En el camino de caracterizar esta subpoblación, se han descrito diversos fenotipos que se traslapan entre sí. Esto ha sido complejo y confuso generando diversas

nomenclaturas como células B CD21<sup>lo/-</sup>, células B *tissue-like* de memoria FcRL4<sup>+</sup>, células B de memoria atípica CD21<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, células B CD11c<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>, células B DN2 IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>, entre otros. Sin embargo, algo que está claro es que existen diversos estadios acorde al isotipo del BCR y la expresión de CD27 [56,73-76].

Desde que se describieron las ABCs, se reportó que la estimulación con IFN $\gamma$  y TLR, así como la señalización del BCR estaban implicados como factores clave para el desarrollo de esta subpoblación. Posteriormente, se ha reportado en este mismo proceso, la participación de las células T a través de IL-21 y CD40L, primero en ratón y después en humanos [73,74]. En LEG la señalización a través de TLRs es prominente, en contraparte, en un extenso número de pacientes con inmunodeficiencias primarias asociados a defectos monogénicos, la señalización con el receptor de IFN $\gamma$  y la vía canónica de NF- $\kappa$ B son cruciales para la diferenciación de células B T-bet<sup>hi</sup> CD21<sup>lo/-</sup> in vitro e in vivo [56,77]. Interesantemente, estas células se expanden en sitios con una alta incidencia de células T cooperadoras que se encuentran en periferia (Tph) [78,79]. Un aspecto interesante es que las células no requieren la presencia de T-bet para expandirse en el modelo murino, hecho que es semejante en un paciente deficiente de T-bet [80]. Lo que nos sugiere que no debemos descartar que pueden existir otros factores de transcripción cruciales en la configuración de las mismas a pesar de que T-bet esté expresado en esta subpoblación.

Respecto a su papel funcional, se ha descrito en cocultivos de células B CD11<sup>hi</sup> CD21<sup>lo</sup> con células T CD4<sup>+</sup> activadas, las células B pueden diferenciarse a células plasmáticas. Adicionalmente, estas células secretoras de anticuerpos pueden producir cantidades de anticuerpos similar las células plasmáticas derivadas de células B de memoria CD27<sup>+</sup> [56]. Interesantemente, el incremento del porcentaje de estas células presenta una correlación positiva con la presencia de células plasmáticas y con distintos autoanticuerpos IgG en LEG [56]. En el mismo sentido, en pacientes con IDCv, las células B CD21<sup>lo</sup> presentan el isotipo autorreactivo 9G4. Además, estas células se caracterizan por una expresión elevada de los quimiorreceptores CXCR3 y CXCR6, en lugar de los receptores homeostáticos CXCR5 y CCR7, lo que promueve su reclutamiento a los sitios de inflamación [81].

La incógnita prevalece respecto a sí estas células que se expanden en respuestas EF exageradas, como indican los reportes en LEG y otras enfermedades autoinmunes, son patogénicas en los trastornos en los que se les ha identificado o simplemente son consecuencia del estado inflamatorio deletéreo existente. Por otro lado, aunque se han descrito los estímulos responsables que promueven la diferenciación hacia el fenotipo descrito y su posible rol en un proceso autoinmune, otros aspectos de su biología aún siguen sin dilucidarse.

### **1.5 Justificación**

Considerando los aspectos previamente descritos, evidencia que independientemente de la activación folicular (CG) y su diferenciación a células plasmáticas para la secreción de anticuerpos neutralizantes existen otros mecanismos de activación, funciones y poblaciones de las células B que aún no se comprenden del todo. Las cuales pueden participar de forma benéfica o deletérea en el proceso de una enfermedad.

Por tal motivo, en el contexto de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) un proceso infeccioso emergente que representa un proceso heterogéneo en cuanto a la respuesta inmunológica. Surge la necesidad de determinar la respuesta de células B y el microambiente que las rodea, con el fin de resolver la incógnita acerca de sí las células B guían y/o promueven una respuesta inmune fisiológico o patológica, o simplemente son resultado del ambiente inflamatorio preexistente. Además, de comprender el ambiente que favorece la expansión o reducción de los diferentes compartimentos de las células B.

## **1.6 Hipótesis, objetivo general y objetivos particulares**

### Hipótesis

Los pacientes con COVID-19 presentan cambios en los diferentes compartimentos de células B de sangre periférica, los cuales definen grupos de pacientes que se asocian con el estado clínico de la enfermedad y correlacionan con parámetros biológicos.

### Objetivo general

Determinar las subpoblaciones de células B presentes en sangre periférica de controles sanos y pacientes con COVID-19, para correlacionarlas con parámetros biológicos (variables clínicas y de laboratorio), y explorar su asociación con la severidad de la enfermedad.

### Objetivos particulares

- Determinar y comparar las subpoblaciones de las células B de pacientes con COVID-19 así como de controles sanos a través de citometría de flujo multiparamétrica.
- Evaluar la expresión de CXCR5 y T-bet en los diferentes compartimentos de células B y compararlos entre los diferentes grupos de estudio.
- Explorar correlaciones entre los diferentes compartimentos de células B y los parámetros biológicos (variables clínicas y de laboratorio).
- Evaluar el compartimento doble negativo y su asociación con a la clínica del COVID-19.

## **Capítulo 2.**

### **Materiales y métodos**

## Grupo de estudio

Se reclutaron un total de 91 pacientes con COVID-19 y 15 donantes sanos mayores de 18 años en un centro de tercer nivel de atención en la Ciudad de México, México (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán). Todos los pacientes con síntomas sugestivos de COVID-19 confirmados por una prueba de PCR positiva para SARS-CoV-2 a través de hisopado nasofaríngeo fueron invitados a ser participantes del proyecto. Al ingreso, se tomaron los signos vitales y las muestras sanguíneas para los parámetros de laboratorio y análisis celular. De igual forma la severidad de la enfermedad se categorizó al ingreso, de la siguiente forma: enfermedad leve/moderada, enfermedad grave y enfermedad crítica, las características evaluadas se muestran en la tabla 1 [82]. Además, se determinó la Puntuación Nacional de Alerta Temprana (NEWS) para cada paciente.

Tabla 1. **Criterios para categorizar la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19).**



<b>Enfermedad Leve/Moderada</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fiebre y signos agudos de infección respiratoria.</li><li>• Con o sin imagen de TAC que indique neumonía.</li></ul>
<b>Enfermedad Grave</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alguno de los siguientes signos: Insuficiencia respiratoria, FR &gt; 30 min, SpO<sub>2</sub> &lt; 92% en reposo, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> &lt; 300 mmHg.</li></ul>
<b>Enfermedad Crítica</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alguno de los siguientes datos: necesidad de ventilación mecánica, choque o falla orgánica concomitante.</li></ul>

Se reclutaron como controles sanos a individuos ausentes de signos o síntomas de infección respiratoria y negativos a la prueba de PCR. Todos los individuos reclutados firmaron un consentimiento informado antes de la inclusión. Los Comités Institucionales de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (México) aprobaron el estudio (Ref. 3341) en cumplimiento de la declaración de Helsinki.

Se recolectaron datos demográficos y parámetros biológicos (Tablas complementarias 1 y 4) incluyendo sexo, edad, días con los síntomas, síntomas (tos, cefalea, fiebre, disnea, artralgia, mialgia, odinofagia, congestión nasal/conjuntival, náuseas o vómitos, diarrea y fatiga), signos vitales como presión arterial media, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno (SO<sub>2</sub>) y temperatura. Solo para pacientes, se tomaron exámenes de laboratorio de rutina, incluyendo hemograma completo, glucosa, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (Cr), pruebas de función hepática, proteína C reactiva (PCR), lactato deshidrogenasa (LDH), creatina fosfocinasa (CPK), fibrinógeno, dímero-D, pruebas de coagulación y ferritina. Se documentaron el uso soporte respiratorio, las complicaciones (choque o infecciones secundarias) y los resultados. También se calcularon las siguientes puntuaciones de gravedad de la enfermedad para estos pacientes: qSOFA (evaluación rápida de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis: identifica a los pacientes fuera de la unidad de cuidados intensivos (UCI) con sospecha de infección que tienen un alto riesgo de mortalidad hospitalaria), NEWS (puntuación nacional de alerta temprana: determina el grado de enfermedad y solicita la intervención de cuidados intensivos), PSI-PORT (índice de gravedad de neumonía/equipo de investigación de resultados de pacientes con neumonía: calcula la probabilidad de morbilidad/mortalidad entre los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad).

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes y controles con una prueba de RT-PCR realizada en el exterior de la institución.
- Pacientes con una prueba de RT-PCR no concluyente.
- Pacientes y controles con enfermedades pulmonares concomitantes (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, fibrosis).
- Pacientes y controles con procesos infecciosos crónicos (síndrome de inmunodeficiencia humana, tuberculosis).
- Pacientes y controles con enfermedades autoinmunes o Cáncer.
- Pacientes con régimen terapéutico inmunosupresor.
- Mujeres embarazadas o en puerperio.

## **Criterios de eliminación**

Muestra insuficiente para el análisis contemplado

## **Obtención de células mononucleares de sangre periférica y suero**

Se obtuvieron 20-30 mL de sangre periférica mediante punción venosa con sistema Vacutainer TM con tubos heparinizados (Becton, Dickinson and Company) (BD). Se hizo una dilución de la sangre con PBS (*Phosphate-buffered saline*) 1x a una relación 1:2. En un tubo cónico de 15 mL se añadieron 3 mL de Ficoll-Paque ( $\delta 1.077$  g/mL), después de ello, cuidadosamente se añadieron 10 mL de la muestra diluida con PBS. Se colocó el tubo con la muestra cuidadosamente en la centrifuga y se centrifugo durante 30 minutos, a 2000 rpm, para la obtención del componente celular mononuclear y el suero. Posteriormente se retiró cuidadosamente el tubo cónico que contenía la muestra de la centrifuga.

## **Medición de citocinas**

### **Ensayo multiplex**

Las concentraciones de seis citocinas y quimiocinas: IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-18, proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)/CCL2 y proteína inducida por interferón gamma (IP-10)/CXCL10, en el suero de los pacientes, se midieron utilizando el kit de panel de perlas magnéticas de citocinas/quimiocinas humanas MILLIPLEX MAP (EMD Millipore) en un 2- sistema de matriz de suspensión láser Bio-Plex 200 combinado con una estación de lavado Bio-Plex Pro (ambos de Bio-Rad). La técnica se realiza con microesferas que poseen dos fluorocromos distintos. Se adquirió un conjunto de microesferas de poliestireno de 5,6  $\mu\text{m}$  y microesferas magnéticas de 6,45  $\mu\text{m}$  las cuales están recubiertas con un anticuerpo de captura específico. Posterior de que la microesfera captura la citocina de interés, se introduce un anticuerpo biotinilado. A continuación, la mezcla de reacción se incuba con el conjugado de estreptavidina-PE, para completar la reacción en la superficie de cada microesfera. Cada microesfera se identificó individualmente y el resultado se cuantifico con base a la emisión de fluorescencia. El protocolo se realizó acorde con el algoritmo del fabricante. Las lecturas

de intensidad de fluorescencia de perlas para todas las muestras y estándares se convirtieron en las concentraciones de analito correspondientes empleando el software Bio-Plex Manager v6.2 (Bio-Rad). Las citocinas y quimiocinas incluidas se seleccionaron entre nuestros ensayos multiplex disponibles, de acuerdo con los informes anteriores sobre su posible utilidad como biomarcadores de pronóstico asociados con la sangre en pacientes con COVID-19 [8, 9].

## **Citometría de Flujo**

### **Tinción de superficie**

Después del aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), las células se resuspendieron en RPMI-1640 con rojo fenol (Gibco) y se realizó un conteo en la cámara de Neubauer. Brevemente, para el proceso de tinción, las células se trataron con el buffer de anticuerpos bloqueadores de FcX humanos (BioLegend) durante 10 min. La tinción de PBMCs ( $1.5 \times 10^6$  por tubo) se realizó utilizando anticuerpos monoclonales conjugados indicados en la TABLA; las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad con el cóctel de anticuerpos descrito. A continuación, se realizó un lavado con 1 mL de *staining buffer* (BioLegend) y se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 min.

### **Tinción intracelular**

Posterior al último lavado, se utilizó el kit *True-Nuclear<sup>TM</sup> Transcription Factor Buffer Set* (BioLegend) de la siguiente forma. Para fijar la muestra, se resuspendió en 500 µL de solución fijadora 1x del kit previamente comentado, la muestra con la solución fijadora se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados a la muestra con 1 mL de solución permeabilizante 1x del kit. Al finalizar los lavados la muestra se resuspendió en 100 µL de solución permeabilizante y se añadió el anticuerpo dirigido contra el factor de transcripción T-bet (tabla 2), la muestra se incubó durante 25 minutos a 4°C protegidos de la luz. Al finalizar el periodo de incubación de la muestra, se realizaron 2 lavados, el primero de ellos se adicionó 1 mL de solución permeabilizante 1x y el segundo lavado se adicionó 1mL de *staining buffer*. Finalmente, las muestras se

resuspendieron en 300 µl del mismo buffer para una lectura de citometría de flujo inmediata.

Tabla 2. Anticuerpos y reactivos usados para el análisis de citometría de flujo.

<b>Fluorocromo/molécula</b>	<b>Compañía</b>	<b>N. de catálogo</b>
Brilliant UltraViolet 496 anti-humano CD19	BD Horizon	564656
APC/Cy7 anti-humano CD27	BioLegend	302816
PerCP/Cyanine 5.5 anti-humano IgD	BioLegend	348208
Brilliant Violet 421 anti-humano CD24	BioLegend	31122
Brilliant Violet 650 anti-humano CD38	BioLegend	356620
Alexa Fluor 700 anti-humano CD21	BioLegend	354918
PE/Dazzle 594 anti-humano CD11c	BioLegend	301642
APC anti-humano CXCR5	BioLegend	356908
PE anti-humano T-bet	BioLegend	644810
Zombie Green / Colorante de viabilidad	BioLegend	423112

## Adquisición y análisis

Previamente a la lectura de las muestras, en el citómetro de flujo se realizó una estandarización de la tinción, para evitar el traslape de la emisión producida por los fluorocromos y definir los gates de las poblaciones de estudio. Esto se desarrolló con el uso de controles *Fluorescence Minus One* (FMO) para definir los gates. La compensación se realizó utilizando *CompBeads* (BD Biosciences) y muestras tinciones fluorescentes individualmente.

Las células muertas se excluyeron utilizando el colorante de viabilidad *Zombie Green* (BioLegend), así como la discriminación de eventos dobles con los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC). La lectura de muestras se realizó en el equipo BD LSRFortessa, usando el software FACSDiva (ambos de BD Biosciences). Se adquirieron aproximadamente  $1 \times 10^6$  de eventos (células). El análisis se hizo utilizando el software FlowJo V10 (BD Biosciences) con la estrategia que se muestra en la figura 1, desarrollada mediante el uso de los FMO, *CompBeads*, tinciones simples, y adicionalmente una matriz de compensación elaborada en el mismo software.

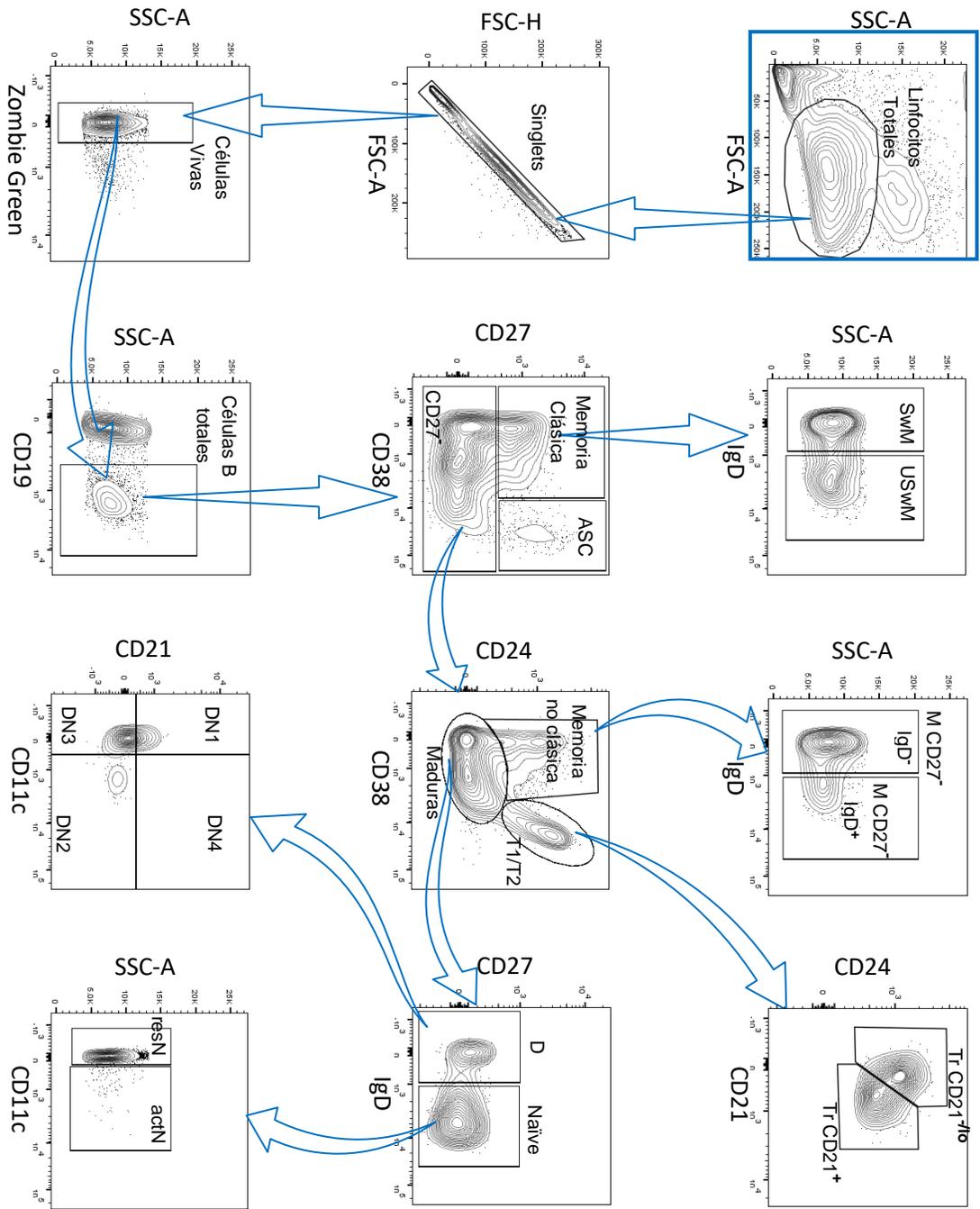


Figura 1. **Análisis de citometría de flujo de las subpoblaciones de células B.** Estrategia de análisis para la determinación de las subpoblaciones de células B en células mononucleares de sangre periférica. (Contour plot representativo de individuo sano). Previo a la determinación de subpoblaciones, se selecciona la región de linfocitos (FSC-A vs. SSC-A), posteriormente se seleccionan los eventos simples (SSC-A vs. SSC-H), después se seleccionan las células vivas Zombie Green<sup>-</sup>, finalmente se seleccionan las células CD19<sup>+</sup> y se parte de esa población para determinar las subpoblaciones.

## **Análisis bioinformático y estadístico**

Las diferencias estadísticas de los números (porcentajes/números absolutos) de las poblaciones celulares entre los grupos de pacientes acorde a la gravedad de la enfermedad se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc de Dunn empleando el software Prism 8 (GraphPad).

La agrupación jerárquica de los pacientes acorde a su severidad y los porcentajes de las poblaciones celulares determinadas se analizaron por el método de Ward (distancia euclidiana) para generar un mapa de calor con dendogramas asociados. El método de conglomerados de agrupación de vinculación con varianza mínima de Ward une los conglomerados para maximizar la probabilidad en cada nivel de la jerarquía aumentando la varianza en la dispersión dentro del grupo y mostrando relaciones claras entre los clados. Para este análisis, excluimos determinadas subpoblaciones que presentaban información estadística repetida (correlación) dentro de cada población "parental" (memoria, memoria no clásica, transicional, doble negativa, naïve) según la figura suplementaria 1; estas subpoblaciones incluyen a Tr CD21<sup>-/lo</sup> que se correlaciona altamente con el Tr CD21<sup>+</sup> que presentan un fenotipo similar, resN con su contraparte actN, y el compartimento DN4 que también se excluyó porque estaban casi ausentes en todos los individuos analizados. El análisis y el mapa de calor se generaron en el software R, v. 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria; URL <http://www.R-project.org/>).

La asociación entre los porcentajes de las subpoblaciones de células B y los índices de gravedad indicados/parámetros biológicos (variables clínicas/laboratorio) se evaluó con la correlación de Spearman, con valores representados gráficamente en la matriz. Los análisis, la matriz y los gráficos se realizaron en el software R, v. 4.0.2.

El método de análisis de componentes principales (PCA) se realizó en R-Studio (1.3), ejecutándose en el software R, v. 4.0.2. Todas las variables numéricas se escalaron para tener una varianza unitaria antes del análisis. El PCA se procesó con la biblioteca FactoMineR y se produjo gráficamente con el paquete Factoextra. Usamos la función `fviz_pca_biplot()` para representar la contribución de las variables DN y su relación con la gravedad de la enfermedad de los pacientes. Presentamos un gráfico de barras de variables usando `fviz_pca_biplot()` para visualizar la contribución global de tres dimensiones (componentes). Además, empleamos Matlab en la versión 20b para trazar la representación tridimensional del PCA.

## **Capítulo 3.**

### **Subpoblaciones de células B asociadas a la severidad de pacientes con COVID-19**

### 3.1 Resultados

A nivel de sangre periférica es posible encontrar diferentes elementos celulares del desarrollo y diferenciación de la ontogenia de las células B. Además de poder identificar a los plasmablastos, relevantes por la producción de los anticuerpos, se pueden identificar células B transicionales, naïve, memoria y células con un fenotipo atípico que pueden encontrarse alteradas numéricamente en diferentes patologías. Por esta razón, decidimos analizar y determinar las subpoblaciones de células B.

Identificamos diferentes estadios de células B a través de nuestra propia estrategia de análisis. Primero segregamos las células B totales CD19<sup>+</sup> en células B de memoria “clásica” CD27<sup>+</sup> CD38<sup>-/lo</sup>, células secretoras de anticuerpos/plasmablastos CD27<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup>, y un agregado de subpoblaciones que consisten en células B CD27<sup>-</sup>. La población de memoria fue dividida en memoria sin cambio de isotipo IgD<sup>+</sup> (USwM) y memoria con cambio de isotipo IgD<sup>-</sup> (SwM). Mientras que la población CD27<sup>-</sup> fue fraccionada en 3 categorías: 1) células B transicionales (Tr) 1 y 2 (T1/T2) que a su vez fueron fragmentadas en Tr CD24<sup>hi</sup>CD21<sup>-/lo</sup> (Tr CD21<sup>-/lo</sup>) y Tr CD24<sup>lo</sup>CD21<sup>+</sup> (Tr CD21<sup>+</sup>); 2) memoria no clásica CD27<sup>-</sup> CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-/lo</sup> que también puede segregarse en IgD<sup>+</sup> (M CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>) e IgD<sup>-</sup> (M CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>); y 3) finalmente el compartimento “maduro” que incluye la población naïve IgD<sup>+</sup> CD38<sup>-/+</sup> y las células B dobles negativas (DN, llamadas así por su fenotipo CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>). Adicionalmente, la población naïve se dividió por la expresión de CD11c en reposo (CD11c<sup>-</sup>, resN) y activas (CD11c<sup>+</sup>, actN); mientras que las DN fueron separadas en cuatro subpoblaciones (DN1-DN4), acorde a la expresión de CD11c y CD21. Todos los fenotipos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Subpoblaciones de células B y fenotipos.

<b>Células B Transicionales CD21<sup>pos</sup> (TrS)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi/lo</sup>	<b>Transicionales CD21<sup>-/lo</sup> (Tr CD21<sup>-/lo</sup>)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD21 <sup>-/lo</sup>
	<b>Transicionales CD21<sup>+</sup> (Tr CD21<sup>+</sup>)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD24 <sup>lo</sup> CD21 <sup>+</sup>
<b>Células B Naïve (Naïve)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	<b>Reposo Naïve (resN)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup>
	<b>Activas Naïve (actN)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup>
<b>Células Secretoras de Anticuerpos (ASC)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup>	<b>Células Secretoras de Anticuerpos / Plasmablastos (ASC)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup>
<b>Células B de Memoria Clásica (Memoria)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	<b>Memoria con cambio de isotipo (SwM)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>
	<b>Memoria sin cambio de isotipo (UswM)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>
<b>Células B de Memoria No-Clásica (M CD27<sup>-</sup>)</b> CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>-/lo</sup> CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	<b>Memoria No-Clásica CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> (M CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>)</b> CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>-/lo</sup> CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>
	<b>Memoria No-Clásica CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> (M CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>)</b> CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>-/lo</sup> CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>
<b>Células B Dobles Negativas (DN)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	<b>Dobles Negativas 1 (DN1)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup>
	<b>Dobles Negativas 2 (DN2)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> CD21 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup>
	<b>Dobles Negativas 3 (DN3)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> CD21 <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup>
	<b>Dobles Negativas 4 (DN4)</b> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>

Interesantemente, al momento de comparar el porcentaje total de las células B entre los pacientes y el grupo de individuos sanos no obtuvimos una diferencia significativa entre ellos salvo los pacientes con enfermedad leve/moderada y grave (Fig.2). Sin embargo, los pacientes con enfermedad grave y crítica presentan una tendencia de expansión en comparación con los pacientes con enfermedad leve/moderada y los individuos sanos.

