

**Cinvestav** CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Evaluación funcional de células B en respuesta a IL-21  
en pacientes con IDCV”.**

**TESIS**

Que presenta:

**M. en C. Diana Olguín Calderón**

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE:

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Leopoldo Santos Argumedo**

**Dra. Laura Berrón Ruiz**

Ciudad de México.

Febrero, 2023.

## DIRECTOR

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador titular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## CODIRECTORA

Dra. Laura Berrón Ruiz

Investigadora en ciencias en Instituto Nacional de Pediatría

## ASESORES

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Jefe del Dpto. de Biomedicina Molecular e Investigador Titular en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda

Investigador titular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Investigador titular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. Mario E. Cruz Muñoz

Profesor investigador titular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo otorgado (CB # 256471) y la beca 725047 para realizar el doctorado.

Al laboratorio 01 del Dr. Leopoldo Santos Argumedo en el departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, a los integrantes de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia.

A mis padres Mario y Clara, que me apoyaron incondicionalmente durante el proceso a pesar de la distancia.

A la Dra. Laura Berrón y el Dr. Leopoldo Santos, por permitirme formar parte de sus grupos de investigación y guiarme en este camino hacia la obtención de grado que, aunque culmina, seguiré aprendiendo de ellos.

A mis compañeros de laboratorio Vania López, Iván Antonio, y en especial a Mizael Flores, Carlos Miguel, David Cruz y Erick Sánchez, que me acompañaron durante los momentos más difíciles durante el confinamiento por COVID-19 y se quedaron como amigos.

A Lenin Estudillo y Jesús Guzmán quienes además de ser pilares en la vida del laboratorio, me brindaron su amistad y su consejo en el momento correcto..

A los estudiantes de verano 2022 por regresarme la motivación de seguir adelante y mostrarme lo valiosa que es la enseñanza.

Al personal médico que nos brindó su conocimiento y atención, y a los pacientes por compartirme su historia y permitieron la realización de este trabajo.

<b>Índice</b>	
<b>Lista de tablas.</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras.</b>	<b>9</b>
<b>Resumen</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Inmunodeficiencia común variable.</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Causas monogénicas en la etiología de la enfermedad.</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Clasificación de pacientes con IDCV.</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Poblaciones celulares en IDCV</b>	<b>15</b>
<b>1.5. Subpoblaciones de linfocitos B.</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Subpoblaciones de linfocitos T.</b>	<b>18</b>
<b>1.7. Interleucinas involucradas en la diferenciación y cambio de isotipo de células B.</b>	<b>18</b>
<b>1.8. Interleucina 21 y su receptor.</b>	<b>19</b>
<b>1.9. Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3).</b>	<b>20</b>
<b>1.10. Mutaciones asociadas a la ganancia de función de STAT3.</b>	<b>21</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>23</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>23</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Objetivos Específicos:</b>	<b>23</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Pacientes y donadores sanos.</b>	<b>23</b>
<b>5.2. Obtención de PBMC's</b>	<b>24</b>
<b>5.3. Determinación de poblaciones celulares por citometría de flujo.</b>	<b>24</b>
<b>5.4. Determinación de receptor de IL-21 por citometría de flujo.</b>	<b>25</b>
<b>5.5. ELISA para cuantificar la producción de IL-21.</b>	<b>25</b>
<b>5.6. Inmortalización de células B</b>	<b>26</b>
<b>5.7. Determinación de pSTAT3 por citometría de flujo.</b>	<b>26</b>
<b>5.8. Determinación de pSTAT3 por Western Blot.</b>	<b>26</b>
<b>5.9. Extracción de DNA de sangre periférica.</b>	<b>27</b>
<b>5.10. Amplificación de gen STAT3 por PCR punto final.</b>	<b>28</b>
<b>5.11. Preparación de producto de PCR para secuenciación.</b>	<b>30</b>
<b>5.12. Análisis estadístico</b>	<b>31</b>
<b>6. Diagrama de flujo</b>	<b>32</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>33</b>