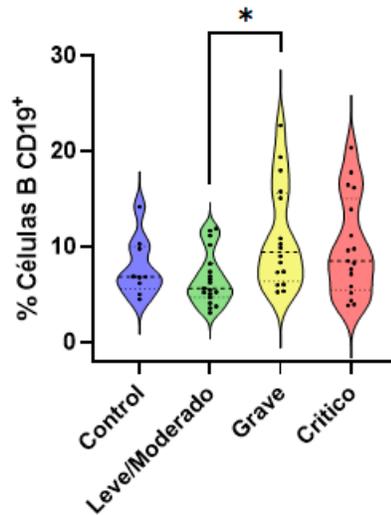


Figura 2. **Los pacientes no presentan cambio en el porcentaje total de las células B (CD19<sup>+</sup>).** Porcentaje total de las células B de células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con SARS-CoV-2 (n=52) y controles sanos (n=7, PCR de SARS-CoV-2 negativos). Los valores de los porcentajes son mostrados como la media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (líneas punteadas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \*p≤0.05.

Esto contrasta con otros reportes donde se observa un incremento en el porcentaje de las células B acorde a la severidad de la enfermedad, no obstante, también existen otros reportes donde hay una tendencia inversa [83,84]. Evaluamos la cuenta absoluta de las células B, sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles sanos, y a diferencia de los porcentajes no se observan tendencias de expansión o disminución de las células B. Adicional a que la respuesta humoral desempeña un papel importante en la severidad de la COVID-19, se puede pensar que una respuesta inmune deletérea (proceso inflamatorio exacerbado) y un ambiente hipóxico con alteraciones metabólicas puede modificar la respuesta humoral y el desarrollo de este compartimento, por esta razón decidimos evaluar las diferentes subpoblaciones de células B circulantes en sangre periférica.

## Alteraciones en los compartimentos inmaduro, efector y DN en pacientes con COVID-19.

Primero, encontramos un incremento significativo en la fracción de células B transicionales T1/T2 en los pacientes con COVID-19 comparado con el grupo de individuos sanos (Fig. 3A), el cual es más evidente en los pacientes que presentaron una enfermedad leve/moderada pero que ciertamente no pasa desapercibida esa tendencia en los pacientes graves y críticos.

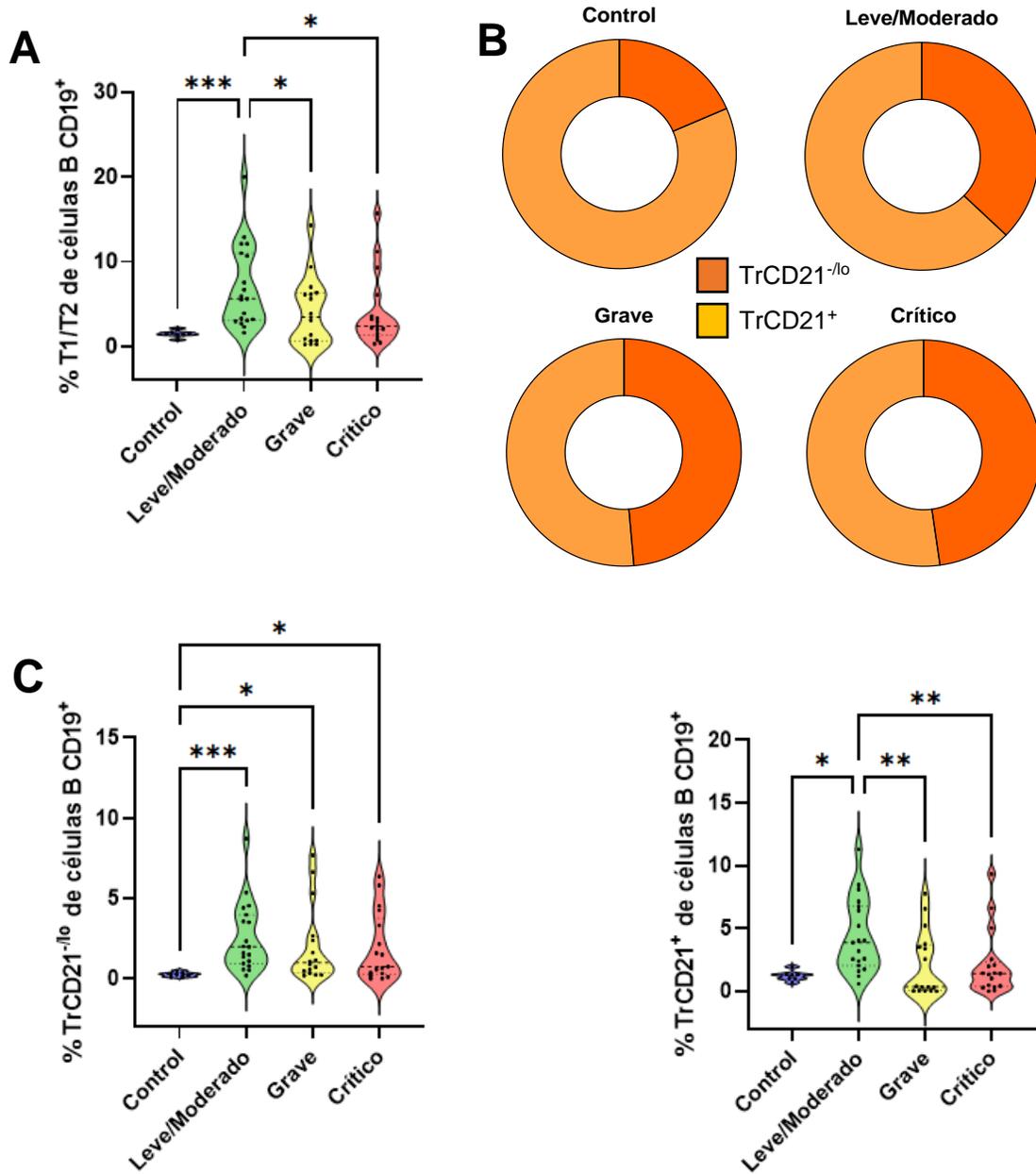


Figura 3. **Alteraciones en el compartimento transicional de las células B de los pacientes con COVID-19.** (A) Análisis comparativo del porcentaje de la población parental transicional (T1/T2) con respecto a las células B CD19<sup>+</sup>. (B) Representación gráfica de la media de los porcentajes de las subpoblaciones Tr CD21<sup>-/lo</sup> y Tr CD21<sup>+</sup>. (C) Análisis comparativo de los porcentajes de las subpoblaciones Tr CD21<sup>-/lo</sup> y Tr CD21<sup>+</sup> en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. Los valores de los porcentajes son mostrados como la media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (líneas punteadas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001.

En otros estudios se observa un decremento de esta fracción celular en pacientes y críticos graves en comparación con grupos de individuos sanos. Al fragmentar esta subpoblación según su fenotipo, detectamos un cambio en las proporciones de estas subpoblaciones acorde a su media, una expansión de la subpoblación Tr CD24<sup>hi</sup>CD21<sup>-/lo</sup> más evidente en los pacientes graves y críticos (Fig. 3B). No obstante, al evaluar de forma independiente las 2 subpoblaciones, es evidente el incremento de ambos compartimentos TrCD21<sup>-/lo</sup> y TrCD21<sup>+</sup> (Fig. 3C) en los pacientes con COVID-19 y esta expansión es más notable en los casos con enfermedad leve/moderada pero también en el curso de los pacientes graves y críticos.

Continuamos con el análisis comparativo de las células plasmáticas, y es evidente el incremento de este compartimento efector, más notable en el curso grave y crítico de la enfermedad (Fig. 4B). Este resultado ciertamente es consistente con otros reportes. Por otro lado, al comparar la subpoblación de memoria clásica se observa una disminución en los pacientes críticos y graves, más evidente en estos últimos en relación con los individuos sanos (Fig. 4A). Realizamos un análisis de la distribución de las medias de estas poblaciones, fragmentando el compartimento de memoria en células con cambio de isotipo y células sin cambio de isotipo (Fig.4B). Se puede observar que hay un incremento en la proporción de los plasmablastos en el curso de la severidad de la enfermedad comparado con los individuos sanos, mientras que no es evidente algún cambio en las subpoblaciones de memoria. No obstante, al realizar el análisis individual hay un decremento en ambas subpoblaciones en los pacientes con COVID-19, que es más evidente en los pacientes con enfermedad grave (Fig.4C).

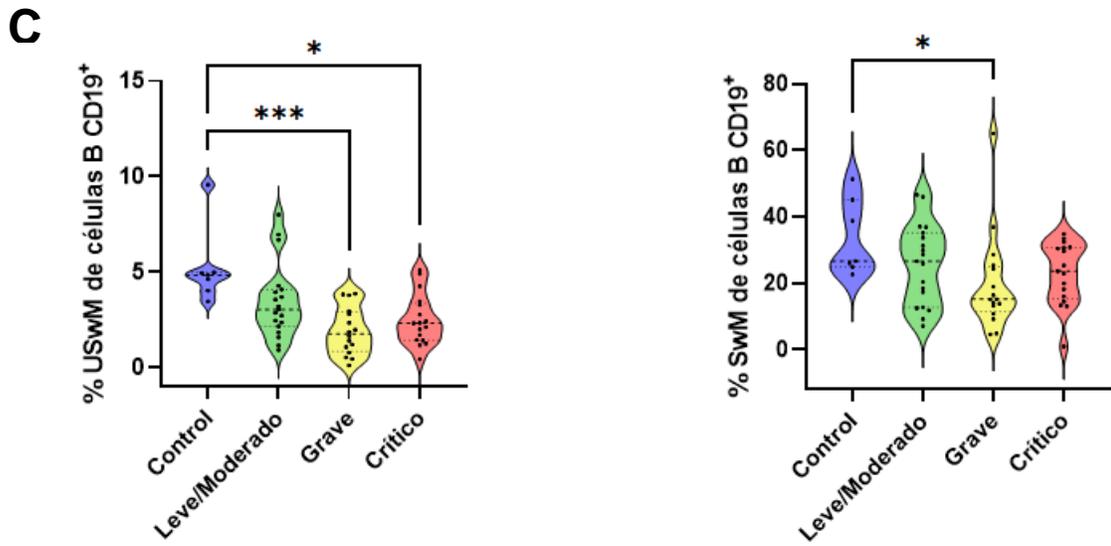
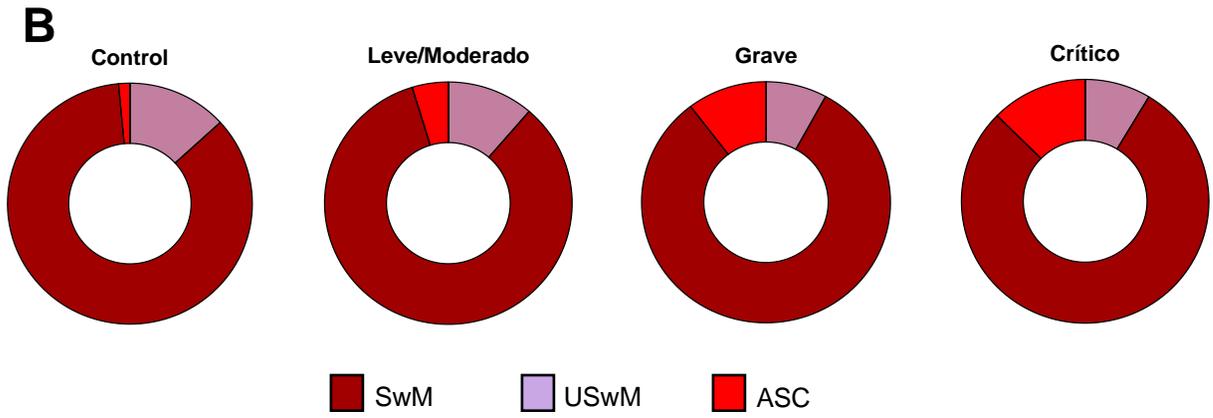
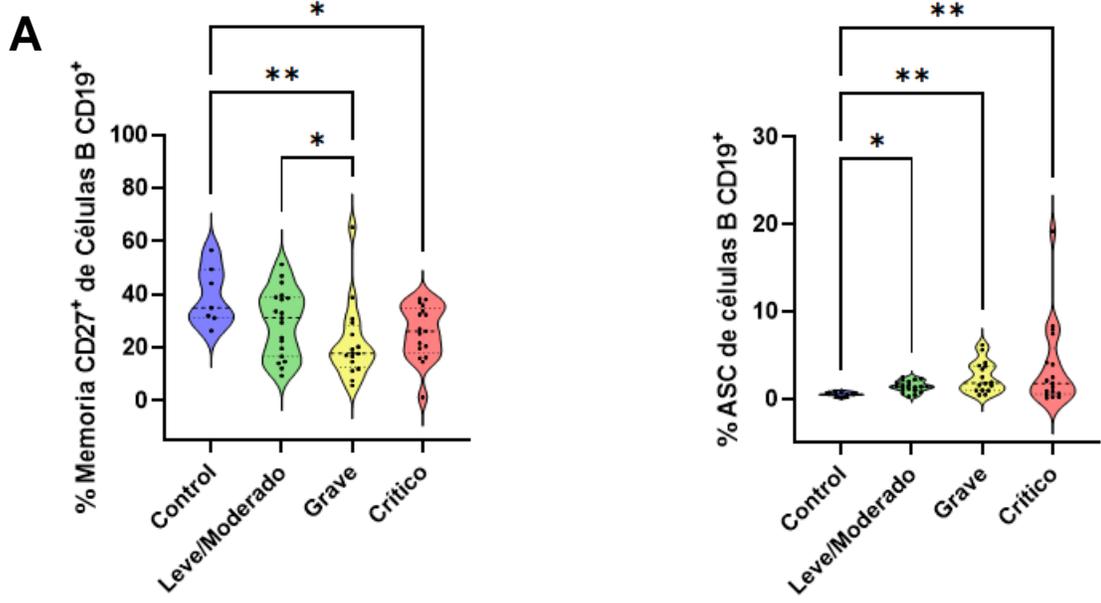


Figura 4. **Alteraciones en el compartimento efector de las células B de los pacientes con COVID-19.** (A) Análisis comparativo de los porcentajes de las células plasmáticas (ASC) y la población parental de memoria clásica en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. (B) Representación gráfica de la media de los porcentajes de las subpoblaciones ASC, USwM y SwM de los pacientes con COVID-19 y controles sanos. (C) Análisis comparativo de los porcentajes de las subpoblaciones SwM y USwM en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. Los valores de los porcentajes son mostrados como la media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (líneas punteadas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \**p*≤0.05, \*\**p*≤0.01, \*\*\**p*≤0.001.

Respecto a la población de células B memoria no clásica (CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>-</sup>), no se observaron cambios entre los grupos de pacientes y los individuos sanos; de igual forma al fragmentar la población parental por la expresión de IgD no se observan cambios entre los grupos de análisis (Fig. 5A). El conjunto total de células B naïve mostró el mismo comportamiento entre controles sanos y pacientes con COVID-19 independientemente del curso de la enfermedad (Fig. 5B).

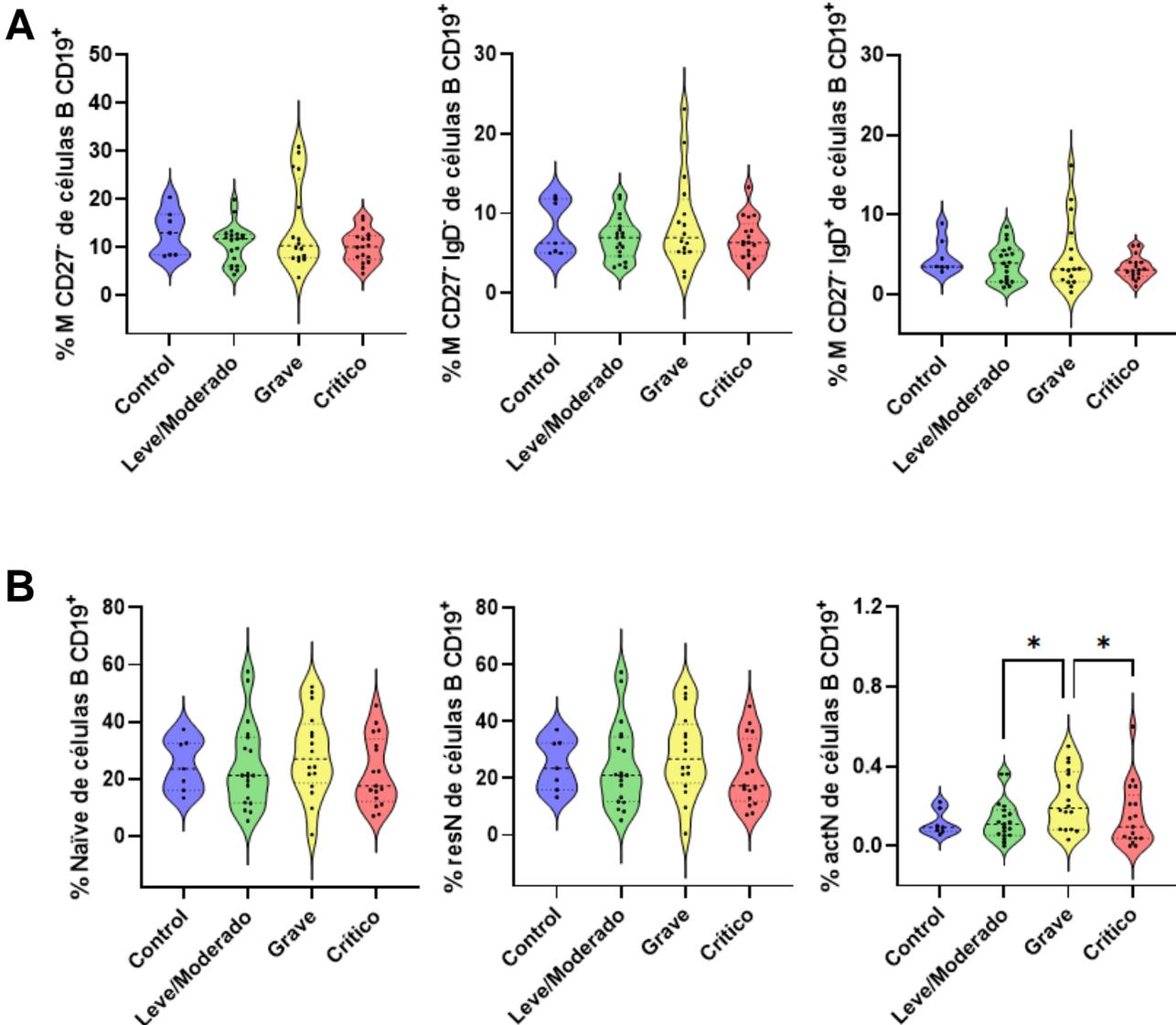


Figura 5. **Los compartimentos naïve y memoria no clásica de las células B no presentan alteraciones en los pacientes con COVID-19.** (A) Análisis comparativo de los porcentajes de la población parental naïve y de las subpoblaciones resN y actN en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. (B) Análisis comparativo de los porcentajes de la población parental de memoria no clásica y de las subpoblaciones M CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> y M CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. Los valores de los porcentajes son mostrados como la media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (líneas punteadas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \* $p \leq 0.05$ .

No obstante, la subpoblación actN CD11c<sup>+</sup>, presenta un incremento evidente en algunos pacientes con enfermedad grave (Fig. 5B).

Es importante destacar que uno de los compartimentos que mostró cambios significativos en el proceso infeccioso por SARS-CoV-2 fueron las células B DN. A excepción de la subpoblación DN4 que presentó valores imperceptibles, las proporciones de las subpoblaciones DN1, DN2 y DN3 mostraron variaciones acordes a la gravedad de la enfermedad (Fig. 6A). En el análisis estadístico individual de la población DN y sus subpoblaciones, los pacientes que presentaron cuadros clínicos más severos tuvieron un incremento de este compartimento. Por otro lado, las células DN1 (CD21<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) presentaron el mismo comportamiento entre controles sanos y pacientes con enfermedad leve/moderada (Fig. 6B); no obstante, los casos graves y críticos tuvieron una reducción significativa de esta subpoblación. En cambio, las células B DN2 (CD21<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>) solo mostraron un incremento significativo en los pacientes graves, en comparación con los casos leve/moderados (Fig. 6C), mientras que la fracción DN3 (CD21<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>) fue sustancialmente la más cambiante, ya que presentó un incremento significativo en sus valores a medida que la enfermedad clínicamente empeoraba (Fig. 6C).

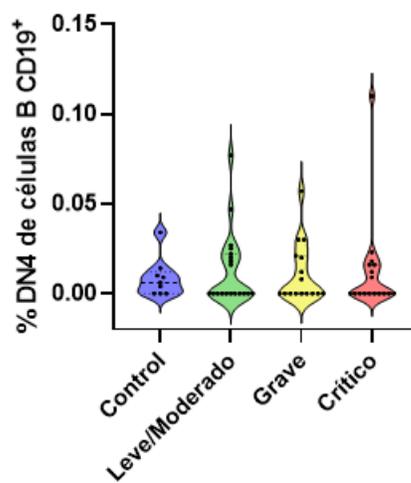
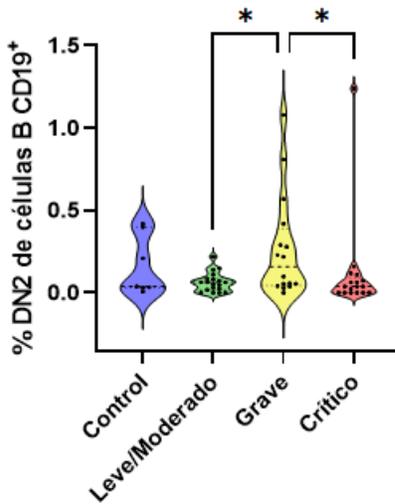
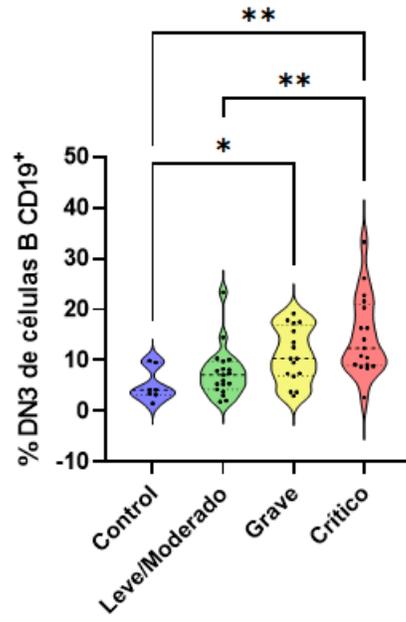
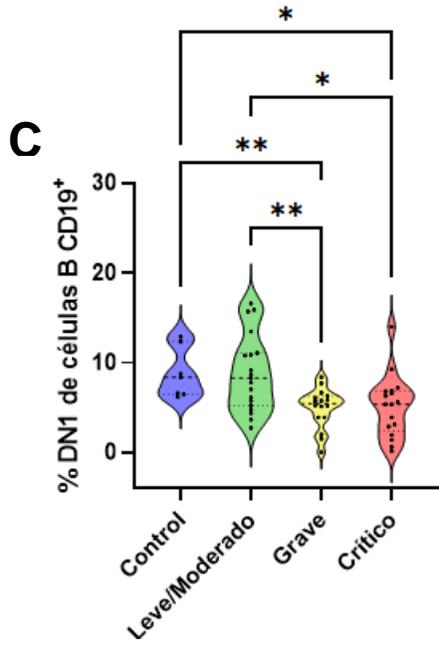
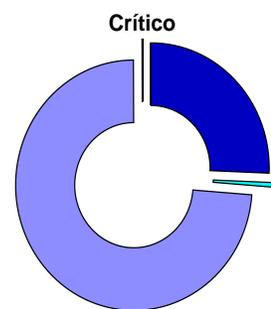
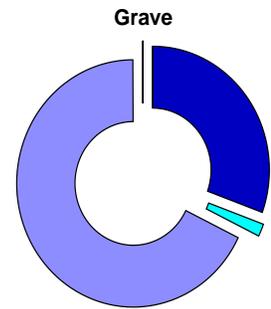
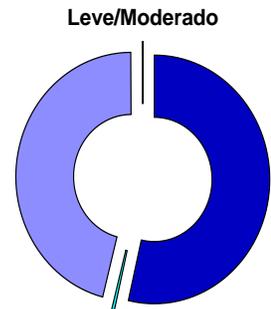
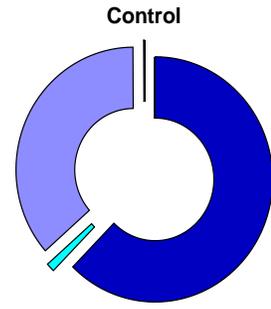
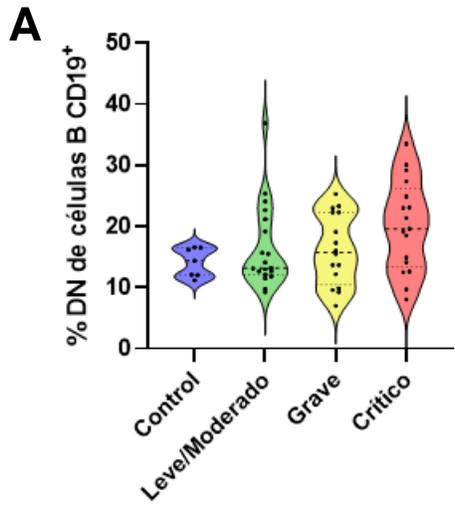


Figura 6. **Alteraciones en el compartimento DN de las células B de los pacientes con COVID-19.** (A) Análisis comparativo de los porcentajes de la población parental DN con respecto a las células B CD19<sup>+</sup>. (B) Representación gráfica de la media de los porcentajes de las subpoblaciones DN1-DN4. (C) Análisis comparativo de los porcentajes de las subpoblaciones DN1-DN4 en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. Los valores mostrados como la media (línea discontinua) más los cuartiles inferior y superior (líneas punteadas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

Considerando que la mayoría de estos compartimentos de células B pueden modificarse con la edad y tomando en cuenta que el grupo de individuos sanos no es pareado con exactitud a todos los pacientes analizados, realizamos un análisis comparativo independientemente de la severidad de la enfermedad (debido a las restricciones del tamaño de la muestra). Como se esperaba, este enfoque evidenció cambios significativos en los porcentajes en la mayoría de las subpoblaciones de células B analizados (que inicialmente presentaron diferencias significativas como se muestran en los gráficos de cada compartimento) entre los pacientes con COVID-19 y los individuos sanos.

### **La severidad del COVID-19 se asocia con perfiles definidos de las subpoblaciones de células B.**

La COVID-19 fue identificada como una enfermedad infecciosa que tenía diferentes desenlaces y evolución, de modo que los parámetros clínicos y de laboratorio convencionales no reflejaban con precisión el estado clínico del paciente y pronóstico. Por lo tanto, nuestro objetivo fue abordar estas subpoblaciones de células B como un criterio más preciso para evaluar la severidad de la enfermedad y el fenotipo clínico.

Considerando que las distintas subpoblaciones de células B presentaron cambios significativos, decidimos juntar a los pacientes realizando un análisis jerárquico de agrupación para identificar firmas o perfiles que podrían estar asociados a un fenotipo clínico particular de COVID-19. Es importante mencionar, que excluimos las subpoblaciones que exhibieron coeficientes de correlación elevados entre ellas, de acuerdo con la figura suplementaria 1. Posteriormente utilizamos las diez subpoblaciones restantes para generar el mapa de calor (Fig. 7). De esta forma, pudimos identificar tres agrupaciones primarias (posición horizontal) que contienen

predominantemente cada una de las presentaciones clínicas de COVID-19: leve/moderado señalado por un rectángulo verde, grave en amarillo y crítico en rojo.

Como lo indica el pie de la figura 7, los grupos de pacientes interaccionan con grupos de subpoblaciones de células B (posición vertical): el clado "A" muestra un patrón evidente donde las células M CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>, actN y DN2 destacaron, por su mayor presencia en los pacientes graves. Se puede observar un comportamiento similar para el clado "C" donde las subpoblaciones DN3 y ASC parecen incrementar en los casos críticos. Las subpoblaciones del clado "B" no mostraron un patrón tan homogéneo en relación con los casos leves/moderados; aunque pudimos observar las subpoblaciones M CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> y USwM con mayor presencia en 2 subgrupos, así como TrCD21<sup>+</sup> y DN1 en otros subgrupos independientes, y en su mayoría son principalmente pacientes leves/moderados. Con base en estos perfiles mejor definidos, se pudo visualizar disminución opuesta de algunas subpoblaciones de los diferentes grupos, perfilando de esta forma las firmas asociadas a la severidad de la enfermedad para los diferentes pacientes con COVID-19.

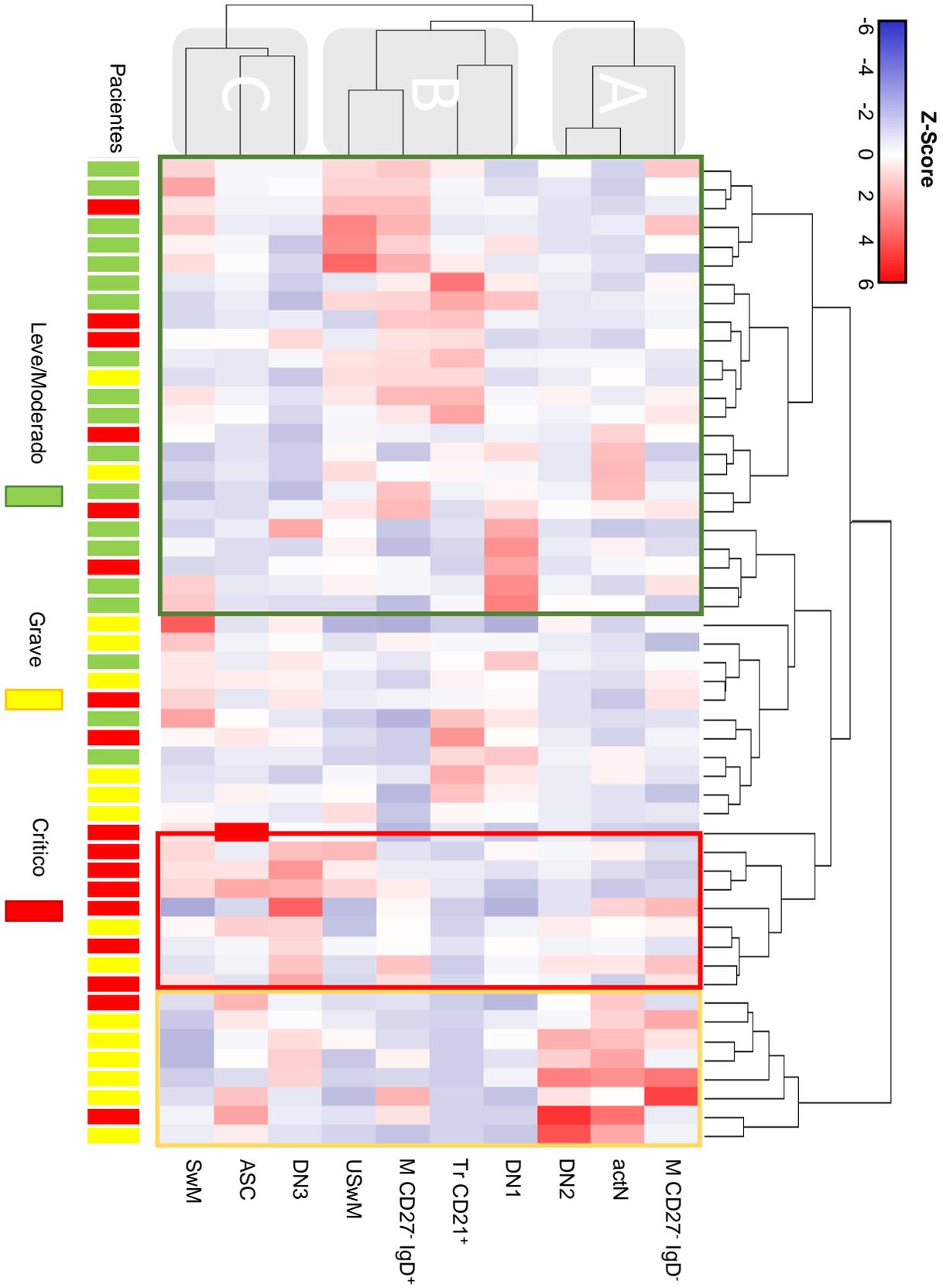


Figura 7. **Análisis de agrupamiento de pacientes con COVID-19 frente a las subpoblaciones de células B.** Análisis de agrupamiento jerárquico generado por el método de Ward que relaciona los casos leves/moderados (verde, n=19), graves (amarillo, n=16) y críticos (rojo=17) con los porcentajes de las subpoblaciones de células B representadas acorde al puntaje que indica la escala de color superior. Los dendogramas horizontales indican la agrupación de los pacientes, se destacan los grupos que presenta principalmente pacientes leves/moderados (enmarcados en verde), graves (enmarcados en amarillo) o críticos (enmarcados en rojo). Los dendogramas verticales presentan tres compartimentos principales de subpoblaciones (A-C).

**Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en la expresión del quimiorreceptor CXCR5 y del factor de transcripción T-bet en diferentes compartimentos de células B.**

Por otro lado, para dilucidar el tipo de activación evaluamos la expresión de CXCR5 y T-bet en diferentes compartimentos de células B. En primera instancia evaluamos la expresión de CXCR5 (quimiorreceptor importante en la vía folicular) en el compartimento Naïve (Fig. 8A). Interesantemente, observamos un decremento significativo de la expresión de CXCR5 en los pacientes con enfermedad leve/moderada y crítica en comparación con los controles sanos; mientras que los casos graves mostraron un comportamiento similar a los controles (Fig. 8B).

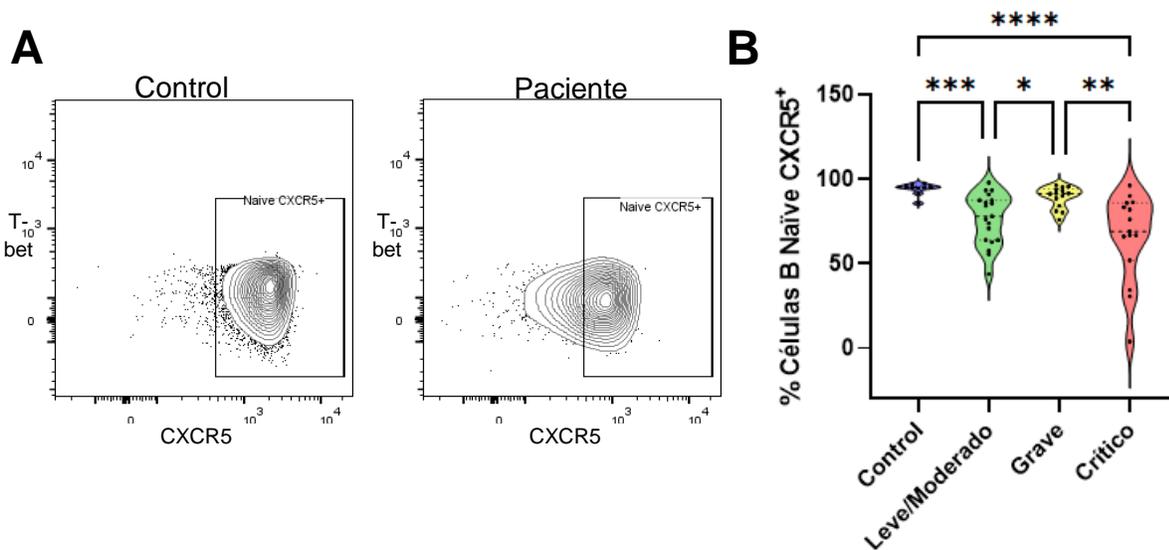
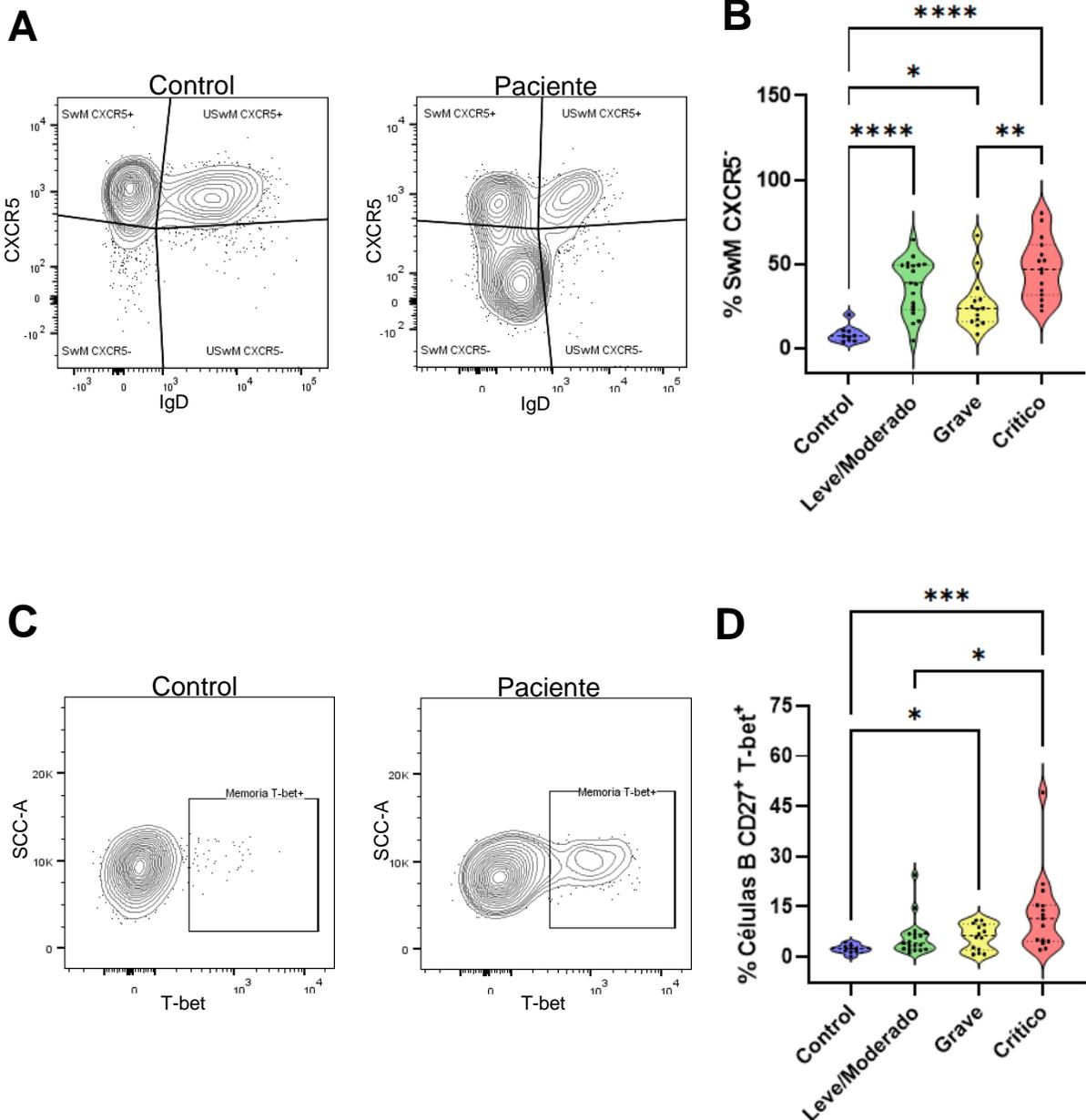


Figura 8. **Los pacientes con COVID-19 presentan una disminución en la expresión de CXCR5 en el compartimento naïve.** (A) Contour plot representativo de un control sano vs. un paciente con COVID-19 que muestra la disminución de la expresión CXCR5. (B) Análisis comparativo de las células B naïve CXCR5<sup>+</sup> entre los diferentes grupos de pacientes y controles sanos. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001.

Por otro lado, analizamos el compartimento de memoria, particularmente en la mayoría de los pacientes hay un incremento en el porcentaje de las células B con cambio de isotipo que carecen de CXCR5, el cual es más notable en los casos con enfermedad leve/moderada y crítica (Fig. 9A y 9B). Asimismo, analizamos la expresión de T-bet en el compartimento de memoria total, curiosamente se observó un incremento de células que expresan este factor de transcripción, especialmente en los pacientes graves y críticos (Fig. 9C y 9D).



**Figura 9. Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en la expresión de CXCR5 y T-bet en la población de células B de memoria.** (A) Contour plot representativo de un control sano vs. un paciente con COVID-19 que muestra el incremento de células de memoria con cambio de isotipo carentes de CXCR5. (B) Análisis comparativo de las células B SwM CXCR5<sup>-</sup> entre los diferentes grupos de pacientes y controles sanos. (C) Contour plot representativo de un control sano vs. un paciente con COVID-19 que muestra el incremento de la expresión T-bet en el compartimento de memoria. (D) Análisis comparativo de las células B de memoria T-bet<sup>+</sup> entre los diferentes grupos de pacientes y controles sanos. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

Finalmente, analizamos la expresión de CXCR5 y T-bet del compartimento de células B doble negativo (Fig. 10A). Pudimos observar un notable decremento de la expresión de CXCR5 en los casos con SARS-CoV-2 (Fig. 10B). En contraste, se observó un incremento en las células B DN que carecen de CXCR5 y T-bet, más consistente en los casos leves/moderados y críticos (Fig. 10C). Por último, los pacientes presentaron un incremento en las células que expresan T-bet, más relevante en los pacientes graves y críticos (Fig. 10D).

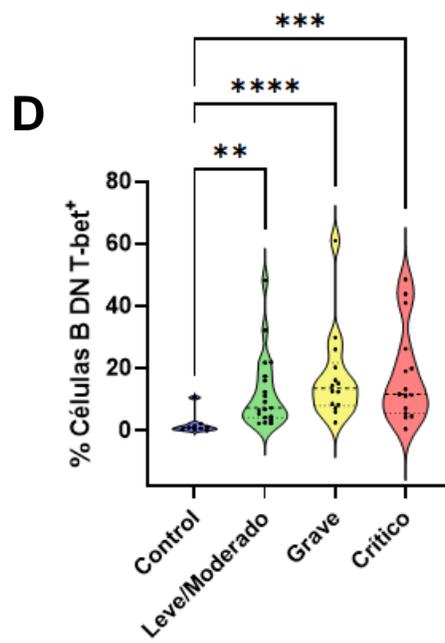
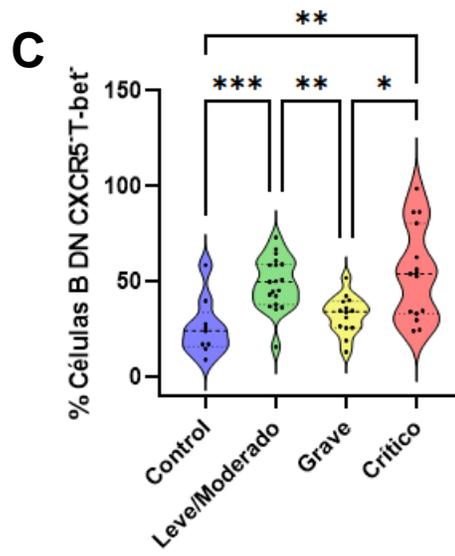
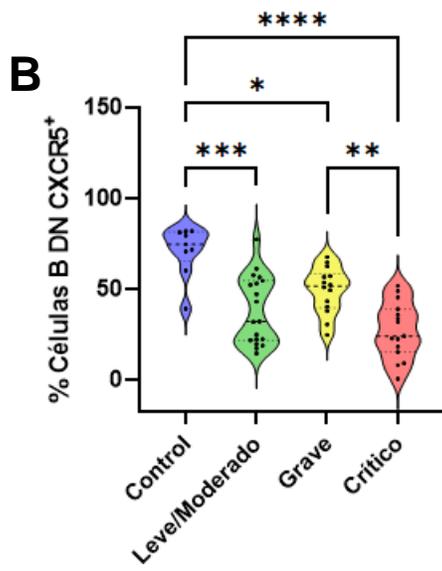
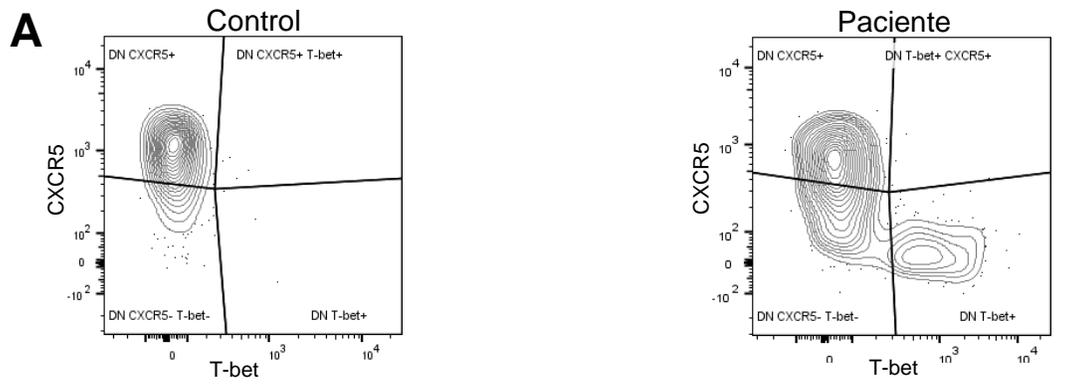


Figura 10. **Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en la expresión de CXCR5 y T-bet en el compartimento DN de células B.** (A) Contour plot representativo de un control sano vs. un paciente con COVID-19 que muestra el incremento de células DN que expresan T-bet<sup>+</sup>. (B) Análisis comparativo de las células DN CXCR5<sup>+</sup> entre los diferentes grupos de pacientes y controles sanos. (C) Análisis comparativo de las células DN CXCR5<sup>-</sup>T-bet<sup>-</sup> entre los diferentes grupos de pacientes y controles sanos. (D) Análisis comparativo de las células DN T-bet<sup>+</sup> entre los diferentes grupos de pacientes y controles sanos. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, consecutiva de una prueba *post-hoc* de Dunn. \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001, \*\*\*\*p≤0.0001.

### **Las subpoblaciones de células B se correlacionan con múltiples parámetros biológicos**

Considerando que las diversas anomalías encontradas en los parámetros clínicos y de laboratorio no siempre reflejan con precisión el estado clínico del paciente acorde a las escalas clínicas para evaluar la severidad de la enfermedad, realizamos un análisis de correlación entre las subpoblaciones de células B y las características clínicas y de laboratorio. Los resultados obtenidos los representamos gráficamente en una matriz de correlación mostrada en la figura 11. Interesantemente, los parámetros ventilatorios, como la frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) y el índice de Kirby (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>), presentaron correlación con el compartimento transicional (Fig. 12B) de células B naïve activadas (Fig. 12C), así como en la subpoblación DN3 (Fig.13). También, las células B de memoria (Fig. 12A), y las subpoblaciones DN1/DN2 (Fig. 12C) presentaron una correlación negativa con las escalas clínicas de la severidad de la enfermedad, como NEWS y PSI/PORT. Por otro lado, la subpoblación de memoria SwM correlacionó con un periodo más corto de hospitalización (Fig. 12A). Es importante resaltar que la subpoblación de células DN3 presentó un patrón de correlación significativo más amplio con diversas variables clínicas y de laboratorio (Fig. 13), como la saturación de oxígeno y el índice de Kirby, parámetros respiratorios descritos previamente. Además, se observó correlación positiva con diferentes parámetros de laboratorio, incluidos la cuenta de leucocitos, de neutrófilos y el índice de neutrófilos/leucocitos; reactantes de fase aguda, como los niveles de (PCR) y ferritina; marcadores de daño celular, creatina fosfocinasa (CPK) y lactato deshidrogenasa (LDH), así como con parámetros de la coagulación, como el dímero D y la troponina.