7.1. Descripción de la población de estudio.....	33
7.2. Comparación de poblaciones linfocitarias en sangre periférica de pacientes IDCV respecto a DS. ....	33
7.2.1. Subpoblaciones de células T. ....	34
3.1.1. Subpoblaciones de células B .....	35
3.2. Distribución de linfocitos T reguladoras en pacientes con IDCV clasificados por grupos respecto a sujetos sanos.....	43
3.3. Distribución de linfocitos T Foliculares en pacientes con IDCV clasificados por grupos respecto a sujetos sanos.....	44
3.4. Secreción de IL-21 posterior a la estimulación con PMA/IONOMICINA de PBMC's de pacientes con IDCV.....	45
3.5. Expresión del receptor de IL-21 en subpoblaciones de células B de pacientes con IDCV. ....	46
3.6. Fosforilación de STAT3 basal, 15 min, 60 min posterior a la estimulación con IL-21 en los subgrupos de pacientes con IDCV.....	48
3.6.1. Estimulación en PBMC's. ....	48
3.6.2. Estimulación en células inmortalizadas con EBV .....	51
4. Discusión.....	55
5. Conclusión. ....	63
6. Perspectivas. ....	64
7. Referencias. ....	65
9. Anexos.....	72

**Lista de tablas.**

<b>TABLA 1. CONTRIBUCIÓN DE CITOCINAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LA CÉLULA B</b> <b>IN-VITRO. ....</b>	<b>19</b>
<b>TABLA 2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN E INCLUSIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....</b>	<b>24</b>
<b>TABLA 3. DESCRIPCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DE ACUERDO CON SUS</b> <b>MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR. ....</b>	<b>25</b>
<b>TABLA 4. MEZCLAS MAESTRAS DE PCR .....</b>	<b>28</b>
<b>TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS “PRIMERS” UTILIZADOS PARA LA</b> <b>AMPLIFICACIÓN DE STAT3.....</b>	<b>29</b>
<b>TABLA 6. PREPARACIÓN DE MEZCLA MAESTRA PARA PURIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>TABLA 7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON</b> <b>IDCV DE ACUERDO CON SU FRECUENCIA DE CÉLULAS B CON CAMBIO DE ISOTIPO.</b> <b>.....</b>	<b>34</b>
<b>TABLA 8. DATOS CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS EN EL TOTAL DE PACIENTES CON</b> <b>IDCV.....</b>	<b>36</b>
<b>TABLA 9. COMPOSICIÓN POR EDAD Y GENERO DE SUJETOS SANOS. ....</b>	<b>36</b>
<b>TABLA 10. FRECUENCIAS DE LINFOCITOS T EN EL TOTAL DE DONADORES SANOS.....</b>	<b>40</b>
<b>TABLA 11. FRECUENCIAS DE LINFOCITOS T EN EL TOTAL DE PACIENTES IDC.V. ....</b>	<b>40</b>
<b>TABLA 12. FRECUENCIAS Y NÚMEROS ABSOLUTOS DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B</b> <b>DE DONADORES SANOS. ....</b>	<b>41</b>
<b>TABLA 13. FRECUENCIAS Y NÚMEROS ABSOLUTOS DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B</b> <b>DE PACIENTES CON IDC.V.....</b>	<b>42</b>
<b>TABLA 14. FRECUENCIAS DE CÉLULAS REGULADORAS EN LOS DIFERENTES GRUPOS</b> <b>ANALIZADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>TABLA 15. FRECUENCIAS DE CÉLULAS FOLICULARES EN LOS DIFERENTES GRUPOS</b> <b>ANALIZADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>TABLA 16. NIVELES DE IL-21 EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE PBMC'S POSTERIOR</b> <b>AL ESTIMULO CON PMA/IONOMICINA.....</b>	<b>46</b>
<b>TABLA 17. VALORES DE IFM DEL RECEPTOR DE IL-21 EN SUBPOBLACIONES DE</b> <b>CÉLULAS B EN LOS GRUPOS ANALIZADOS. ....</b>	<b>48</b>
<b>TABLA 18. LOG IFM DE PSTAT3 EN CÉLULAS B TOTALES POSTERIOR AL ESTIMULO</b> <b>DE PBMC'S CON IL-21EN LOS GRUPOS ANALIZADOS. ....</b>	<b>50</b>
<b>TABLA 19. LOG IFM DE PSTAT3 EN CÉLULAS B NAÏVE POSTERIOR AL ESTIMULO DE</b> <b>PBMC'S CON IL-21 EN LOS GRUPOS ANALIZADOS.....</b>	<b>50</b>