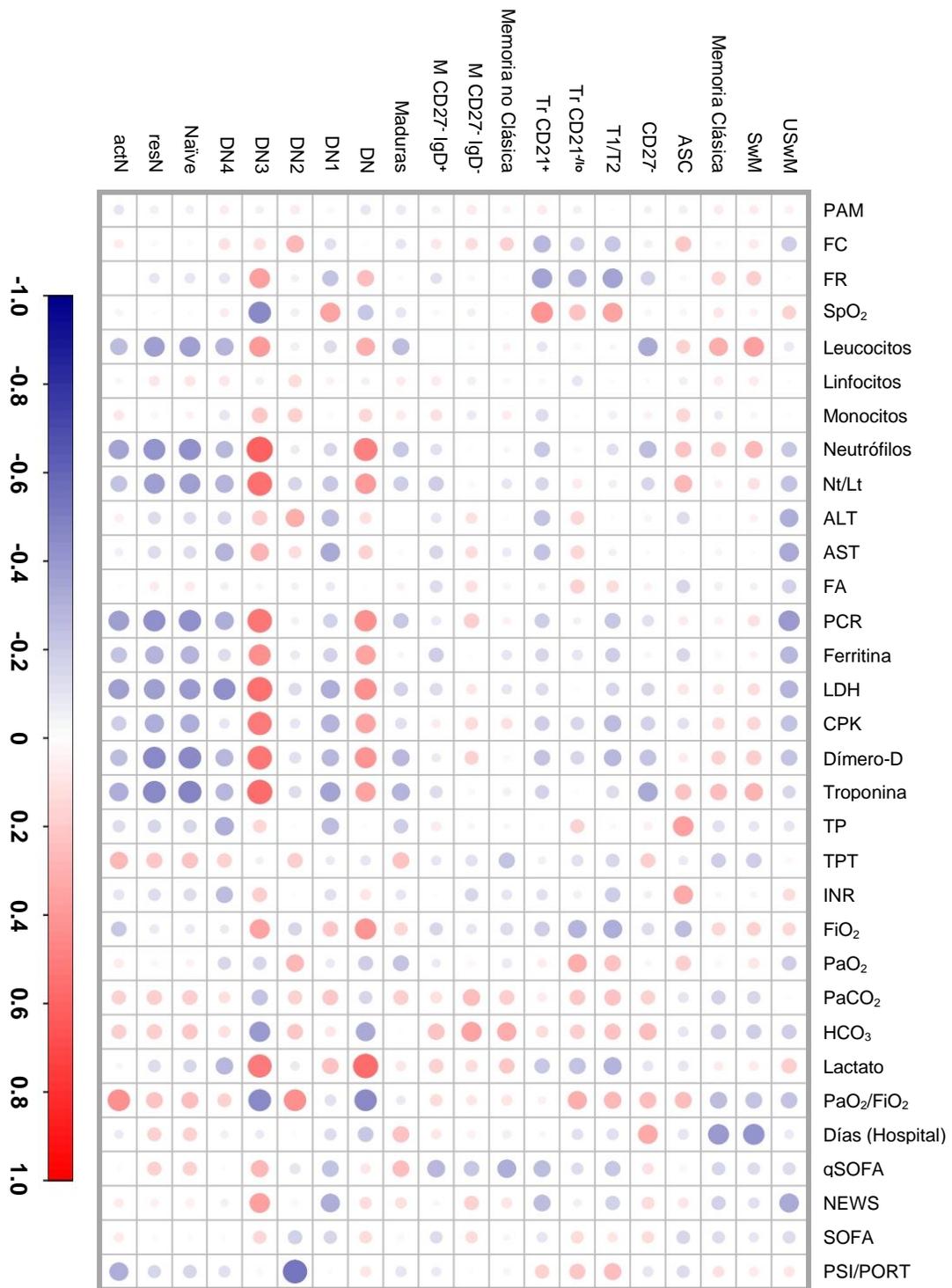


Figura 11. Las subpoblaciones de células B se correlacionan con escalas clínicas de severidad y diferentes parámetros clínicos de pacientes con COVID-19. Matriz de correlación que representa gráficamente los coeficientes de Spearman, calculados entre los porcentajes de las subpoblaciones de células B y los parámetros biológicos (escalas clínicas, valores de laboratorio y datos clínicos). La escala de color subyacente indica los valores del coeficiente de Spearman. El tamaño de cada punto indica la intensidad de la correlación.

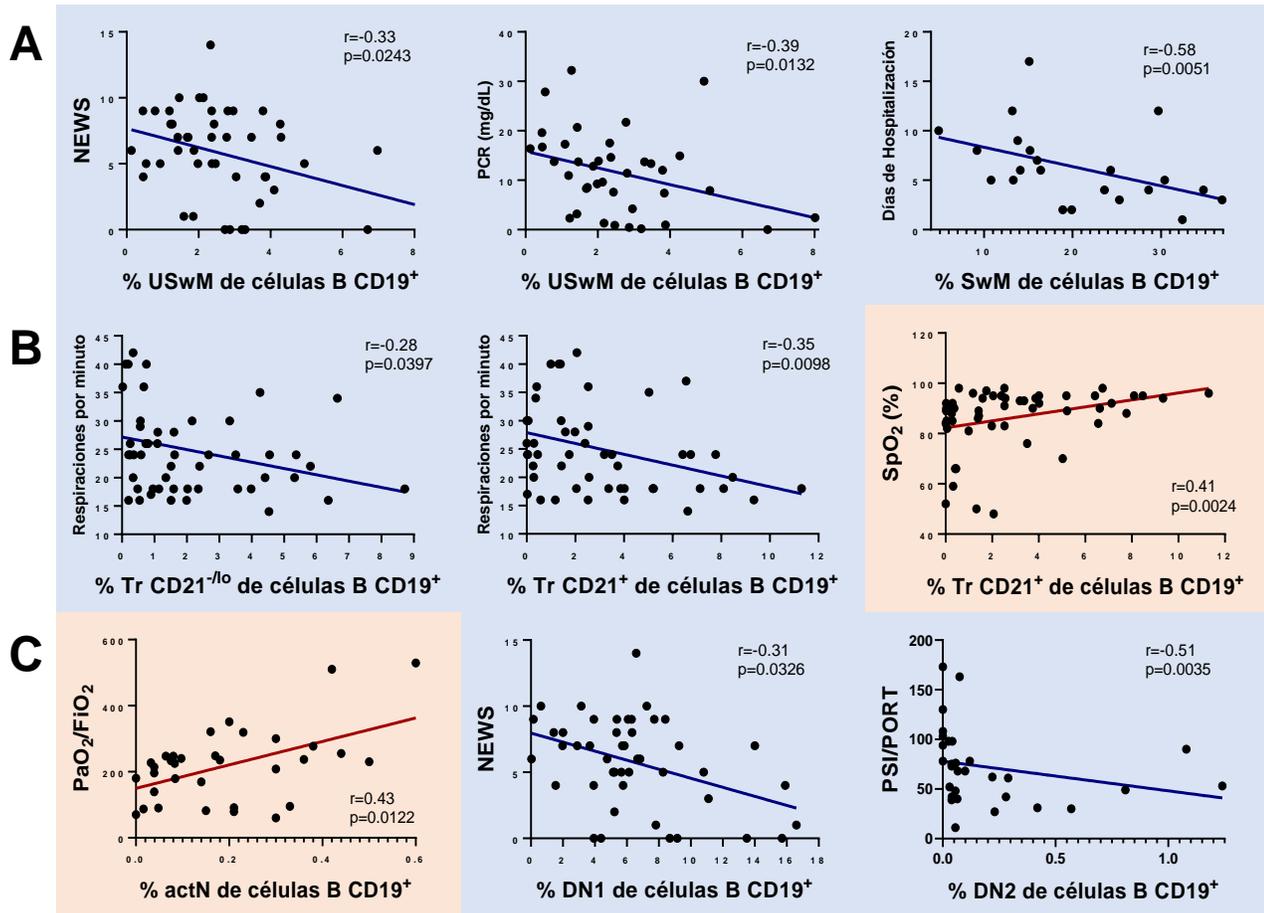


Figura 12. Cambios en los porcentajes de las subpoblaciones de memoria, transicionales, naïve y DN correlacionan con parámetros biológicos de pacientes con COVID-19. (A) Correlaciones estadísticamente significativas entre las subpoblaciones de memoria y la escala NEWS, niveles de proteína C reactiva (PCR) y días de estancia hospitalaria. (B) Correlaciones estadísticamente significativas entre los compartimentos transicionales y frecuencia respiratoria y la saturación periférica de O<sub>2</sub>. (C) Correlaciones estadísticamente significativas entre las subpoblaciones actN, DN1 DN2 y el índice de Kirby, la escala NEWS y la escala PSI/PORT. r: coeficiente de correlación de Spearman, p: valor estadístico de la correlación.

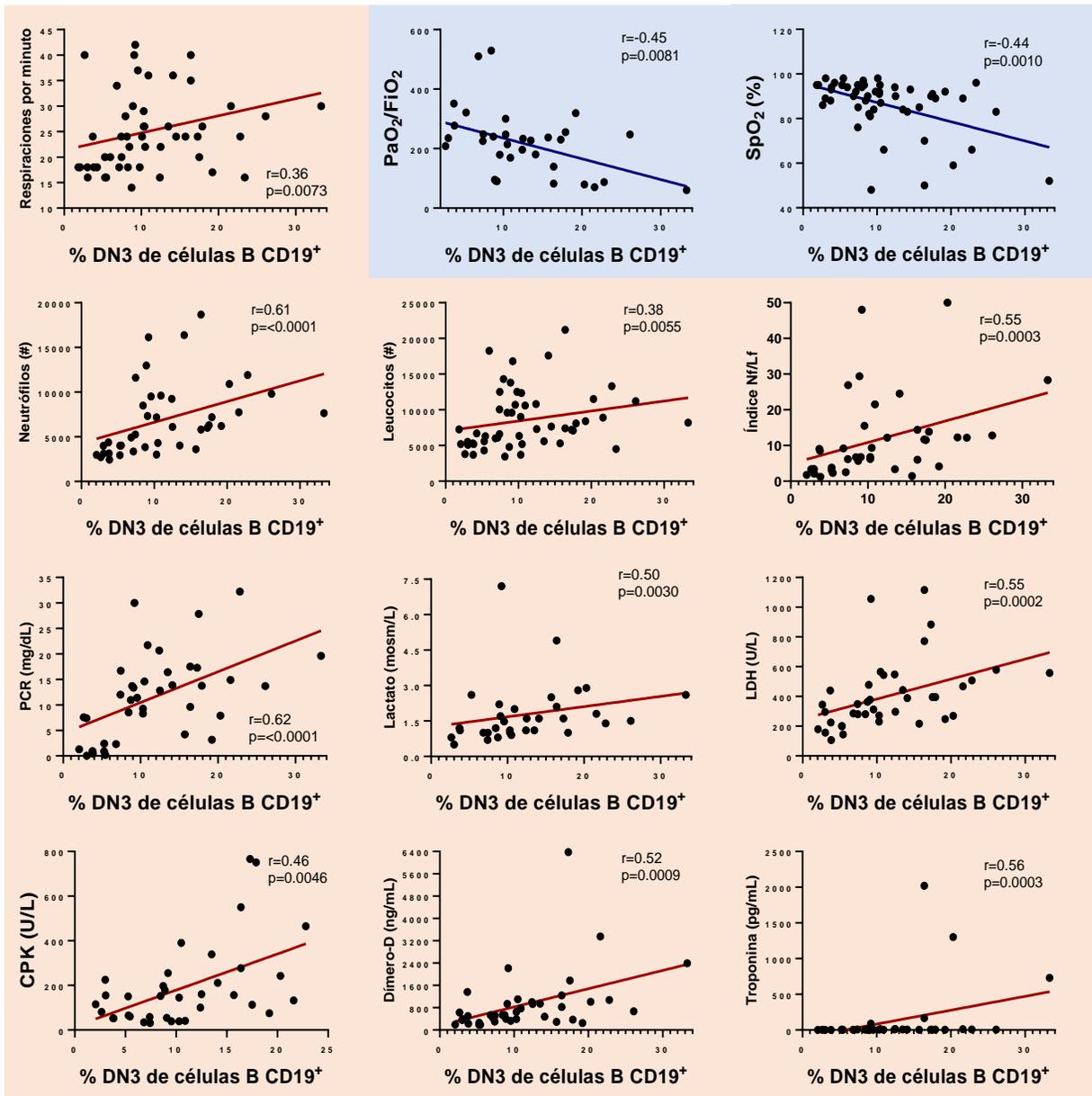


Figura 13. Cambios de la subpoblación DN3 correlacionados con parámetros biológicos de pacientes con COVID-19. Correlaciones estadísticamente significativas entre la subpoblación DN3 y parámetros respiratorios, conteos celulares, marcadores de inflamación y marcadores de coagulación. r: coeficiente de correlación de Spearman, p: valor estadístico de la correlación.

## 3.2 Discusión

Interesantemente, los casos con COVID-19 no mostraron diferencias significativas en los números absolutos de las células B CD19<sup>+</sup> (tabla suplementaria 2), sin embargo, los casos no mostraron un comportamiento homogéneo, sin importar la severidad, se observaron pacientes con números elevados. Por otro lado, los porcentajes de las células B CD19<sup>+</sup> de los pacientes mostraron un ligero incremento, este aumento solo fue significativo en los pacientes con enfermedad grave, y el cambio fue significativo entre pacientes leves/moderados y graves. Es importante resaltar los resultados obtenidos, debido a que otros grupos de estudio reportan linfopenia o un decremento en las células T en los pacientes con enfermedad grave/crítica [85-88]; aparentemente las células B de los pacientes son resistentes a la linfopenia inducida por la infección, este fenómeno también ha sido reportado por otros grupos [83,84]. Probablemente esto se deba a una baja carga viral o un periodo corto de infección, considerando que la mayoría de los pacientes fueron reclutados en tiempos tempranos de la infección.

Para comprender si los cambios de este compartimento presentan relación con la evolución de la enfermedad, analizamos las subpoblaciones de células B, por un lado, los números absolutos de los casos con COVID-19 presentaron diferencias significativas en todos sus compartimentos (inmaduro, maduro, efector y DN) mostrados en la tabla suplementaria 2. Estos cambios significativos fueron más notables al comparar los porcentajes.

Respecto al compartimento transicional de células B, hay diversos reportes donde se observa un incremento de estas células en condiciones inflamatorias tanto en pacientes con procesos infecciosos, así como con enfermedades autoinmunes [89-92]. En concordancia con ello, en los pacientes se observó un incremento en los tres grupos de pacientes con COVID-19 en comparación con los controles sanos, y fue más notable en los pacientes con enfermedad leve/moderada. Adicionalmente, con base en la expresión de CD21 las células B transicionales se pueden clasificar en dos subpoblaciones: células Tr CD21<sup>-/lo</sup> (Tr1) y Tr CD21<sup>+</sup> (Tr2); interesantemente los casos con enfermedad leve/moderada fue el único grupo que mostro un incremento

significativo en comparación con los controles sanos, además también esta expansión fue significativa en comparación con los casos graves y críticos.

Aunque este compartimento también se define como "inmaduro", existe evidencia que apoya un rol efector de las células B transicionales en procesos infecciosos, mediante la secreción de citocinas o su diferenciación a células plasmáticas, por los receptores de reconocimientos de patrones [72, 92-94]. Por esta razón, el aumento de este compartimento observado en los pacientes analizados, así como lo reportado por otros grupos en pacientes con COVID-19 [95,96], puede significar una respuesta tipo "innata" contra el virus SARS-CoV-2, principalmente en los casos con enfermedad leve/moderado. En cuanto los casos graves y críticos, se ha descrito que la persistencia del factor HIF1A, bloquea la diferenciación de estas células, por lo tanto, el incremento puede deberse a un remanente de células que no pudieron diferenciarse hacia células plasmáticas por el ambiente hipóxico de los pacientes [97].

Respecto al compartimento efector (ASC y memoria), los porcentajes de las ASC también aumentaron considerablemente en las tres categorías de la enfermedad en comparación con los controles sanos, principalmente en pacientes graves y críticos. El significado de la expansión en respuesta a la gravedad de la enfermedad no está dilucidado, no obstante, se ha reportado la importancia de la presencia de títulos elevados de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 para neutralizar y evitar la progresión del COVID-19 [98]. Asimismo, la expansión de ASC puede deberse por la diferenciación de las células transicionales expandidas, como se describe en otros reportes contemporáneos de COVID-19 [99]. En contraparte, en otros procesos infecciosos virales como el dengue o ébola, el incremento de células plasmáticas se asocia con una evolución desfavorable para los pacientes [100]. Debido a que el incremento de las ASC puede estar asociado a una producción de anticuerpos "defectuosos" que facilitan la entrada del virus en lugar de neutralizarlo [32,101].

Relativo al compartimento de memoria, los porcentajes de la población total de memoria en las 3 categorías de pacientes con COVID-19 disminuyeron, en comparación con los donantes sanos. Los casos graves y críticos presentan una disminución de las células sin cambio de isotipo; en tanto que solo los pacientes graves presentan una disminución

significativa de las células con cambio de isotipo, ambos casos en comparación con los controles. Este decremento ha sido reportado en diferentes estudios de pacientes con COVID-19 [102-104], se sugiere que esta contracción del compartimento de memoria se debe a una posible activación de células de memoria preexistentes (contra otras cepas de la familia *Coronaviridae*), que se diferencian a células plasmáticas y ayuden a neutralizar el virus [105].

Por otro lado, el total de células B naïve de pacientes con COVID-19 y sus subpoblaciones resN (CD11<sup>-</sup>) y actN (CD11c<sup>+</sup>), no presentaron cambios significativos al compararlos con los controles. Solo el grupo grave presentó cambios en la población de células actN, una respuesta esperada debido al ambiente inflamatorio de los pacientes, posiblemente induciendo procesos de activación celular [56,83]. Al igual que el compartimento naïve, el compartimento parental de memoria no clásica y sus subpoblaciones, no presentaron cambios significativos. Este compartimento no ha sido estudiado a profundidad y solo se ha documentado su fenotipo en controles sanos [106].

Finalmente, el porcentaje de la población parental DN en los 3 grupos de pacientes con COVID-19 no presentó diferencia significativa en comparación con los donantes sanos, no obstante, las subpoblaciones clasificadas por la expresión de CD21 (receptor del complemento) y CD11c (integrina subunidad alfa X) mostraron cambios interesantes. Las células DN1 (CD21<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) presentan una disminución importante en los casos graves y críticos en comparación con los casos leves/moderados y controles. En contraste las células DN2 (CD21<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>) y DN3 (CD21<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>), incrementan en los casos graves y críticos. Para vislumbrar la relevancia de los cambios representativos, es indispensable develar la función de cada subpoblación DN, en un contexto fisiológico y patológico.

Los cambios que encontramos en las diferentes subpoblaciones de células B circulantes indican que los datos de nuestro estudio podrían definir firmas o perfiles relacionados a las categorías de severidad de la enfermedad. Además, esto se apoya en el hecho de que las subpoblaciones específicas con cambios presentan una proporción menor en los casos graves y críticos que en los casos leves/moderados o viceversa. La subpoblación DN2 es la que ha sido más estudiado en modelos de

autoinmunidad, esto se debe a que se encuentra expandida en dichas patologías [56,107,108]. Sin embargo, en la actualidad, el proceso infeccioso por SARS-CoV-2 ha brindado un nuevo campo para estudiar estas subpoblaciones. Como pudimos observar la expansión de la subpoblación DN3 es notable en los pacientes, habrá que estudiar más a fondo esta subpoblación, pensando en que fenotípicamente solo expresa CD19 mientras los otros marcadores utilizados están ausentes. En contraste la subpoblación DN1, que decae conforme la enfermedad se agrava, podríamos pensar que tiene alguna función reguladora y que en contextos de una respuesta deletérea se pierde su función [109]. Aunque aún no se debe descartar la idea de que también cada una de estas células representen una etapa de maduración que las une y el incremento o reducción en unas se deba a ese fenómeno de maduración y desarrollo en otro de los fenotipos.

Ciertamente, nuestros datos muestran una amplia relación entre las subpoblaciones de células B y el fenotipo clínico del COVID-19. En relación con ello, se ha descrito 2 factores importantes que pueden estar involucrados, el primero de ellos los mediadores solubles (citocinas y quimiocinas) y las concentraciones de oxígeno. Con respecto al segundo, se ha reportado que prevalece un ambiente hipóxico en nichos inmunológicos durante el desarrollo fisiológico y en condiciones patológicas [110]. En este sentido, el factor de transcripción HIF1A ha sido asociado a la regulación del desarrollo celular [110,111]. En consecuencia, la correlación que se documentó en este estudio entre diferentes subpoblaciones de células B y parámetros ventilatorios podría explicarse por la condición hipóxica existente en COVID-19.

Entre otros hallazgos encontramos que las proporciones más elevadas de células B de memoria se correlacionaron con puntajes de escalas clínicas de riesgo más bajos (NEWS, PSI/PORT), así como con una estancia hospitalaria de corta duración. En concordancia con ello, Juno J. y colaboradores, mostraron que los pacientes recuperados de COVID-19 presentan una respuesta eficiente apoyado por células B de memoria específicas contra la glicoproteína viral S “espiga” [112].

Interesantemente, las células DN3, que son de reciente descripción y se desconoce su origen/función, mostro un perfil de correlación con diversos parámetros biológicos

presentes en el fenotipo crítico de la enfermedad <sup>[113-115]</sup>. Particularmente, detectamos que los niveles inferiores de SaO<sub>2</sub> y PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> se correlacionan con porcentajes elevados de células DN3, podría ser factible que este ambiente favorezca la diferenciación de células B hacia este fenotipo. Con base en nuestros datos, también se ha reportado en otro estudio que la subpoblación DN3 se expandió en casos críticos con COVID-19 y se relacionó con las células B naïve activadas y las células DN2 por agrupación jerárquica <sup>[116]</sup>. Así mismo, Woodfruff M. y colaboradores, encontraron que la subpoblación DN3 se relaciona con una respuesta primordialmente extrafolicular, esto implicaría una producción temprana de anticuerpos, caracterizados por baja afinidad, poca hipermutación somática, formación de memoria y especificidad antigénica desconocida <sup>[116]</sup>.

Para comprender la respuesta del compartimento de células B y los cambios observados analizamos la expresión de CXCR5 y T-bet. La expresión de CXCR5 desempeña un papel importante en la activación y maduración de las células B, primordialmente se asocia a una respuesta folicular, a través de su ligando CXCL13, quimiocina que se expresa constitutivamente por las vénulas endoteliales foliculares para controlar el tráfico de células B y T <sup>[43,44,46]</sup>. Por otro lado, la presencia del factor de transcripción T-bet se asocia principalmente a la protección inmunológica contra patógenos intracelulares vía IgG2<sub>a/c</sub> <sup>[117,118]</sup>, no obstante, también ha sido descrito en células B denominadas ABCs (*age-associated B cells*) y las DN2 en LEG <sup>[56,75]</sup>. Primero analizamos la expresión de CXCR5 en el compartimento total de células naïve. Interesantemente, hay una disminución notable de las células B naïve CXCR5<sup>+</sup> en los casos leves/moderados y críticos en comparación con los controles. De igual forma evaluamos el compartimento de memoria, curiosamente los pacientes presentan un incremento de células B de memoria con cambio de isotipo carentes de CXCR5 en todos los grupos de pacientes. Además, el compartimento total presenta un incremento en las células que expresan T-bet más notable en los pacientes graves y críticos. Finalmente, en las células B DN, en primera instancia hay un decremento considerable de la expresión de CXCR5 en todos los casos con COVID-19 en relación con los controles, en contraste, la expresión de T-bet se incrementa en los 3 grupos de pacientes con respecto a los donantes sanos, adicionalmente, hay un incremento de

células B DN que no expresan T-bet y CXCR5 en los casos con COVID-19. Respecto a las células B naïve, Jenks A. S. y colaboradores, han descrito en pacientes con LEG, que a través de la estimulación con TLR7, IFN $\gamma$  e IL-21, promueven la vía de activación extrafolicular que se caracteriza por una baja expresión de CD21, TRAF5 y CXCR5. En efecto, siguiendo esta vía de activación, aparentemente las células B naïve se diferencian hacia células B DN2, que se caracterizan por la expresión de CD11c y T-bet, con base en nuestros datos, aparentemente la infección por SARS-CoV-2 genera una respuesta de este tipo, apoyado por la disminución de CXCR5 tanto en el compartimento naïve como DN y el incremento de la expresión T-bet de este último. Finalmente, se ha reportado la importancia del factor T-bet para contener modelos de infección. Se ha reportado la expansión de células B de memoria T-bet<sup>+</sup> posterior a la vacunación contra el virus de la fiebre amarilla y viruela <sup>[119]</sup>. En pacientes con VIH la presencia de células B de memoria T-bet<sup>+</sup> se asocia con un incremento de anticuerpos en suero y de las células B IgG1 e IgG3; además, las células B específicas contra la proteína gp140 en su mayoría expresan T-bet <sup>[119]</sup>. También, se reportó que las células B requieren la expresión de T-bet para producir anticuerpos específicos contra la región del tallo y la cabeza de la hemaglutinina en modelo murino, y pueden ser identificadas en diferentes sitios anatómicos dependiendo de su nivel de expresión de T-bet, tanto en ratón como humano <sup>[120]</sup>. Nosotros encontramos un incremento en la expresión de T-bet en el compartimento de memoria que podría estar asociado a la protección viral previamente descrita, no obstante, dado que los casos críticos son los que presentan un incremento más notable hay que profundizar en el significado de la expresión T-bet en el contexto de COVID-19. Además, las células B con cambio de isotipo (IgD<sup>-</sup>) carentes de CXCR5 presentan una expansión considerable en los casos con COVID-19, esto refuerza la posibilidad de montar una respuesta rápida para contener la infección, habrá que valorar, si las células que no expresan este quimiorreceptor pueden montar una respuesta eficiente durante un segundo encuentro, además, cabe la posibilidad de que en algunos casos los anticuerpos producidos en el primer encuentro no sean eficientes para neutralizarlo, por las propiedades de la vía extrafolicular. Aunque podemos pensar que para contener y neutralizar las partículas virales hay una importante respuesta extrafolicular debido a los cambios descritos aquí.

Indudablemente nuestro estudio presenta limitaciones. Entre ellas el número de controles sanos que cursan edades avanzadas, debido a que ciertos compartimentos de células B se modifican con la edad. No obstante, en su momento la inclusión de esta población de alto riesgo no fue factible ya que la mayoría estaban confinados en ese momento de la pandemia. Además, hallamos resultados similares en el análisis comparativo pareado por edad (tabla suplementaria 3). Por otro lado, no fue posible evaluar la duración del período de incubación y debemos reconocer que esta variable podría influir en algunas subpoblaciones de las células B. Además, el diseño unicéntrico y transversal de nuestro estudio no nos permitió abordar completamente el valor pronóstico de estas subpoblaciones de células B en COVID-19, y en su momento deberá validarse. Otra consideración que puede tener impacto son las comorbilidades que pueden presentar los pacientes, esto puede alterar los números de las poblaciones celulares, tales como diabetes u obesidad. Ciertamente aunado con el periodo de incubación no incluimos un análisis respecto a la carga viral y el tipo de variante que probablemente pueda influir en los cambios documentados. No obstante, nuestro trabajo represento los primeros datos sobre la correlación del compartimento de células B con las características clínicas del COVID-19, así como su asociación con el fenotipo clínico de la enfermedad.

## Capítulo 4.

### Alteraciones de las células B dobles negativas CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> acorde a la respuesta inmunológica contra SARS-CoV-2

## 4.1 Resultados

### El compartimento de células B DN presenta alteraciones en los pacientes con COVID-19.

Considerando las alteraciones en el primer análisis y la poca información acerca del compartimento de células B DN, decidimos profundizar en su análisis. Para ello incrementamos el número de pacientes con COVID-19. Cabe recalcar que los compartimentos de células B circulantes convencionales, que incluyen las células B transicionales (T1/T2)  $CD24^{hi}CD38^{hi}CD27^{-}$ , células B Naïve,  $CD38^{lo/-}CD27^{+}IgD^{+}$ , células B de memoria  $CD27^{+}$  y células secretoras de anticuerpos/plasmablastos exhibieron el mismo comportamiento: la expansión de células B inmaduras en casos con enfermedad leve/moderado, el incremento de las células plasmáticas en los pacientes graves y críticos, y la disminución del compartimento de memoria en casi todos los pacientes. En cuanto al porcentaje del compartimento DN total, se observó un incremento sustancial en los casos graves y críticos, sin embargo, en números absolutos este incremento no es tan evidente en los casos severos y críticos (Fig.14).

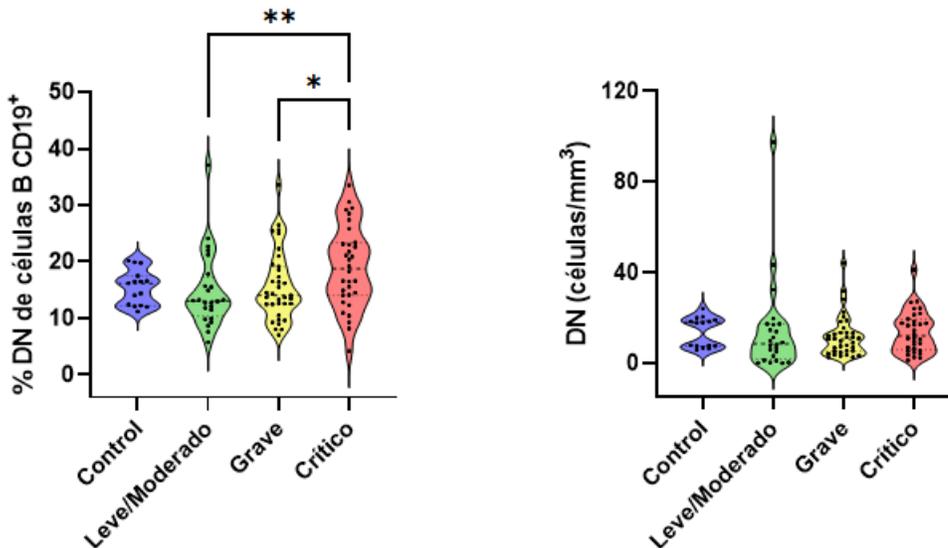
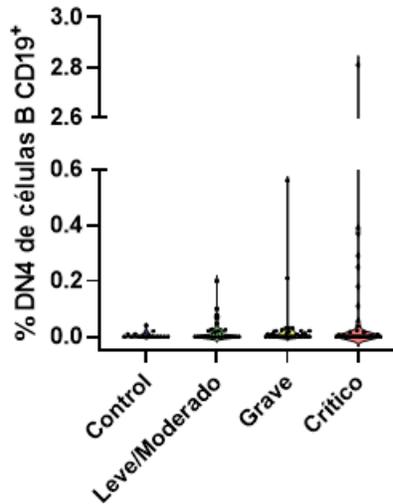
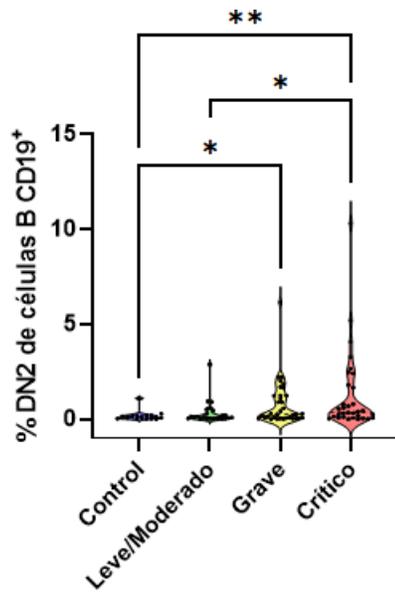
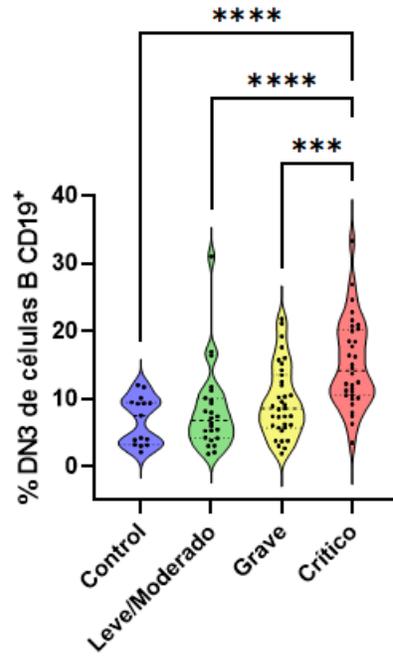
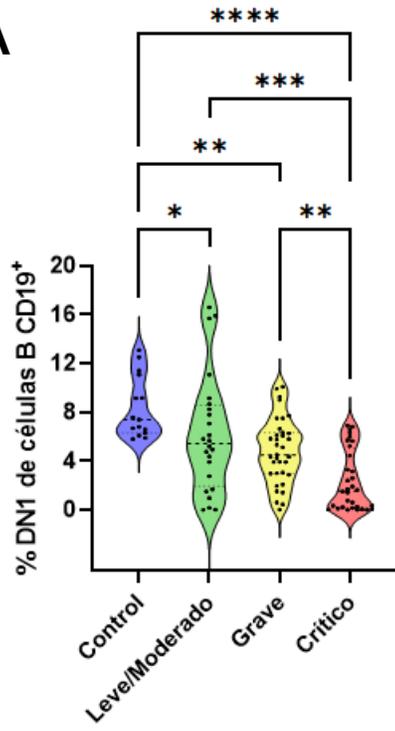


Figura 14. **Alteraciones en porcentajes y números absolutos del compartimento total de células B DN de pacientes con COVID-19.** Análisis comparativo del compartimento total de células B DN, los porcentajes son con base en las células B CD19<sup>+</sup> en el gráfico izquierdo y los números absolutos se presentan en el gráfico derecho. Todos los porcentajes o números absolutos muestran la media (línea discontinua), adicionalmente arriba y abajo los cuartiles (líneas punteadas). Los casos pacientes con COVID-19 (n=91) fueron categorizados en casos leves/moderados (n=24), graves (n=35) y críticos (n=32) más los controles sanos (n=15, PCR de SARS-CoV-2 negativos). Los datos fueron analizados a través de la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba *post-hoc* de Dunn. \*p≤0.05, \*\*p≤0.01.

Al evaluar las subpoblaciones, la subpoblación DN1 tanto en porcentajes como en números absolutos los pacientes presentan un decremento de esta población en comparación con los controles sanos, esta reducción es más robusta en este segundo análisis y más pronunciada según la severidad de la enfermedad (Fig.15). En cambio, la fracción celular DN2 continúa exhibiendo un sutil incremento, más evidente en los casos críticos. De forma parecida, pero con una expansión más pronunciada, la subpoblación DN3 tiene un incremento tanto en porcentajes como en números absolutos, esta expansión parece más sólida que su contraparte con las células DN2. Finalmente, la fracción DN4 presenta valores diminutos en la circulación tanto de pacientes con COVID-19 como de controles sanos, no se encontraron diferencias significativas en sus valores.

**A**



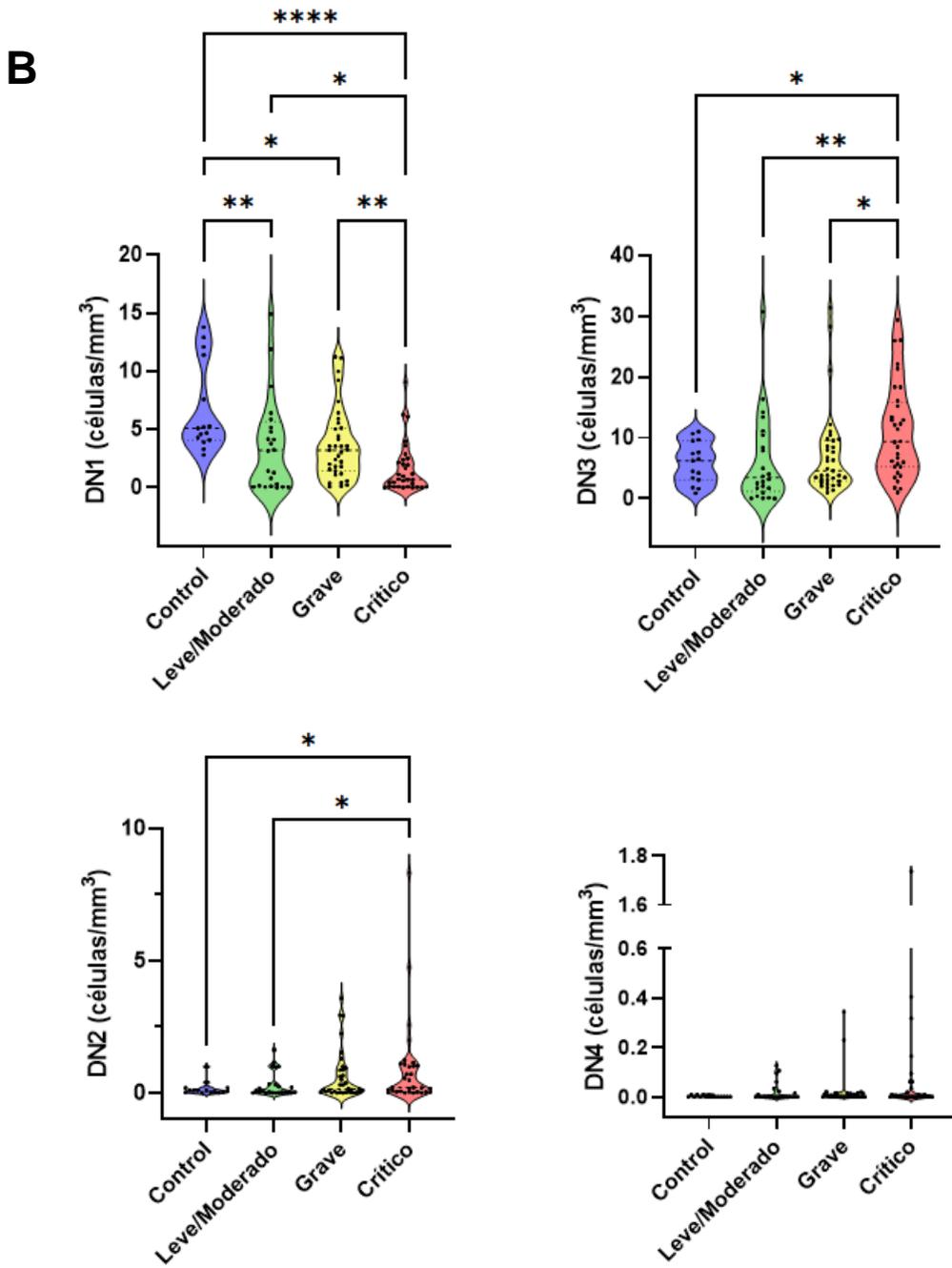


Figura 15. **Alteraciones en porcentajes y números absolutos de las subpoblaciones de células B DN de pacientes con COVID-19.** (A) Análisis comparativo de los porcentajes de las subpoblaciones DN1, DN2, DN3 Y DN4 en relación con las células B CD19<sup>+</sup>. (B) Análisis comparativo de los números absolutos de las subpoblaciones DN1, DN2, DN3 Y DN4. Todas los porcentajes o números absolutos

muestran la media (línea discontinua), adicionalmente arriba y abajo los cuartiles (líneas punteadas). Los datos fueron analizados a través de la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba *post-hoc* de Dunn. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

### **Las subpoblaciones DN se asocian con diferentes perfiles clínicos del COVID-19.**

Para dilucidar el posible papel biológico de estas subpoblaciones de células B poco estudiadas, tratamos de asociar sus valores en circulación periférica con las variables clínicas y de laboratorio. Los parámetros biológicos de este análisis fueron seleccionados con base a su relevancia como biomarcadores en el COVID-19. Es evidente que cada subpoblación del compartimento DN mostró un patrón de correlación específico (Fig. 16). Curiosamente, el perfil generado por los porcentajes y números absolutos del fragmento DN1, relevaron correlaciones principalmente negativas con muchos de los parámetros analizados (como la escala NEWS y el dímero-D), especialmente relacionadas con un estado proinflamatorio en pacientes con COVID-19. Por otro lado, los parámetros respiratorios ( $SO_2$  e índice de Kirby) presentan una correlación positiva con los valores del fragmento DN1, además, otra correlación positiva interesante de esta subpoblación fue con la albumina, la cual en concentraciones bajas se utiliza como un marcador de inflamación.

Sorpresivamente, la subpoblación DN3 presenta un patrón opuesto a la subpoblación DN1, y de la misma forma presenta varios valores significativos. Por ejemplo, la subpoblación DN3 presenta una correlación negativa con los valores de  $SO_2$  y una correlación positiva con la escala NEWS. Con respecto a la subpoblación DN2, presenta un patrón similar que DN3, no obstante, los valores de las correlaciones no son tan robustos y significativos. Finalmente, el fragmento DN4 no presenta un patrón definido, robusto y significativo como las otras subpoblaciones.

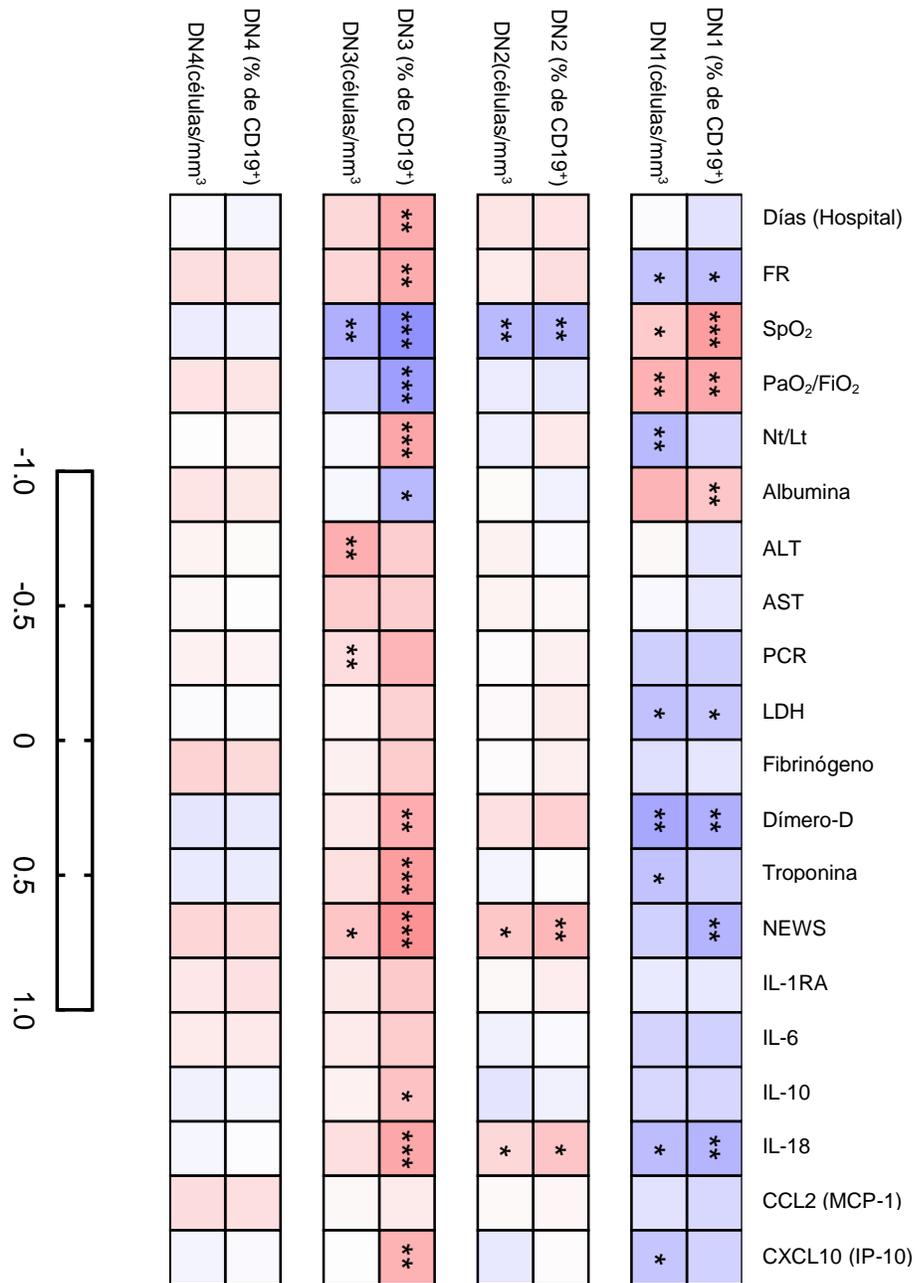


Figura 16. **Perfiles de correlación de las subpoblaciones de células B DN y parámetros biológicos de pacientes con COVID-19.** Matriz de correlación que muestra gráficamente el valor del coeficiente de Spearman, calculado entre los valores de las subpoblaciones DN y las variables clínicas, de laboratorio y las citocinas séricas indicadas del total de pacientes con COVID-19 de nuestro grupo de estudio. Los datos fueron analizados a través de la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba *post-hoc* de Dunn. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

## Las subpoblaciones DN segregan los casos leves/moderados, graves y críticos del COVID-19.

Tomando en cuenta los cambios en los porcentajes y números absolutos de las subpoblaciones DN1, DN2, y DN3 (excluyendo el compartimento celular DN4 debido a su escasa presencia en los pacientes), los diferentes parámetros clínicos y de laboratorio segregamos a los pacientes con COVID-19, empleando un análisis de componentes principales PCA, visualizado a través de un diagrama de dispersión 3D (Fig.17). Los ejes incluyen los tres componentes con mayor proporción de varianza: 28.6%, 8.7% y 6.4%, respectivamente. Los datos graficados representan el 43.7% de la varianza completa, valor que le da un alto poder informativo y de mayor precisión para su interpretación. También, graficamos elipses con intervalo de confianza del 95% para mostrar las áreas de intersección entre la severidad de la enfermedad.

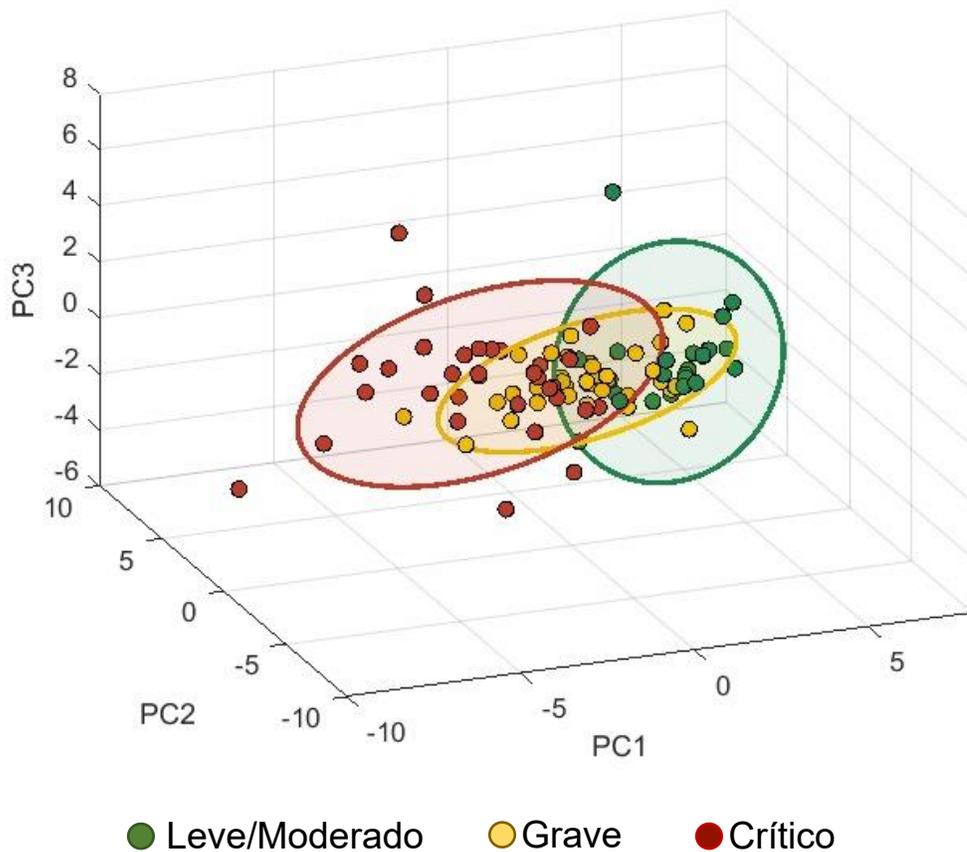


Figura 17. **Los parámetros biológicos (datos clínicos y de laboratorio) y las subpoblaciones DN se asocian con la severidad del COVID-19.** Representación tridimensional del PCA, considerando las variables clínicas y de laboratorio, más los valores de las subpoblaciones DN1, DN2 y DN3. Cada punto representa un solo paciente, y cada color representa la severidad del COVID-19. Cada grado de severidad presenta una elipse con un intervalo de confianza del 95%.

En primera instancia se observó que los grupos de pacientes con enfermedad leve/moderada y grave presentan menor dispersión en comparación con los pacientes con enfermedad crítica. Por otro lado, los pacientes críticos y leves/moderados presentaron mayor dispersión, mientras que el grupo de pacientes con enfermedad grave presento una mayor similitud con ambos grupos de pacientes.

Adicionalmente, incluimos un gráfico de dispersión de 2 dimensiones con el fin de visualizar el grado de influencia de las subpoblaciones de células B DN de forma independiente entre los componentes principales 1 y 2 (Fig.18 y Fig. complementaria 2). Se puede observar que las variables: porcentaje de DN2% (donde el porcentaje se denota como %), números absolutos de DN2# (donde la cuenta absoluta se simboliza como #) y la variable DN3# están correlacionadas positivamente. En contraparte, se puede observar una correlación negativa entre DN1% y las variables mencionadas (eje vertical), de la misma forma se presenta el mismo comportamiento entre DN1# y DN3% (eje horizontal). Finalmente, se corrobora el hecho de que la presencia de la subpoblación DN1 se correlacione con pacientes leves/moderados, mientras que para las subpoblaciones DN2/DN3 con pacientes críticos.