<b>TABLA 20. LOG IFM DE pSTAT3 EN CÉLULAS B DE MEMORIA POSTERIOR AL ESTIMULO DE PBMC'S CON IL-21 EN LOS GRUPOS ANALIZADOS. ....</b>	<b>51</b>
<b>TABLA 21. IFM DE pSTAT3 EN CÉLULAS INMORTALIZADAS CON EBV A PARTIR DE PBMC'S POSTERIOR AL ESTIMULO CON IL-21 EN LOS GRUPOS ANALIZADOS. ....</b>	<b>52</b>
<b>TABLA 22. IFM DE pSTAT3 EN CÉLULAS INMORTALIZADAS CON EBV A PARTIR DE PBMC'S POSTERIOR AL ESTIMULO CON IL-6 EN LOS GRUPOS ANALIZADOS. ....</b>	<b>53</b>
<b>TABLA 23. DENSIDAD DE INTENSIDAD DE pSTAT3/STAT3 EN CÉLULAS INMORTALIZADAS CON EBV A PARTIR DE, PBMC'S POSTERIOR AL ESTIMULO CON IL-21 EN LOS GRUPOS ANALIZADOS. ....</b>	<b>54</b>

## Lista de figuras.

<b>FIGURA 1. PARTICIPACIÓN ESTIMADA DE CADA MUTACIÓN REPORTADA DENTRO DE IDCV.....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURA 2. CLASIFICACIÓN POR POBLACIONES DE CÉLULAS B PARA LA AGRUPACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS ASOCIADAS A IDCV.....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 3. DESARROLLO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS Y B DE MEMORIA EN CENTROS GERMINALES. ....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS MUTACIONES REPORTADAS DE LA PROTEÍNA STAT3 CON GANANCIA DE FUNCIÓN. ....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 5. CONDICIONES DE PCR PARA LOS DIFERENTES EXONES DE STAT3.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS. ....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 7. DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS. ....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE CÉLULAS T REGULADORAS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS. ....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 9. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE CÉLULAS T FOLICULARES (THF) EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS. ....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURA 10. CONCENTRACIÓN DE IL-21 EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE PBMC'S DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS ESTIMULADOS Y NO ESTIMULADOS CON PMA/IONOMICINA .....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 11. . IFM DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE IL-21 EN SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B DE PBMC'S DE PACIENTES IDCV DEL GRUPO I Y II COMPARADA CON DONADORES SANOS. ....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 12. LOG IFM DE LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 POSTERIOR A LA ESTIMULACIÓN CON IL-21 EN SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B DE PBMC'S DE PACIENTES IDCV DEL GRUPO I Y II COMPARADA CON DONADORES SANOS.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 13. IFM DE LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 POSTERIOR A LA ESTIMULACIÓN CON IL-21 E IL-6 EN CÉLULAS INMORTALIZADAS CON EBV A PARTIR DE PBMC'S DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS Y PACIENTES STAT3 GOF. ....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 14. RELACIÓN DE LA DENSIDAD EN LA INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE FOSFORILACIÓN DE STAT3 RESPECTO A STAT3 TOTAL POSTERIOR A LA ESTIMULACIÓN CON IL-21 EN CÉLULAS INMORTALIZADAS CON EBV A PARTIR DE PBMC'S DE PACIENTES IDCV COMPARADA CON DONADORES SANOS.....</b>	<b>53</b>