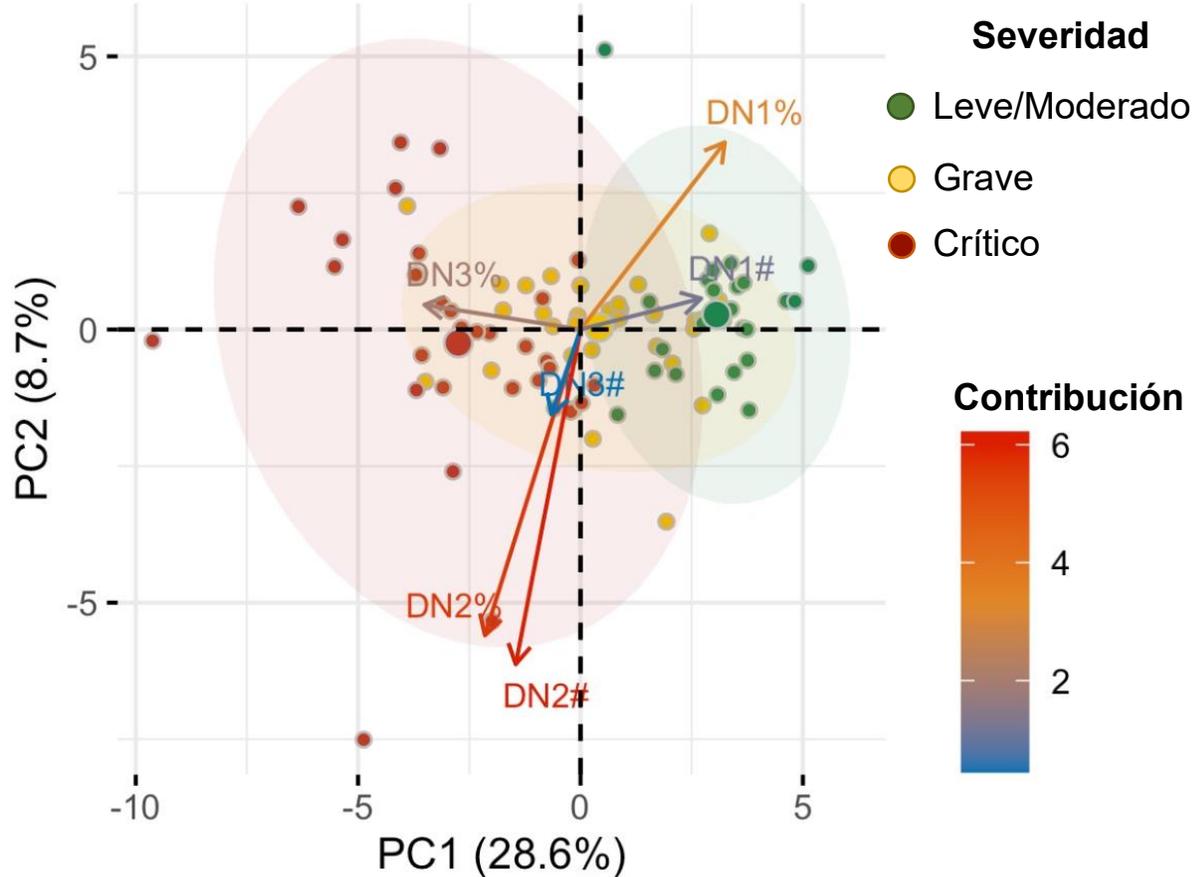


Figura 18. **Las subpoblaciones DN se asocian con la severidad del COVID-19.** Representación en segunda dimensión del PCA considerando los parámetros biológicos y las subpoblaciones celulares DN1, DN2 y DN3. Las flechas representan las contribuciones relativas de cada subpoblación celular DN, acorde a la escala indicada. Cada grado de severidad presenta una elipse con un intervalo de confianza del 95%.

## 4.2 Discusión

A través del tiempo se ha descrito que fisiológicamente la contribución de las células B a la resolución de un proceso infeccioso propiamente se establece en etapas avanzadas, existen informes que describen que algunas subpoblaciones de este linaje podrían participar durante las fases agudas de una infección, independientemente de la diferenciación a células plasmáticas y su producción de anticuerpos. Entre ellos, células B "atípicas", que también son denominadas innatas a razón de que pueden montar una respuesta por expresar receptores tipo Toll (TLR), incluidas las células B DN que se expanden notablemente en procesos infecciosos crónicos, así como trastornos autoinmunes [121-123].

Además de la subpoblación DN2, que se ha reportado una expansión con anterioridad en LEG, infección por Hepatitis C o VIH [56,119,124], y actualmente en COVID-19 [116], se han descrito como precursores de células plasmáticas diferenciadas a través de la extrafolicular [56,107]; sin embargo aún no se ha profundizado sobre el posible papel de las otras subpoblaciones restantes del compartimento DN. Interesantemente, a lo largo de este trabajo encontramos alteraciones significativas de las subpoblaciones DN1, DN2 y DN3 durante el desarrollo agudo de la COVID-19.

Como se pensó, la subpoblación DN2 presento un incremento en los casos COVID-19, expandiéndose acorde a la severidad de la enfermedad, pero fue más notable en pacientes críticos. Esta expansión puede ser posible por el relevante ambiente proinflamatorio presente en estos pacientes; en nuestro grupo de estudio, esto podría evidenciarse por la correlación positiva de estas células DN2 con las concentraciones de IL-18, sugiriendo que probablemente podría estar involucrada en su expansión debido que está asociada a respuestas inmunes tipo 1 y que parece ser necesaria para su diferenciación [108, 125]. En vista de que las células DN2 también demostraron correlaciones positivas con indicadores de severidad de la enfermedad (SpO<sub>2</sub> o NEWS), la idea de un ambiente proinflamatorio contribuyente se reafirma nuevamente. No obstante, no podemos descartar la influencia directa de estas células en el agravamiento de la enfermedad ya que su perfil proinflamatorio ha sido descrito previamente [107,126].

De igual forma que las células DN2, la subpoblación DN3 se incrementó con la severidad de la enfermedad, pero de manera más robusta. Inesperadamente, esta expansión está fuertemente asociada con un patrón asociado a un trastorno inflamatorio, donde los marcadores asociados a la inflamación se correlacionan positivamente con las proporciones de las células DN3, mientras que los parámetros ventilatorios presentan lo opuesto. También, la proporción aumentada de la subpoblación DN3 parece estar relacionada con desenlaces fatales en pacientes más graves, lo que nos hace sospechar una función proinflamatoria de estas células. Aunque aún no hay idea acerca de su función y origen, por el momento, la COVID-19 parece ser la única condición reportada donde las células DN3 están expandidas, posicionándolas como candidatas interesantes para estudios adicionales.

En contraparte, las células DN1 exhibieron una disminución en sus proporciones en los casos con COVID-19, severo, siendo más evidente en casos críticos. Cuando se realizó el análisis de correlación con los parámetros biológicos (variables clínicas/laboratorio y citocinas), los números de las células DN1 mostraron un comportamiento contrario al de las células DN2 o DN3, donde se presentaron varias correlaciones negativas con marcadores proinflamatorios y con un perfil de correlación positiva con parámetros ventilatorios. En consecuencia, una proporción elevada de células DN1 parece estar asociado con un curso de la enfermedad de menor intensidad e incluso con un mejor desenlace en pacientes hospitalizados. Una vez más, a razón de que no se reporta nada sobre las funciones de esta subpoblación, solo podemos debatir sobre su posible papel antiinflamatorio, ya que se ha descrito un conjunto de células con fenotipo similar a las DN1, se ha documentado que fomenta la proliferación de células T reguladoras (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> in vitro <sup>[127]</sup>. Por esta razón, es probable que las células DN1 puedan tener propiedades de células B reguladoras (Breg) no descritas anteriormente, y de esta forma ayuden a mantener la homeostasis en los casos leves/moderados de COVID-19 pero atenuándose en los casos graves o críticos.

Por último, a medida que empleamos los porcentajes y números absolutos de las subpoblaciones DN junto con las características clínicas/de laboratorio y citocinas (descritos como biomarcadores de pronóstico relevantes en COVID-19 <sup>[8,9]</sup>) para un

enfoque multivariado, consideramos que la medición de estos compartimentos celulares definitivamente apoya la segregación de pacientes según la severidad de la enfermedad, donde las células DN1 y DN2/DN3 indican importantes contribuciones para diferenciar a los casos leves/moderados y graves/críticos, respectivamente, con una solidez semejante o incluso mejor que la mayoría de los parámetros estudiados aquí (Figura suplementaria 2).

La utilidad de determinar estas subpoblaciones DN como biomarcadores potenciales para enfoques de pronóstico es una característica que no es posible determinar en nuestro estudio y debe abordarse mediante un estudio longitudinal que posiblemente arroje a la luz los posibles roles patogénicos o protectores funcionales de este compartimento. Además, es importante caracterizarlas a profundidad para describir posibles mecanismos con los que interactúen para favorecer un ambiente proinflamatorio o regulen la respuesta inmunológica.

**Capítulo 5.**  
**Conclusiones**

## 5.1 Conclusiones

En conclusión, demostramos que en el compartimento de sangre periférica se pueden determinar diferentes estadios de maduración de las células B. En el contexto de la infección por SARS-CoV-2 encontramos alteraciones significativas en tres compartimentos: inmadura, efectora y DN, estos cambios pueden ser detectados en una etapa temprana de la enfermedad (<7 días) y se pueden asociar a la severidad del COVID-19. Este hecho apoya la noción de que las células B participan en momentos iniciales para contener y resolver procesos infecciosos. También, estos cambios en las subpoblaciones de células B generan firmas que pueden determinar el fenotipo clínico de COVID-19 independientemente de los criterios empleados para definir la severidad de la enfermedad.

Por otra parte, corroboramos que el compartimento de células B presenta un fenotipo que sugiere una activación mediante la vía extrafolicular. Esto lo observamos al valorar la expresión de CXCR5, quimiorreceptor fundamental para la activación folicular. En este trabajo demostramos que los pacientes muestran una reducción que inicia en el compartimento naïve y se sostiene en células B de memoria con cambio de isotipo y el compartimento DN. Además, reafirmamos que la presencia del factor T-bet está implicado en la respuesta de las células B contra agentes virales como se ha documentado con anterioridad por el aumento de su expresión.

Adicional a la generación de perfiles definidos por los cambios en las subpoblaciones de células B, existe una correlación cercana con diferentes variables. Esto implica que la contracción o expansión de este compartimento celular presenta un cambio lineal con parámetros clínicos, que pueden apoyar el estado clínico del paciente y funcionar con un biomarcador en procesos patológicos.

Finalmente, corroboramos la importancia de evaluar el compartimento B doble negativo. Primordialmente las alteraciones de las subpoblaciones DN1 y DN3. Respecto a las células DN1 están presentes en controles y pacientes que presentan un cuadro clínico no tan agresivo. En contraste, las células DN3 se expanden en presencia de un estado clínico de mayor severidad, entendiendo que el incremento de esta subpoblación en

COVID-19 está acompañado de un ambiente inflamatorio importante y trastornos en la hematosiis.

## **5.2 Trabajo a futuro**

En este trabajo se observaron diferentes cambios en el compartimento de células B, así como en fenotipo. Además, estos cambios se correlacionan con diferentes variables asociadas algún fenotipo clínico en particular por ello consideramos a desarrollar los siguientes aspectos a futuro:

- Realizar un estudio longitudinal de los cambios en las subpoblaciones de células B para evaluar su potencial valor como biomarcador.
- Estudiar los cambios fenotípicos y metabólicos de las células B en un ambiente hipóxico, para conocer la injerencia de este factor en su función.
- Evaluar la eficiencia de la respuesta antiviral de las células B que no expresan quimiorreceptores para la activación folicular (CXCR5, CCR7) pero que expresan el factor de transcripción T-bet, con el fin de aclarar su efectividad para neutralizar agentes patógenos.
- Caracterizar a profundidad el compartimento DN, en particular las subpoblaciones DN1 y DN3, para conocer su posible función en un estado fisiológico y patológico.

## **Apéndice A.**

### **Información adicional**

Tabla suplementaria 1. Características clínicas de la enfermedad por Coronavirus 2019 de los pacientes (capítulo 3) y de los individuos sanos.

Características	Todos los pacientes (n=52)	Leves/Moderados (n=19)	Graves (n=16)	Críticos (n=17)
<b>Género – n. (%)</b> Femenino Masculino	20 (38) 32 (62)	10 (53) 9 (47)	7 (44) 9 (56)	3 (18) 14 (82)
<b>Edad en años – mediana (rango)</b>	46 (25-80)	39 (25-68)	48 (25-68)	52 (29-80)
<b>Diagnóstico de SARS-COV-2 (%)</b> PCR positivo de hisopado nasofaríngeo	52 (100)	19 (100)	16 (100)	17 (100)
<b>Día con síntomas – mediana (rango)</b>	8 ±5.2 (1-30)	5 ±2.9 (1-10)	9 ±5.1 (3-22)	10 ±6.0 (5-30)
<b>Síntomas – n. (%)</b> Tos Cefalea Fiebre Disnea Artralgia Mialgia Odinofagia Congestión nasal Congestión conjuntival Náusea o vómito Diarrea Fatiga	42 (81) 30 (58) 43 (83) 31 (60) 30 (58) 34 (65) 17 (33) 15 (29) 5 (10) 0 (0) 11 (21) 27 (52)	14 (74) 14 (74) 14 (74) 5 (26) 8 (42) 10 (53) 6 (32) 5 (26) 3 (16) 0 (0) 2 (10) 9 (47)	13 (81) 8 (50) 16 (100) 11 (69) 11 (69) 11 (69) 6 (37) 5 (31) 1 (6) 0 (0) 3 (19) 8 (50)	15 (88) 8 (47) 13 (76) 15 (88) 11 (65) 13 (76) 5 (29) 5 (29) 1 (6) 0 (0) 6 (35) 10 (59)
<b>Signos vitales – mediana</b> Presión arterial media Frecuencia cardiaca Frecuencia respiratoria SO <sub>2</sub> Temperatura	90 ±11.5 102 ±20.7 25 ±8.2 86 ±12.3 37.2 ±0.7	91 ±10.6 94 ±20.9 20 ±3.7 95 ±1.7 37.1 ±0.6	91 ±10.9 108 ±17.5 24 ±5.5 88 ±4.3 37.2 ±0.8	89 ±13.6 107 ±21.4 31 ±9.7 75 ±15.3 37.3 ±0.7
<b>Valores de laboratorio</b> Cuenta de leucocitos Linfocitos totales Hemoglobina, g/dL Plaquetas, K/uL Creatinina, mg/dL Bilirrubina total, mg/dL Aspartato aminotransferasa, U/L Alanina aminotransferasa, U/L Proteína C reactiva, mg/dL Ferritina, ng/mL			7.0 ±2.3 831.7 ±559.1 15.2 ±1.4 208 ±76.8 0.8 ±0.2 0.6 ±0.1 49.6 ±34.1 50.8 ±40.4 54.1 ±173.2 783 ±892.5	10.8 ±4.6 731 ±357.4 15.3 ±2.2 231 ±81.1 2.4 ±5.4 0.6 ±0.2 124.3 ±242.8 108.1 ±250.9 15.9 ±7.1 1747.7 ±3444.0

Lactato deshidrogenasa, U/L Dímero-D, ng/mL Troponina, pg/mL INR			347.4 ±160.4 990.9 ±1498 5.3 ±2.7 1.1 ±0.09	541.3 ±240.1 1127 ±796.7 257.7 ±570.8 1.2 ±0.7
<b>Escalas de severidad</b> qSOFA NEWS PSI-PORT			1 ±0.6 7 ±2.0 54 ±24.0	1 ±0.8 8 ±2.9 92 ±41.0
<b>Complicaciones – n. (%)</b> Shock Infecciones secundarias			0 (0) 1 (6)	3 (18) 8 (47)
<b>Valores de gasometría</b> FiO <sub>2</sub> pH Art PaO <sub>2</sub> Art PaCO <sub>2</sub> Art HCO <sub>3</sub> Lactato Índice de Kirby			27 ±13.1 7.43 ±0.09 70.0 ±30.5 30.5 ±3.1 21.8 ±1.7 1.3 ±0.6 271.5 ±78.4	48 ±22.0 7.42 ±0.09 63.4 ±28.0 30.1 ±3.2 19.8 ±3.5 2.1 ±1.6 163.2 ±113.8
<b>Desenlace – n. (%)</b> Admisión hospitalaria Defunción Mejora clínica		0 (0) 0 (0) 19 (100)	16 (100) 0 (0) 16 (100)	15 (100) 9 (53) 4 (23)
<b>Individuos sanos</b> Edad <b>Género</b> Femenino Masculino	37 (32-41)  3 4			

Tabla suplementaria 2. **Números absolutos de las subpoblaciones de las células B.**

Subpoblación celular	Control	Leves/ Moderados	Graves	Críticos	P value (Leves/ Moderados vs Graves)	P value (Leves/ Moderados vs Críticos)
<b>Células B cuenta/mL</b>	58,310 (36,971- 68,804)	99,810 (54,599- 166,600)	73,041 (39,747- 108,953)	67,147 (29,062- 101,090)	ns	ns
<b>Memoria Clásica cuenta/mL</b>	20,925 (19,214- 25,679)	23,126 (12,956- 37,155)	14,258 (6,412- 18,904)	17,593 (6,379- 24,273)	0.018	0.048
<b>USwM cuenta/mL</b>	2,867 (1,630- 3,375)	2,667 (1,821- 4,522)	1,030 (510- 1,848)	1,316 (606- 2,136)	0.001	0.007
<b>SwM cuenta/mL</b>	18,425 (16,125- 22,080)	20,328 (10,240- 32,953)	11,353 (5,689- 16,401)	15,847 (5,655- 21,351)	0.02	ns
<b>ASC cuenta/mL</b>	334 (162- 437)	1,276 (669- 1,725)	1,127 (922- 2,781)	909 (296- 3,082)	ns	ns
<b>T1/T2 cuenta/mL</b>	697 (544- 976)	7,497 (2,065- 9,608)	1,674 (602- 5,098)	1,433 (473-976)	0.006	0.006
<b>TrCD21<sup>-/lo</sup> cuenta/mL</b>	137 (71- 297)	2,626 (549- 3,503)	810 (304- 1,616)	695 (106- 3,043)	ns	0.02
<b>TrCD21<sup>+</sup> cuenta/mL</b>	571 (461- 803)	4,376 (1,312- 6,120)	304 (38- 1,785)	358 (272- 1,981)	0.0002	0.002
<b>Memoria No Clásica cuenta/mL</b>	8,945 (3,013- 12,604)	11,578 (9,270- 18,929)	12,579 (5,685- 16,615)	9,912 (2,678- 16,499)	ns	ns
<b>M CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> cuenta/mL</b>	4,321 (1,956- 7,114)	7,691 (6,068- 12,274)	7,597 (3,839- 1,678)	6,556 (1,496- 9,592)	ns	ns
<b>M CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> cuenta/mL</b>	2,641 (1,054- 4,603)	3,838 (2,977- 9,169)	3,064 (1,399- 5,664)	3,008 (1,338- 5,565)	ns	ns
<b>DN cuenta/mL</b>	7,706 (4,436- 10,009)	14,439 (7,964- 25,352)	10,240 (5,605- 25,317)	15,919 (4,334- 19,937)	ns	ns
<b>DN1 cuenta/mL</b>	3,818 (3,235- 5,219)	6,414 (3,752- 11,897)	3,605 (1,595- 5,127)	3,586 (500- 6,751)	0.008	0.009
<b>DN2 cuenta/mL</b>	30 (14- 245)	46 (24-98)	82 (24- 477)	24 (0-46)	ns	ns
<b>DN3 cuenta/mL</b>	2,862 (1,122- 5,580)	5,044 (2,992- 13,778)	5,962 (2,924- 20,086)	10,446 (2,558- 14,506)	ns	ns
<b>DN4 cuenta/mL</b>	4 (2-10)	0 (0-18)	0 (0-14)	0 (0-12)	ns	ns
<b>Naïve cuenta/mL</b>	12,131 (7,814- 22,430)	20,113 (7,649- 56,431)	16,885 (7,053- 30,327)	13,380 (4,928- 28,841)	ns	ns
<b>resN cuenta/mL</b>	12,066 (7,755- 22,361)	17,567 (7,649- 56,268)	16,761 (7,035- 30,111)	13,279 (4,902- 28,748)	ns	ns
<b>actN cuenta/mL</b>	62 (32-71)	82 (41- 333)	128 (57- 260)	90 (9-152)	ns	ns

Los datos obtenidos son presentados con la mediana (IQR). Los valores de P de las comparaciones de casos leves/moderados y graves o críticos fueron obtenidos a través de un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba corregida de Dunn. IQR, rango intercuartílico.

Tabla suplementaria 3. **Análisis comparativo de los porcentajes de las subpoblaciones de células B de pacientes con COVID-19 vs. controles sanos pareados por edad.**

<b>Subpoblación de Células B</b>	<b>p-Value (Controles vs pacientes con COVID-19)</b>	<b>Test</b>
<b>T1/T2 (%)</b>	0.0030**	U
<b>TrCD21-/lo (%)</b>	0.0009***	U
<b>TrCD21+ (%)</b>	0.0057**	U
<b>ASC (%)</b>	0.019**	U
<b>Memoria Clásica (%)</b>	0.0493*	t
<b>USwM (%)</b>	0.0102*	U
<b>SwM (%)</b>	0.0859+	t
<b>DN (%)</b>	Ns	U
<b>DN1 (%)</b>	0.0617+	U
<b>DN2 (%)</b>	Ns	U
<b>DN3 (%)</b>	0.0285*	U
<b>DN4 (%)</b>	Ns	U
<b>Naïve (%)</b>	Ns	U
<b>resN (%)</b>	Ns	U
<b>actN (%)</b>	Ns	U

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$ ; +  $p \leq 0.1$

Los valores de p fueron obtenidos por test de U-Mann-Whitney o t de student entre controles sanos (n=7) y pacientes con COVID-19 (n=11). El rango de edad se realizó en individuos entre 32-41 años.

Tabla suplementaria 4. **Características clínicas de la enfermedad por Coronavirus 2019 de los pacientes (capítulo 4) y de los individuos sanos.**

Características	Controles sanos (n = 15)	Todos los pacientes (n = 91)	Leves/moderados (n = 24)	Graves (n = 35)	Críticos (n = 32)
Género—n. (%)					
Femenino	6 (40)	31 (34)	10 (42)	16 (46)	5 (16)
Masculino	9 (60)	60 (66)	14 (58)	19 (54)	27 (84)
Edad en años—mediana (rango)	45 (24–64)	48 (23–80)	32 (25–68)	50 (23–80)	54 (33–80)
Diagnóstico de SARS-COV-2 (%)					
PCR + (hisopado nasofaríngeo)	0 (0)	91 (100)	24 (100)	35 (100)	32 (100)
Días con síntomas—mediana (rango)	NA	7 ± 5.1 (1–30)	3.5 ± 4.3 (1–21)	9 ± 4.7 (1–22)	8 ± 5.2 (3–30)
Medida de severidad de la enfermedad y signos vitales—mediana ± SD					
NEWS	ND	8 ± 3.66	2 ± 1.56	8 ± 2.55	10 ± 2.19
Frecuencia respiratoria	ND	24 ± 9.99	18 ± 3.57	24 ± 6.95	35.5 ± 9.23
SO <sub>2</sub>	ND	88 ± 17.18	95 ± 2.2	88 ± 9.69	62 ± 17.53
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	ND	244 ± 108.5	304.8 ± 11.3 3	247 ± 104.7	98 ± 82.2
Valores de laboratorio—mediana ± SD					
Leucocitos, células/μL	5200 ± 1189	8200 ± 4620	6200 ± 3833	7900 ± 3837	10,950 ± 514 6
Linfocitos, células/μL	1058 ± 516.4 0	925 ± 689.50	1435 ± 1023	851 ± 363.3	695 ± 441
neutrófilos, células/μL	ND	6100 ± 4936	3715 ± 1618	6100 ± 3768	9158 ± 5761
Índice neutrófilo - linfocito	ND	6.75 ± 14.28	2.29 ± 9.15	6.75 ± 7.41	12.56 ± 19.5
Albumina, g/dL	ND	3.6 ± 0.69	4.63 ± 0.36	3.74 ± 0.45	3.1 ± 0.49

Alanina aminotransferasa, U/L	ND	37.5 ± 4865	25.5 ± 18.8	40 ± 7447	37.9 ± 186
Aspartato aminotransferasa, U/L	ND	36.8 ± 118	23 ± 8.27	47 ± 28.36	45.8 ± 183.2
Proteína C reactiva, mg/dL	ND	11.4 ± 9.94	0.77 ± 3.26	9.99 ± 8.83	18.37 ± 9
Lactato deshidrogenasa, U/L	ND	330.5 ± 199.7	178.5 ± 36.23	304 ± 122.8	501 ± 212.1
Fibrinógeno, mg/dL	ND	611.5 ± 192.8	353 ± 110.3	611.5 ± 172.1	654 ± 161
Dímero-D, ng/mL	ND	672 ± 2329	313 ± 136.6	497.5 ± 913.4	1472 ± 3224
Troponina, pg/mL	ND	5.7 ± 286.4	2.05 ± 1.21	4.2 ± 5.24	14.8 ± 433.5
Concentración de citocinas —mediana ± SD					
IL-1RA, pg/mL	ND	60.2 ± 387.6	47.98 ± 36.19	57.13 ± 249.2	92.08 ± 587
IL-6, pg/mL	ND	24.19 ± 95.43	13.27 ± 69.18	21.13 ± 60.25	42.13 ± 133
IL-10, pg/mL	ND	15.3 ± 84.41	13.38 ± 25.47	14.71 ± 108.3	25.94 ± 84.17
IL-18, pg/mL	ND	632 ± 546.4	516.7 ± 215.9	555.9 ± 705.2	987.6 ± 420
MCP-1, pg/mL	ND	531.7 ± 387.3	497 ± 867.5	541.5 ± 270.6	601.3 ± 525.6
IP-10, pg/mL	ND	1621 ± 2084	1081 ± 12.02	1701 ± 2031	3194 ± 2412
Desenlace—n. (%)					
Admisión hospitalaria	0 (0)	67 (74)	0 (0)	35 (100)	32 (100)
Defunción	NA	18 (20)	0 (0)	4 (11)	14 (44)
Mejoría clínica	NA	73 (80)	24 (100)	31 (89)	18 (56)

NA: No Aplica, ND: No Determinado, SD: Desviación Standard.

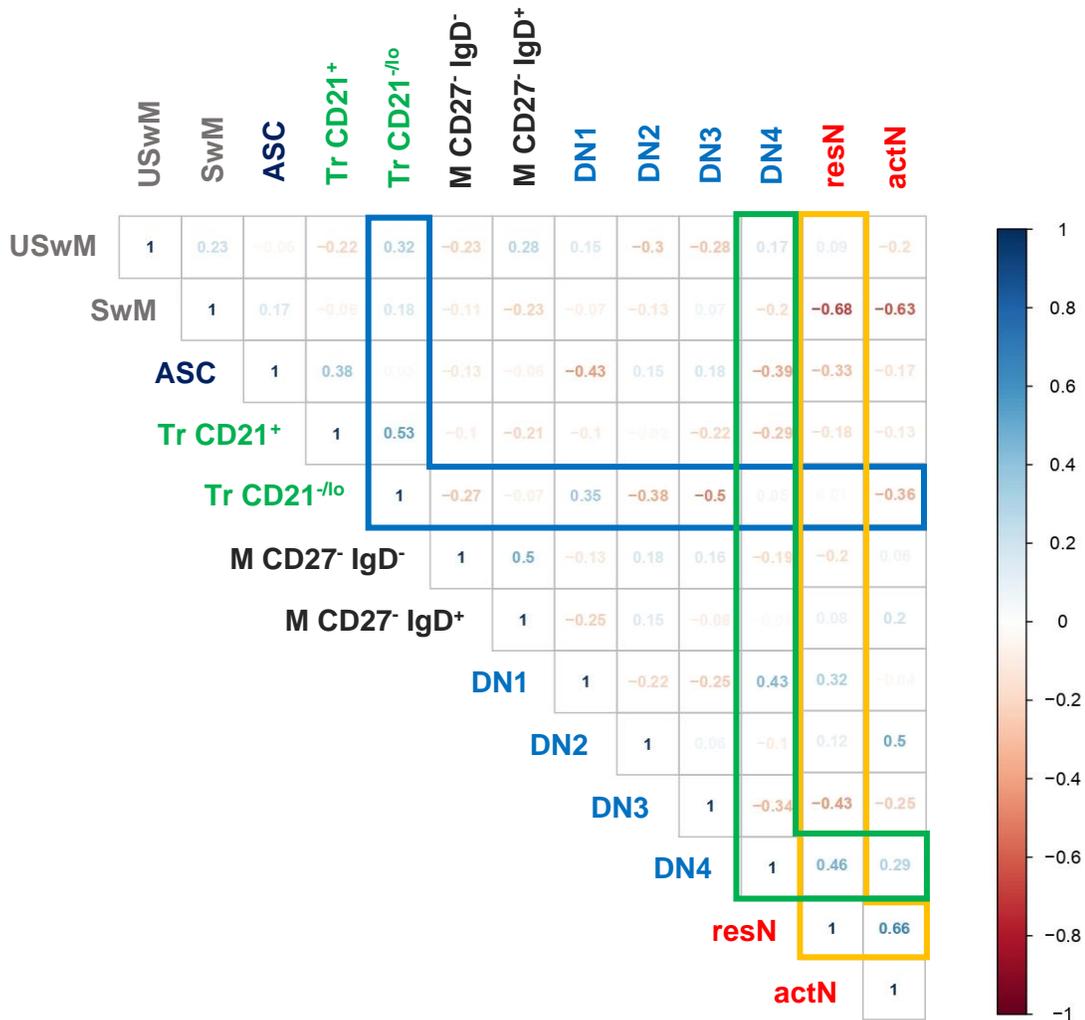


Figura suplementaria 1. **Matriz de correlación entre las subpoblaciones de células B de los pacientes con COVID-19.** La matriz compara todas las subpoblaciones de células B resultantes de las poblaciones parentales, muestran los valores del coeficiente de Spearman según la escala de color lateral derecho; la intensidad del color de los números denota la fuerza de correlación. Los valores enmarcados con azul, verde y amarillo indican un número elevado de correlaciones moderadamente fuertes en las subpoblaciones Tr CD21<sup>-</sup>, DN4 y resN, razón por la cual son susceptibles para excluirlas del análisis de agrupación jerárquico.

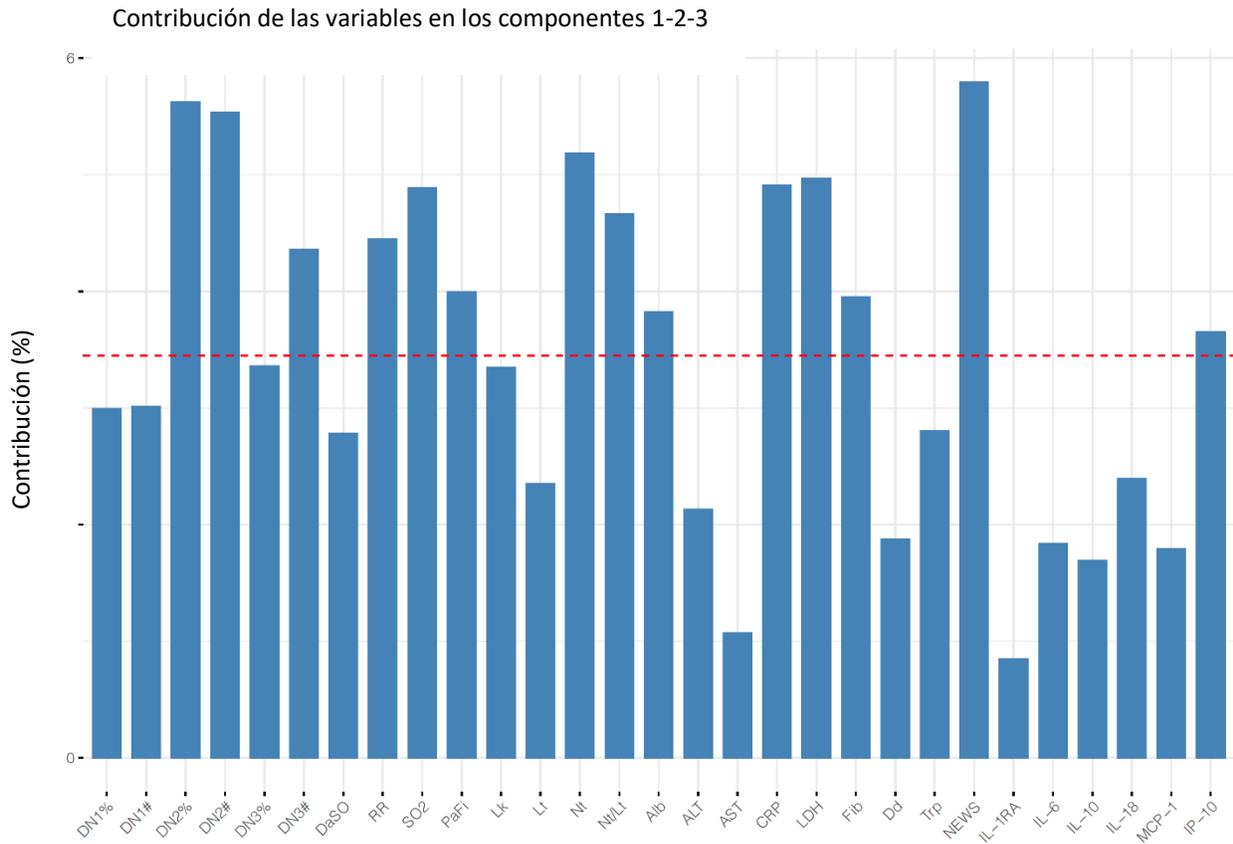


Figura suplementaria 2. **Gráfico de barras con la contribución acumulada de los componentes PC1-PC3 de todos los parámetros evaluados.** La línea discontinua roja indica el valor promedio esperado, estipulando el caso de que cada variable contribuya uniformemente (contribución del 100% dividida por el número total de variables las cuales son 29). De todos los parámetros presentados, DN2%, DN2#, DN3#, RR, SO2, PaFi, Nt, NT/LT, Alb, CRP, LDH, Fib, NEWS e IP-10 representan variables esenciales para los componentes PC1-PC3, considerando que su contribución esta arriba de la línea de referencia.

## **Apéndice B.**

### **Publicaciones y actividades académicas**

## Publicaciones internacionales indexadas en JCR

1.- **Sosa-Hernández, V. A.**, Torres-Ruíz, J., Cervantes-Díaz, R., Romero- Ramírez, S., Páez-Franco, J. C., Meza-Sánchez, D. E., ... & Maravillas-Montero J. L. (2020). B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, 11, 3244. DOI: 10.3389/fimmu.2020.611004.

2.- **Sosa-Hernández, V. A.**, Romero-Ramírez, S., Cervantes-Díaz, R., Carrillo-Vázquez, D. A., Navarro-Hernandez, I. C., Whittall-García, L. P., ... & Maravillas-Montero, J. L. (2022). CD11c+ T-bet+ CD21hi B cells are negatively associated with renal impairment in Systemic Lupus Erythematosus and act as a marker for nephritis remission. *Frontiers in immunology*, 2348. DOI: 10.3389/fimmu.2022.892241

3.- Cervantes-Díaz, R. \*, **Sosa-Hernández, V. A.\***, Torres-Ruíz, J., Romero- Ramírez, S., Cañez-Hernández, M., ... & Maravillas-Montero, J. L. (2021). Severity of SARS-CoV-2 infection is linked to double-negative (CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) B cell subset numbers. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 1–10. Advance online publication. DOI: 10.1007/s00011-021-01525-3. **\*Co-first authors.**

4.- Cervantes-Díaz, R. \*, **Sosa-Hernández, V. A.\***, Romero-Ramírez, S. \*, Torres-Ruiz, J., Pérez-Fragoso, A., Meza-Sánchez, D. E., Gómez-Martín, D., & Maravillas-Montero, J. L. (2022). Circulating B10 regulatory cells are decreased in severe and critical COVID-19. *Journal of leukocyte biology*, 10.1002/JLB.5COVCRA0721-387RR. Advance online publication. DOI: <https://doi.org/10.1002/JLB.5COVCRA0721-387RR>. **\*Co-first authors.**

5.- Romero-Ramírez, S., **Sosa-Hernández, V. A.**, Cervantes-Díaz, R., Carrillo-Vázquez, D. A., Meza-Sánchez, D. E., Núñez-Álvarez, C., ... & Maravillas-Montero, J. L. (2023). Salivary IgA subtypes as novel disease biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 14, 1080154. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1080154

6.- Torres-Ruiz, J., Lomelín-Gascón, J., Lira Luna, J., Vargas-Castro, A. S., Pérez-Fragoso, A., Nuñez-Aguirre, M., Alcalá-Carmona B., Absalón-Aguilar A., Balderas-Miranda J., Maravillas-Montero J. L., Mejía-Domínguez N., Núñez-Álvarez C., Llorente L., Romero-Ramírez S., **Sosa-Hernández V. A.**, ... & Gómez-Martín, D. (2023). Novel clinical and immunological features associated with persistent post-acute sequelae of COVID-19 after six months of follow-up: a pilot study. *Infectious Diseases*, 55(4), 243-254. DOI: 10.1080/23744235.2022.2158217

7.- Torres-Ruiz, J. J., Lomelín-Gascón, J., Vargas-Castro, A. S., Lira-Luna, J., Pérez-Fragoso, A., Tapia-Conyer, R., Nuñez-Aguirre, M., Alcalá-Carmona, B., Absalón-Aguilar, A., Maravillas-Montero, J. L., Mejía-Domínguez, N. R., Núñez-Álvarez, C., Rull-Gabayet, M., Llorente, L., Romero-Ramírez, S., **Sosa-Hernández, V.A.**, ... & Gómez-Martín, D. Clinical and immunological features associated to the development of a sustained immune humoral response in COVID-19 patients: results from a cohort study. *Frontiers in Immunology*, 4145. DOI: 10.3389/fimmu.2022.943563

8.- Torres-Ruiz, J., Lomelín-Gascón, J., Lira-Luna, J., Pérez-Fragoso, A., Tapia-Conyer, R., Nuñez-Aguirre, M., Alcalá-Carmona, B., Absalón-Aguilar, A., Maravillas-Montero, J. L., Mejía-Domínguez, N. R., Núñez-Álvarez, C., Llorente, L., Romero-Ramírez, S., **Sosa-Hernández, V. A.**, ... Gómez-Martín, D. (2021). FANSY POSTCOV: A composite clinical immunological predictive index for post-COVID-19 syndrome unveils distinctive features in a cohort study of mild to critical patients. *Clinical and translational medicine*, 11(11), e623. DOI: 10.1002/ctm2.623

9.- Torres-Ruiz, J., Pérez-Fragoso, A., Maravillas-Montero, J. L., Llorente, L., Mejía-Domínguez, N. R., Páez-Franco, J. C., Romero-Ramírez, S., **Sosa-Hernández, V. A.**, ... & Gómez-Martín, D. (2021). Redefining COVID-19 Severity and Prognosis: The Role of Clinical and Immunobiotypes. *Frontiers in immunology*, 12, 689966. DOI: 10.3389/fimmu.2021.689966

10.- Soria-Castro, R., Meneses-Preza, Y. G., Rodríguez-Lopez, G. M., Romero-

Ramirez, S., **Sosa-Hernandez, V. A.**, Cervantes-Diaz, R., ... & Chacon-Salinas, R. (2021). Severe COVID-19 is marked by dysregulated serum levels of carboxypeptidase A3 and serotonin. *Journal of leukocyte biology*, 2021;1–7. DOI: 10.1002/JLB.4HI0221-087R

11.- Páez-Franco, J. C., Torres-Ruiz, J., **Sosa-Hernández, V. A.**, Cervantes- Díaz, R., Romero-Ramírez, S., Pérez-Fragoso, A., ... & Llorente, L. (2021). Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Scientific reports*, 11(1), 1-12. DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0

### **Actividades académicas**

#### Estancia y Congresos

- Proyecto desarrollado: Characterization of TNF receptors in CD21<sup>Low</sup> B cells in COVID patients. Center for Translational Cell Research – Center for Chronic Immunodeficiency of the Medical Center (ZTZ – CCI), Universitäts Klinikum Freiburg; Friburgo de Brisgovia – Alemania, Noviembre 2022 – Mayo 2023.
- Presentación oral: CD11c<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> CD21<sup>hi</sup> B cells are negatively associated with renal impairment in SLE. BBI Meeting 2023: Immune-mediated Diseases and Immunopathology; Faculté de Chirurgie Dentaire – Université de Strasbourg, Estrasburgo – Francia, Febrero 1 – 2, 2023.
- Presentación oral: B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 patients. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS 2022); San Francisco Marriot Marquis in San Francisco, CA – USA, Junio 21 – 24, 2022.

- Presentación de poster: Analysis of age-associated B cells (ABCs) in patients with Lupus Nephritis (LN). Keystone symposia. B Cell Renaissance: Epigenetics, Regulation and Immunotherapy; Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta – Canadá, Marzo 1 – 5, 2020.

#### Reconocimientos, talleres y seminarios

- ESID Medium-Term Fellowship expedido por European Society Immunodeficiencies.
- FCE Fusion Travel Award expedido por Federation of Clinical Immunology Societies.
- Mexico Data Analysis Workshop (Capítulo Citometría de Flujo – Sociedad Mexicana de Inmunología).
- Seminario: Alteraciones inmunológicas y metabólicas en pacientes con COVID-19. Unidad de Biomedicina – División de Investigación y Posgrado (Facultad de Estudios Superiores-UNAM).

#### Divulgación Científica

- Identifican poblaciones de células B asociadas a gravedad de COVID-19. Conexión Cinvestav; 2021. <https://conexion.cinvestav.mx/COVID-19/Contenido-COVID-19/identifican-poblaciones-de-c233lulas-asociadas-a-gravedad-de-covid-19>
- Células B atípicas como biomarcadores de complicación renal en pacientes con lupus. Avance y perspectiva, cuartil uno, ciencias naturales y de la salud; 2022. <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/category/cuartil-uno/ciencias-naturales-salud-cuartil-uno/>

## Referencias

1. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews. Microbiology*, *19*(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
2. Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, *17*(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
3. Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Robertson, D. L., Crits-Christoph, A., Wertheim, J. O., Anthony, S. J., Barclay, W. S., ... Rambaut, A. (2021). The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*, *184*(19), 4848–4856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
4. Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2022). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature reviews. Microbiology*, *20*(5), 315. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00711-2>
5. Lamers, M.M., Haagmans, B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, *20*, 270–284 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
6. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, *41*(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
7. Flerlage, T., Boyd, D. F., Meliopoulos, V., Thomas, P. G., & Schultz-Cherry, S. (2021). Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. *Nature reviews. Microbiology*, *19*(7), 425–441. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00542-7>
8. Schultze, J. L., & Aschenbrenner, A. C. (2021). COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*, *184*(7), 1671–1692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029>
9. Vabret, N., Britton, G. J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., Levantovsky, R., Malle, L., Moreira, A., Park, M. D., Pia, L., Risson, E., Saffern, M., Salomé, B., Esai Selvan, M., Spindler, M. P., Tan, J., van der Heide, V., Gregory, J. K., Alexandropoulos, K., ... Sinai Immunology Review Project (2020). Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*, *52*(6), 910–941. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>

10. Mohammed, R. N., Tamjidifar, R., Rahman, H. S., Adili, A., Ghoreishizadeh, S., Saeedi, H., Thangavelu, L., Shomali, N., Aslaminabad, R., Marofi, F., Tahavvori, M., Danshina, S., Akbari, M., & Ercan, G. (2022). A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19). *Cell communication and signaling : CCS*, 20(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00856-w>
11. Mogensen T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
12. Tartey, S., & Takeuchi, O. (2017). Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *International reviews of immunology*, 36(2), 57–73. <https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1261318>
13. Portela Sousa, C., & Brites, C. (2020). Immune response in SARS-CoV-2 infection: the role of interferons type I and type III. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 24(5), 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.07.011>
14. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
15. Jin, Y., Ji, W., Yang, H., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 293. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00454-7>
16. Shah, V. K., Firmal, P., Alam, A., Ganguly, D., & Chattopadhyay, S. (2020). Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Frontiers in immunology*, 11, 1949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01949>
17. García L. F. (2020). Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Frontiers in immunology*, 11, 1441. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01441>

18. Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
19. Urra, J. M., Cabrera, C. M., Porras, L., & Ródenas, I. (2020). Selective CD8 cell reduction by SARS-CoV-2 is associated with a worse prognosis and systemic inflammation in COVID-19 patients. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 217, 108486. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108486>
20. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., Chen, L., Li, M., Liu, Y., Wang, G., Yuan, Z., Feng, Z., Zhang, Y., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in immunology*, 11, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
21. De Biasi, S., Meschiari, M., Gibellini, L., Bellinazzi, C., Borella, R., Fidanza, L., Gozzi, L., Iannone, A., Lo Tartaro, D., Mattioli, M., Paolini, A., Menozzi, M., Milić, J., Franceschi, G., Fantini, R., Tonelli, R., Sita, M., Sarti, M., Trenti, T., Brugioni, L., ... Cossarizza, A. (2020). Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nature communications*, 11(1), 3434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
22. Wang, K., Chen, W., Zhang, Z., Deng, Y., Lian, J. Q., Du, P., Wei, D., Zhang, Y., Sun, X. X., Gong, L., Yang, X., He, L., Zhang, L., Yang, Z., Geng, J. J., Chen, R., Zhang, H., Wang, B., Zhu, Y. M., Nan, G., ... Chen, Z. N. (2020). CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 283. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00426-x>
23. Ye, Q., Wang, B., & Mao, J. (2020). The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *The Journal of infection*, 80(6), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
24. Peng, X., Ouyang, J., Isnard, S., Lin, J., Fombuena, B., Zhu, B., & Routy, J. P. (2020). Sharing CD4+ T Cell Loss: When COVID-19 and HIV Collide on Immune System. *Frontiers in immunology*, 11, 596631. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.596631>

25. Wang, Y., Zheng, J., Islam, M. S., Yang, Y., Hu, Y., & Chen, X. (2021). The role of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. *International journal of biological sciences*, *17*(6), 1507–1520. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59534>
26. Costela-Ruiz, V. J., Illescas-Montes, R., Puerta-Puerta, J. M., Ruiz, C., & Melguizo-Rodríguez, L. (2020). SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine & growth factor reviews*, *54*, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.001>
27. Apostolidis, S. A., Kakara, M., Painter, M. M., Goel, R. R., Mathew, D., Lenzi, K., Rezk, A., Patterson, K. R., Espinoza, D. A., Kadri, J. C., Markowitz, D. M., E Markowitz, C., Mexhitaj, I., Jacobs, D., Babb, A., Betts, M. R., Prak, E. T. L., Weiskopf, D., Grifoni, A., Lundgreen, K. A., ... Bar-Or, A. (2021). Cellular and humoral immune responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. *Nature medicine*, *27*(11), 1990–2001. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01507-2>
28. Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature reviews. Immunology*, *15*(8), 486–499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
29. Tan, Y. J., Goh, P. Y., Fielding, B. C., Shen, S., Chou, C. F., Fu, J. L., Leong, H. N., Leo, Y. S., Ooi, E. E., Ling, A. E., Lim, S. G., & Hong, W. (2004). Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *11*(2), 362–371. <https://doi.org/10.1128/cdli.11.2.362-371.2004>
30. Wu, H. S., Hsieh, Y. C., Su, I. J., Lin, T. H., Chiu, S. C., Hsu, Y. F., Lin, J. H., Wang, M. C., Chen, J. Y., Hsiao, P. W., Chang, G. D., Wang, A. H., Ting, H. W., Chou, C. M., & Huang, C. J. (2004). Early detection of antibodies against various structural proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients. *Journal of biomedical science*, *11*(1), 117–126. <https://doi.org/10.1007/BF02256554>

31. Klasse P. J. (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in biology*, 2014, 157895. <https://doi.org/10.1155/2014/157895>
32. Arvin, A. M., Fink, K., Schmid, M. A., Cathcart, A., Spreafico, R., Havenar-Daughton, C., Lanzavecchia, A., Corti, D., & Virgin, H. W. (2020). A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature*, 584(7821), 353–363. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2538-8>
33. Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., Dela Cruz, C. S., Wang, Y., Wu, C., Xiao, Y., Zhang, L., Han, L., Dang, S., Xu, Y., Yang, Q. W., Xu, S. Y., Zhu, H. D., Xu, Y. C., Jin, Q., Sharma, L., ... Wang, J. (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 778–785. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>
34. Padoan, A., Sciacovelli, L., Basso, D., Negrini, D., Zuin, S., Cosma, C., Faggian, D., Matricardi, P., & Plebani, M. (2020). IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 507, 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.026>
35. Huang, N., Pérez, P., Kato, T., Mikami, Y., Okuda, K., Gilmore, R. C., Conde, C. D., Gasmi, B., Stein, S., Beach, M., Pelayo, E., Maldonado, J. O., Lafont, B. A., Jang, S. I., Nasir, N., Padilla, R. J., Murrain, V. A., Maile, R., Lovell, W., Wallet, S. M., ... Byrd, K. M. (2021). SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nature medicine*, 27(5), 892–903. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01296-8>
36. Zervou, F. N., Louie, P., Stachel, A., Zacharioudakis, I. M., Ortiz-Mendez, Y., Thomas, K., & Aguero-Rosenfeld, M. E. (2021). SARS-CoV-2 antibodies: IgA correlates with severity of disease in early COVID-19 infection. *Journal of medical virology*, 93(9), 5409–5415. <https://doi.org/10.1002/jmv.27058>
37. Coperchini, F., Chiovato, L., & Rotondi, M. (2021). Interleukin-6, CXCL10 and Infiltrating Macrophages in COVID-19-Related Cytokine Storm: Not One for All