## **Resumen**

**Antecedentes.** La inmunodeficiencia común variable (IDCV) se caracteriza por la disminución de los niveles de IgG, en el menos 2 SD por debajo del valor de referencia ajustado con la edad, en conjunto con un importante decrecimiento de los niveles de IgA o IgM. La fenotipificación de las subpoblaciones de células B circulantes en los pacientes IDCV provee perfiles asociados al riesgo de presentar esplenomegalia, citopenia autoinmune y enfermedad granulomatosa, particularmente en aquellos pacientes con una reducción de células B de memoria con cambio de isotipo.

**Métodos.** Se reclutaron 24 pacientes con IDCV y 20 donadores sanos. Fueron aisladas las PBMC's en donde se evaluaron los linfocitos totales, las subpoblaciones de células B y T, así como el receptor de IL-21(IL-21R). Además, estas células fueron cultivadas en medio RPMI conteniendo 100 ng de PMA + 1µg/ml Ionomicina para evaluar la producción de IL-21 por ELISA. La fosforilación de STAT3 (Y705) posterior a la estimulación por 15 min y 60 min con IL-21 recombinante, se determinó en células B naïve y de memoria.

**Resultados.** Los pacientes con una reducción de células B de memoria con cambio de isotipo mostraron una mayor frecuencia en células T foliculares circulantes (cThf) ( $p=0.0225$ ) y ligeramente menores porcentajes de células T reguladoras (Treg) ( $p=0.0295$ ) comparados con los donadores sanos. También se observó en estos pacientes una similitud en la expresión de IL-21R en células B de memoria respecto a los donadores sanos ( $p=0.1821$ ). Los pacientes con una frecuencia normal de células de memoria con cambio de isotipo tuvieron una mayor expresión de IL-21R en células de memoria, comparada con las células de donadores sanos ( $p=0.0077$ ). La estimulación de PBMC's con PMA+IONOMICINA demostró una producción de IL-21 muy parecida a las muestras de donadores sanos en los pacientes con IDCV ( $p=0.6550$ ). Esta cohorte de pacientes mostró un incremento en la fosforilación de STAT3 en células B de memoria a los 60 min post estimulación con IL-21 comparada con los donadores sanos.

**Conclusión.** Los pacientes con IDCV muestran defectos en la expresión del receptor IL-21R y en la señalización activada por IL-21 en células B.

## **Abstract**

**Background.** Common Variable Immunodeficiency (CVID) is characterized by the reduction of IgG levels, in at least 2 SD below age-adjusted reference range, along with an important decrease of IgA or IgM levels. Phenotyping of circulating B cell subsets provide profiles that were associated with a higher risk of splenomegaly, autoimmune cytopenia and granulomatous disease, particularly in those with reduced switched memory B cells.

**Methods.** 24 CVID patients and 20 controls subjects were included in the study. PBMC's were isolated and lymphocytes, B and T cell subsets and IL-21 Receptor in B Cell subpopulations were evaluated. Also were cultured 24 hrs in RPMI contained 100ng PMA + 1ug/ml Ionomycin to assessed to IL-21 production by ELISA. pStat3 (Y705) were determined in B naïve and memory cells upon IL-21 stimulation at 15 and 60 min.

**Results.** Consistent with reduced switched memory, patients show a higher frequency in cThf ( $p=0.0225$ ) and lightly inferior percentages of Treg ( $p=0.0295$ ) compared to HD. Also, IL-21R MFI in memory B cells are close to HD ( $p=0.1821$ ). Patients with normal frequencies of switched memory cells have greater expression of IL-21R in relation to HD ( $p=0.0077$ ). Stimulation of PBMC's with PMA-Ionomycin, reveal an alike IL-21 production in total CVID and HD samples ( $p=0.655$ ). This patient cohort shows an increase of pSTAT3 in memory B cells at 60 min from CVID patients compared to HD ( $p=0.0127$ ).