- But All for One!. *Frontiers in immunology*, 12, 668507.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.668507>
38. Santa Cruz, A., Mendes-Frias, A., Oliveira, A. I., Dias, L., Matos, A. R., Carvalho, A., Capela, C., Pedrosa, J., Castro, A. G., & Silvestre, R. (2021). Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Frontiers in immunology*, 12, 613422.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.613422>
39. LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
40. Küppers R. (2021). The life of B cells according to JEM. *The Journal of experimental medicine*, 218(5), e20210647.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20210647>
41. Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 131(4), 959–971.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
42. Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 13(2), 118–132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
43. Harrer, C., Otto, F., Radlberger, R. F., Moser, T., Pilz, G., Wipfler, P., & Harrer, A. (2022). The CXCL13/CXCR5 Immune Axis in Health and Disease-Implications for Intrathecal B Cell Activities in Neuroinflammation. *Cells*, 11(17), 2649.  
<https://doi.org/10.3390/cells11172649>
44. Mak, T. W., Saunders, M. E., & Jett, B. D. (2013). *Primer to the immune response*. Newnes.
45. Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y., & Cyster, J. G. (2009). EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*, 460(7259), 1122–1126. <https://doi.org/10.1038/nature08226>
46. Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., & Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by

- CXCR4 and CXCR5. *Nature immunology*, 5(9), 943–952.  
<https://doi.org/10.1038/ni1100>
47. Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*, 45(3), 471–482.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>
48. Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., & Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature*, 517(7533), 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature13803>
49. Jenks, S. A., Cashman, K. S., Woodruff, M. C., Lee, F. E., & Sanz, I. (2019). Extrafollicular responses in humans and SLE. *Immunological reviews*, 288(1), 136–148. <https://doi.org/10.1111/imr.12741>
50. Mond, J. J., Lees, A., & Snapper, C. M. (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annual review of immunology*, 13, 655–692.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.003255>
51. Coutinho, A., & Möller, G. (1975). Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Advances in immunology*, 21, 113–236. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60220-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60220-5)
52. García de Vinuesa, C., O'Leary, P., Sze, D. M., Toellner, K. M., & MacLennan, I. C. (1999). T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *European journal of immunology*, 29(4), 1314–1323. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199904\)29:04<1314::AID-IMMU1314>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1314::AID-IMMU1314>3.0.CO;2-4)
53. Obukhanych, T. V., & Nussenzweig, M. C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *The Journal of experimental medicine*, 203(2), 305–310. <https://doi.org/10.1084/jem.20052036>
54. Lee, S. K., Rigby, R. J., Zotos, D., Tsai, L. M., Kawamoto, S., Marshall, J. L., Ramiscal, R. R., Chan, T. D., Gatto, D., Brink, R., Yu, D., Fagarasan, S., Tarlinton, D. M., Cunningham, A. F., & Vinuesa, C. G. (2011). B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *The Journal of experimental medicine*, 208(7), 1377–1388.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20102065>

55. Cunningham, A. F., Gaspal, F., Serre, K., Mohr, E., Henderson, I. R., Scott-Tucker, A., Kenny, S. M., Khan, M., Toellner, K. M., Lane, P. J., & MacLennan, I. C. (2007). Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(10), 6200–6207. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6200>
56. 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., Eun-Hyung Lee, F., ... Sanz, I. (2020). Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, *52*(1), 203. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.005>
57. Finke, D., Baribaud, F., Diggelmann, H., & Acha-Orbea, H. (2001). Extrafollicular plasmablast B cells play a key role in carrying retroviral infection to peripheral organs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*(10), 6266–6275. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6266>
58. Mauri, C., & Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *International immunology*, *27*(10), 479–486. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv038>
59. Barr, T. A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R. A., Anderton, S. M., Bar-Or, A., Fillatreau, S., & Gray, D. (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of experimental medicine*, *209*(5), 1001–1010.
60. Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R. A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V. D., Jaimes, Y., Daridon, C., Li, R., Jouneau, L., Boudinot, P., Wilantri, S., Sakwa, I., Miyazaki, Y., Leech, M. D., McPherson, R. C., Wirtz, S., Neurath, M., ... Fillatreau, S. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, *507*(7492), 366–370. <https://doi.org/10.1038/nature12979>

61. Li, R., Rezk, A., Healy, L. M., Muirhead, G., Prat, A., Gommerman, J. L., Bar-Or, A., & MSSRF Canadian B cells in MS Team (2016). Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*, 6, 626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00626>
62. Matsushita T. (2019). Regulatory and effector B cells: Friends or foes?. *Journal of dermatological science*, 93(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.11.008>
63. Lino, A. C., Dörner, T., Bar-Or, A., & Fillatreau, S. (2016). Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunological reviews*, 269(1), 130–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12374>
64. Shen, P., & Fillatreau, S. (2015). Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nature reviews. Immunology*, 15(7), 441–451. <https://doi.org/10.1038/nri3857>
65. Maerz, J. K., Trostel, C., Lange, A., Parusel, R., Michaelis, L., Schäfer, A., Yao, H., Löw, H. C., & Frick, J. S. (2020). Bacterial Immunogenicity Is Critical for the Induction of Regulatory B Cells in Suppressing Inflammatory Immune Responses. *Frontiers in immunology*, 10, 3093. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03093>
66. Hagn, M., & Jahrsdörfer, B. (2012). Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. *Oncoimmunology*, 1(8), 1368–1375. <https://doi.org/10.4161/onci.22354>
67. Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P., & Bottomly, K. (1995). B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(8), 3734–3741.
68. Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M. S., Patarroyo, J. C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A. J., Hidalgo, J., Jenne, D. E., Wekerle, H., Sobel, R. A., Bernard, C. C., Shlomchik, M. J., & Zamvil, S. S. (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *The Journal of*

*experimental medicine*, 210(13), 2921–2937.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20130699>

69. O'Neill, S. K., Cao, Y., Hamel, K. M., Doodes, P. D., Hutas, G., & Finnegan, A. (2007). Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), 5109–5116. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5109>
70. Bar-Or, A., Oliveira, E. M., Anderson, D. E., Krieger, J. I., Duddy, M., O'Connor, K. C., & Hafler, D. A. (2001). Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(10), 5669–5677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5669>
71. Jiang, W., Lederman, M. M., Harding, C. V., Rodriguez, B., Mohner, R. J., & Sieg, S. F. (2007). TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *European journal of immunology*, 37(8), 2205–2213. <https://doi.org/10.1002/eji.200636984>
72. Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M. M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., Quinti, I., & Carsetti, R. (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(2), 800–808.
73. Keller, B., & Warnatz, K. (2023). T-bet<sup>high</sup>CD21<sup>low</sup> B cells: the need to unify our understanding of a distinct B cell population in health and disease. *Current opinion in immunology*, 82, 102300. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102300>
74. Courey-Ghaouzi, A. D., Kleberg, L., & Sundling, C. (2022). Alternative B Cell Differentiation During Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology*, 13, 908034. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.908034>
75. 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>
76. Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R. T., Gillis, J. Z., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2011). Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a

novel CD11c<sup>+</sup> B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*, 118(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>

77. Keller, B., Strohmeier, V., Harder, I., Unger, S., Payne, K. J., Andrieux, G., Boerries, M., Felixberger, P. T., Landry, J. J. M., Nieters, A., Rensing-Ehl, A., Salzer, U., Frede, N., Usadel, S., Elling, R., Speckmann, C., Hainmann, I., Ralph, E., Gilmour, K., Wentink, M. W. J., ... Warnatz, K. (2021). The expansion of human T-bet<sup>high</sup>CD21<sup>low</sup> B cells is T cell dependent. *Science immunology*, 6(64), eabh0891. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abh0891>
78. Friedmann, D., Unger, S., Keller, B., Rakhmanov, M., Goldacker, S., Zissel, G., Frye, B. C., Schupp, J. C., Prasse, A., & Warnatz, K. (2021). Bronchoalveolar Lavage Fluid Reflects a T<sub>H</sub>1-CD21<sup>low</sup> B-Cell Interaction in COVID-Related Interstitial Lung Disease. *Frontiers in immunology*, 11, 616832. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.616832>
79. Rao, D. A., Gurish, M. F., Marshall, J. L., Slowikowski, K., Fonseka, C. Y., Liu, Y., Donlin, L. T., Henderson, L. A., Wei, K., Mizoguchi, F., Teslovich, N. C., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S. M., Lee, Y. C., Todd, D. J., Bykerk, V. P., Goodman, S. M., Pernis, A. B., ... Brenner, M. B. (2017). Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*, 542(7639), 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature20810>
80. Yang, R., Avery, D. T., Jackson, K. J. L., Ogishi, M., Benhsaien, I., Du, L., Ye, X., Han, J., Rosain, J., Peel, J. N., Alyanakian, M. A., Neven, B., Winter, S., Puel, A., Boisson, B., Payne, K. J., Wong, M., Russell, A. J., Mizoguchi, Y., Okada, S., ... Tangye, S. G. (2022). Human T-bet governs the generation of a distinct subset of CD11c<sup>high</sup>CD21<sup>low</sup> B cells. *Science immunology*, 7(73), eabq3277. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq3277>
81. Rakhmanov, M., Keller, B., Gutenberger, S., Foerster, C., Hoenig, M., Driessen, G., van der Burg, M., van Dongen, J. J., Wiech, E., Visentini, M., Quinti, I., Prasse, A., Voelxen, N., Salzer, U., Goldacker, S., Fisch, P., Eibel, H., Schwarz, K., Peter, H. H., & Warnatz, K. (2009). Circulating CD21<sup>low</sup> B cells in common variable

- immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13451–13456. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901984106>.
82. Liu, W., Tao, Z. W., Wang, L., Yuan, M. L., Liu, K., Zhou, L., Wei, S., Deng, Y., Liu, J., Liu, H. G., Yang, M., & Hu, Y. (2020). Analysis of factors associated with disease outcomes in hospitalized patients with 2019 novel coronavirus disease. *Chinese medical journal*, 133(9), 1032–1038. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000775>
83. Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T. A., Merklings, S. H., Treluyer, J. M., ... Terrier, B. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
84. Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T. B. R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M. K., Mao, T., Oh, J. E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A. L., Vogels, C. B. F., Earnest, R., ... Iwasaki, A. (2020). Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, 584(7821), 463–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>
85. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
86. Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)

87. Weiskopf, D., Schmitz, K. S., Raadsen, M. P., Grifoni, A., Okba, N. M. A., Endeman, H., van den Akker, J. P. C., Molenkamp, R., Koopmans, M. P. G., van Gorp, E. C. M., Haagmans, B. L., de Swart, R. L., Sette, A., & de Vries, R. D. (2020). Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Science immunology*, *5*(48), eabd2071. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
88. Jesenak, M., Brndiarova, M., Urbancikova, I., Rennerova, Z., Vojtkova, J., Bobcakova, A., Ostro, R., & Banovcin, P. (2020). Immune Parameters and COVID-19 Infection - Associations With Clinical Severity and Disease Prognosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 364. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00364>
89. Li, S., Ma, F., Hao, H., Wang, D., Gao, Y., Zhou, J., Li, F., Lin, H. C., Xiao, X., & Zeng, Q. (2018). Marked elevation of circulating CD19<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup> transitional B cells give protection against neonatal sepsis. *Pediatrics and neonatology*, *59*(3), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.10.005>
90. Piper, C. J. M., Wilkinson, M. G. L., Deakin, C. T., Otto, G. W., Dowle, S., Duurland, C. L., Adams, S., Marasco, E., Rosser, E. C., Radziszewska, A., Carsetti, R., Ioannou, Y., Beales, P. L., Kelberman, D., Isenberg, D. A., Mauri, C., Nistala, K., & Wedderburn, L. R. (2018). CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B Cells Are Expanded in Juvenile Dermatomyositis and Exhibit a Pro-Inflammatory Phenotype After Activation Through Toll-Like Receptor 7 and Interferon- $\alpha$ . *Frontiers in immunology*, *9*, 1372. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01372>
91. Sambleben, C., Knudsen, A. D., Hartling, H. J., Nielsen, C. H., & Nielsen, S. D. (2018). Increased proportions of B cells with spontaneous production of interleukin-10 in HIV-infected individuals are normalized during combination antiretroviral therapy: a longitudinal study. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, *126*(2), 143–151. <https://doi.org/10.1111/apm.12795>
92. Wang, T., Marken, J., Chen, J., Tran, V. B., Li, Q. Z., Li, M., Cerosaletti, K., Elkon, K. B., Zeng, X., & Giltiay, N. V. (2019). High TLR7 Expression Drives the Expansion of CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Transitional B Cells and Autoantibody

- Production in SLE Patients. *Frontiers in immunology*, 10, 1243. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01243>
93. Giltiay, N. V., Giordano, D., & Clark, E. A. (2019). The Plasticity of Newly Formed B Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 203(12), 3095–3104. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900928>
94. Zhou, Y., Zhang, Y., Han, J., Yang, M., Zhu, J., & Jin, T. (2020). Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *Journal of translational medicine*, 18(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02289-w>
95. Dai, W., Zhong, A., Qiao, Q., Wu, J., Li, W., Wu, Q., Zhou, H., Qin, S., Jiang, W., Zhang, J., & Xia, X. (2022). Characteristics of lymphocyte subset alterations in COVID-19 patients with different levels of disease severity. *Virology journal*, 19(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01926-8>
96. Kaneko, N., Kuo, H. H., Boucau, J., Farmer, J. R., Allard-Chamard, H., Mahajan, V. S., Piechocka-Trocha, A., Lefteri, K., Osborn, M., Bals, J., Bartsch, Y. C., Bonheur, N., Caradonna, T. M., Chevalier, J., Chowdhury, F., Diefenbach, T. J., Einkauf, K., Fallon, J., Feldman, J., Finn, K. K., ... Massachusetts Consortium on Pathogen Readiness Specimen Working Group (2020). Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell*, 183(1), 143–157.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.025>
97. Kotagiri, P., Mescia, F., Hanson, A. L., Turner, L., Bergamaschi, L., Peñalver, A., Richoz, N., Moore, S. D., Ortmann, B. M., Dunmore, B. J., Morgan, M. D., Tuong, Z. K., Cambridge Institute of Therapeutic Immunology and Infectious Disease-National Institute of Health Research (CITIID-NIHR) COVID BioResource Collaboration, Göttgens, B., Toshner, M., Hess, C., Maxwell, P. H., Clatworthy, M. R., Nathan, J. A., Bradley, J. R., ... Smith, K. G. C. (2022). The impact of hypoxia on B cells in COVID-19. *EBioMedicine*, 77, 103878. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103878>
98. Wang, F., Nie, J., Wang, H., Zhao, Q., Xiong, Y., Deng, L., Song, S., Ma, Z., Mo, P., & Zhang, Y. (2020). Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset

- Alteration in COVID-19 Pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, 221(11), 1762–1769. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa150>
99. Varnaité, R., García, M., Glans, H., Maleki, K. T., Sandberg, J. T., Tynell, J., Christ, W., Lagerqvist, N., Asgeirsson, H., Ljunggren, H. G., Ahlén, G., Frelin, L., Sällberg, M., Blom, K., Klingström, J., & Gredmark-Russ, S. (2020). Expansion of SARS-CoV-2-Specific Antibody-Secreting Cells and Generation of Neutralizing Antibodies in Hospitalized COVID-19 Patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 205(9), 2437–2446. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000717>
100. Garcia-Bates, T. M., Cordeiro, M. T., Nascimento, E. J., Smith, A. P., Soares de Melo, K. M., McBurney, S. P., Evans, J. D., Marques, E. T., Jr, & Barratt-Boyes, S. M. (2013). Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(1), 80–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103350>
101. Kuzmina, N. A., Younan, P., Gilchuk, P., Santos, R. I., Flyak, A. I., Ilinykh, P. A., Huang, K., Lubaki, N. M., Ramanathan, P., Crowe, J. E., Jr, & Bukreyev, A. (2018). Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors. *Cell reports*, 24(7), 1802–1815.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.035>
102. Oliviero, B., Varchetta, S., Mele, D., Mantovani, S., Cerino, A., Perotti, C. G., Ludovisi, S., & Mondelli, M. U. (2020). Expansion of atypical memory B cells is a prominent feature of COVID-19. *Cellular & molecular immunology*, 17(10), 1101–1103. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00542-2>
103. De Biasi, S., Lo Tartaro, D., Meschiari, M., Gibellini, L., Bellinazzi, C., Borella, R., Fidanza, L., Mattioli, M., Paolini, A., Gozzi, L., Jaacoub, D., Faltoni, M., Volpi, S., Milić, J., Sita, M., Sarti, M., Pucillo, C., Girardis, M., Guaraldi, G., Mussini, C., ... Cossarizza, A. (2020). Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. *European journal of immunology*, 50(9), 1283–1294. <https://doi.org/10.1002/eji.202048838>

104. Mathew, D., Giles, J. R., Baxter, A. E., Oldridge, D. A., Greenplate, A. R., Wu, J. E., Alanio, C., Kuri-Cervantes, L., Pampena, M. B., D'Andrea, K., Manne, S., Chen, Z., Huang, Y. J., Reilly, J. P., Weisman, A. R., Ittner, C. A. G., Kuthuru, O., Dougherty, J., Nzingha, K., Han, N., ... Wherry, E. J. (2020). Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6508), eabc8511. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
105. Song, G., He, W. T., Callaghan, S., Anzanello, F., Huang, D., Ricketts, J., Torres, J. L., Beutler, N., Peng, L., Vargas, S., Cassell, J., Parren, M., Yang, L., Ignacio, C., Smith, D. M., Voss, J. E., Nemazee, D., Ward, A. B., Rogers, T., Burton, D. R., ... Andrabi, R. (2021). Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection. *Nature communications*, 12(1), 2938. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23074-3>
106. Buffa, S., Pellicanò, M., Bulati, M., Martorana, A., Goldeck, D., Caruso, C., Pawelec, G., & Colonna-Romano, G. (2013). A novel B cell population revealed by a CD38/CD24 gating strategy: CD38(-)CD24 (-) B cells in centenarian offspring and elderly people. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(5), 2009–2024. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9488-5>
107. Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J. L., Naiman, B., Gross, P. S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., Holoweckyj, N., Liu, H., Autoimmunity Molecular Medicine Team, Manna, Z., Goldbach-Mansky, R., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Streicher, K., Cancro, M. P., ... Ettinger, R. (2018). IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c<sup>hi</sup>T-bet<sup>+</sup> B cells in SLE. *Nature communications*, 9(1), 1758. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>
108. Zumaquero, E., Stone, S. L., Scharer, C. D., Jenks, S. A., Nellore, A., Mousseau, B., Rosal-Vela, A., Botta, D., Bradley, J. E., Wojciechowski, W., Ptacek, T., Danila, M. I., Edberg, J. C., Bridges, S. L., Jr, Kimberly, R. P., Chatham, W. W., Schoeb, T. R., Rosenberg, A. F., Boss, J. M., Sanz, I., ... Lund, F. E. (2019). IFN $\gamma$  induces epigenetic programming of human T-bet<sup>hi</sup> B cells and

- promotes TLR7/8 and IL-21 induced differentiation. *eLife*, 8, e41641. <https://doi.org/10.7554/eLife.41641>
109. Burrows, N., & Maxwell, P. H. (2017). Hypoxia and B cells. *Experimental cell research*, 356(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.019>
110. Aravena, O., Ferrier, A., Menon, M., Mauri, C., Aguillón, J. C., Soto, L., & Catalán, D. (2017). TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1213-9>
111. Kojima, H., Kobayashi, A., Sakurai, D., Kanno, Y., Hase, H., Takahashi, R., Totsuka, Y., Semenza, G. L., Sitkovsky, M. V., & Kobata, T. (2010). Differentiation stage-specific requirement in hypoxia-inducible factor-1alpha-regulated glycolytic pathway during murine B cell development in bone marrow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(1), 154–163. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800167>
112. Juno, J. A., Tan, H. X., Lee, W. S., Reynaldi, A., Kelly, H. G., Wragg, K., Esterbauer, R., Kent, H. E., Batten, C. J., Mordant, F. L., Gherardin, N. A., Pymm, P., Dietrich, M. H., Scott, N. E., Tham, W. H., Godfrey, D. I., Subbarao, K., Davenport, M. P., Kent, S. J., & Wheatley, A. K. (2020). Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nature medicine*, 26(9), 1428–1434. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0995-0>
113. Huang, I., Pranata, R., Lim, M. A., Oehadian, A., & Alisjahbana, B. (2020). C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: a meta-analysis. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 14, 1753466620937175. <https://doi.org/10.1177/1753466620937175>
114. Pan, F., Yang, L., Li, Y., Liang, B., Li, L., Ye, T., Li, L., Liu, D., Gui, S., Hu, Y., & Zheng, C. (2020). Factors associated with death outcome in patients with severe coronavirus disease-19 (COVID-19): a case-control study. *International journal of medical sciences*, 17(9), 1281–1292. <https://doi.org/10.7150/ijms.46614>
115. Ye, W., Chen, G., Li, X., Lan, X., Ji, C., Hou, M., Zhang, D., Zeng, G., Wang, Y., Xu, C., Lu, W., Cui, R., Cai, Y., Huang, H., & Yang, L. (2020). Dynamic

- changes of D-dimer and neutrophil-lymphocyte count ratio as prognostic biomarkers in COVID-19. *Respiratory research*, 21(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01428-7>
116. 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., Sharma, M., ... 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>
117. Johnson, J. L., Rosenthal, R. L., Knox, J. J., Myles, A., Naradikian, M. S., Madej, J., Kostiv, M., Rosenfeld, A. M., Meng, W., Christensen, S. R., Hensley, S. E., Yewdell, J., Canaday, D. H., Zhu, J., McDermott, A. B., Dori, Y., Itkin, M., Wherry, E. J., Pardi, N., Weissman, D., ... Cancro, M. P. (2020). The Transcription Factor T-bet Resolves Memory B Cell Subsets with Distinct Tissue Distributions and Antibody Specificities in Mice and Humans. *Immunity*, 52(5), 842–855.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.020>
118. Barnett, B. E., Staupé, R. P., Odorizzi, P. M., Palko, O., Tomov, V. T., Mahan, A. E., Gunn, B., Chen, D., Paley, M. A., Alter, G., Reiner, S. L., Lauer, G. M., Teijaro, J. R., & Wherry, E. J. (2016). Cutting Edge: B Cell-Intrinsic T-bet Expression Is Required To Control Chronic Viral Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 197(4), 1017–1022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500368>
119. Knox, J. J., Buggert, M., Kardava, L., Seaton, K. E., Eller, M. A., Canaday, D. H., Robb, M. L., Ostrowski, M. A., Deeks, S. G., Slifka, M. K., Tomaras, G. D., Moir, S., Moody, M. A., & Betts, M. R. (2017). T-bet+ B cells are induced by human viral infections and dominate the HIV gp140 response. *JCI insight*, 2(8), e92943. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92943>
120. Johnson, J. L., Rosenthal, R. L., Knox, J. J., Myles, A., Naradikian, M. S., Madej, J., Kostiv, M., Rosenfeld, A. M., Meng, W., Christensen, S. R., Hensley, S. E., Yewdell, J., Canaday, D. H., Zhu, J., McDermott, A. B., Dori, Y., Itkin, M.,

- Wherry, E. J., Pardi, N., Weissman, D., ... Cancro, M. P. (2020). The Transcription Factor T-bet Resolves Memory B Cell Subsets with Distinct Tissue Distributions and Antibody Specificities in Mice and Humans. *Immunity*, 52(5), 842–855.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.020>
121. Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., Hom, J., & Lee, F. E. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in immunology*, 10, 2458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>
122. Sutton, H. J., Aye, R., Idris, A. H., Vistein, R., Nduati, E., Kai, O., Mwacharo, J., Li, X., Gao, X., Andrews, T. D., Koutsakos, M., Nguyen, T. H. O., Nekrasov, M., Milburn, P., Eltahla, A., Berry, A. A., Kc, N., Chakravarty, S., Sim, B. K. L., Wheatley, A. K., ... Cockburn, I. A. (2021). Atypical B cells are part of an alternative lineage of B cells that participates in responses to vaccination and infection in humans. *Cell reports*, 34(6), 108684. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108684>
123. 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>
124. Chang, L. Y., Li, Y., & Kaplan, D. E. (2017). Hepatitis C viraemia reversibly maintains subset of antigen-specific T-bet+ tissue-like memory B cells. *Journal of viral hepatitis*, 24(5), 389–396. <https://doi.org/10.1111/jvh.12659>
125. Akira S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), 59–63. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(99\)00051-5](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00051-5)
126. Naradikian, M. S., Hao, Y., & Cancro, M. P. (2016). Age-associated B cells: key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. *Immunological reviews*, 269(1), 118–129. <https://doi.org/10.1111/imr.12380>

127. Ray, A., Khalil, M. I., Pulakanti, K. L., Burns, R. T., Gurski, C. J., Basu, S., Wang, D., Rao, S., & Dittel, B. N. (2019). Mature IgD<sup>low/-</sup> B cells maintain tolerance by promoting regulatory T cell homeostasis. *Nature communications*, 10(1), 190. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08122-9>