**Conclusion.** CVID patients shows defects in IL-21R expression and an altered signaling pathway activated by IL-21 in B cells.

## **1. Introducción.**

### **1.1. Inmunodeficiencia común variable**

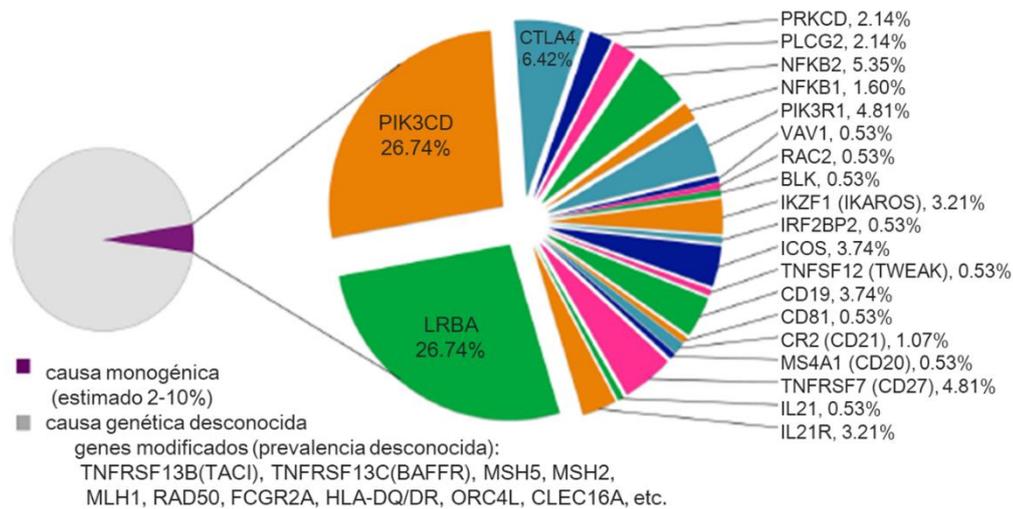
Las inmunodeficiencias primarias (IDP's) son grupo heterogéneo de enfermedades ocasionadas por alteraciones genéticas en el sistema inmune. Estas anormalidades se caracterizan por promover la susceptibilidad a infecciones, generalmente acompañadas de autoinmunidad, linfoproliferación, atopia, procesos granulomatosos y cáncer<sup>1,2</sup>. La prevalencia de las IDP's depende del tipo de inmunodeficiencia. Dentro de las más comunes se encuentra la inmunodeficiencia común variable (IDCV), afectando a 1 en 25,000-50,000 individuos en población caucásica y a nivel mundial representa más del 12% de todos los pacientes diagnosticados con IDP's<sup>2</sup>. La IDCV es diagnosticada entre los 20 y 40 años o incluso después de los 60 años. Pese a los esfuerzos por tener una detección oportuna, el diagnóstico puede demorar hasta 6-8 años posteriores a la aparición de la sintomatología, subestimando así su prevalencia<sup>1,3</sup>.

La IDCV está definida como una disminución en las concentraciones séricas de IgG, IgA y/o IgM en pacientes de género indistinto con sintomatología de inmunodeficiencia >2 años de edad y una causa no definida para la hipogammaglobulinemia (ej. inducida por medicamentos, desordenes genéticos definidos como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X o anormalidades cromosómicas como la trisomía 21, entre otros)<sup>4,5</sup>. En años recientes se han modificado los criterios de diagnóstico, incorporando a la recurrencia de infecciones, la presencia de manifestaciones autoinmunes, granulomatosis, linfoproliferación o un familiar con deficiencia de anticuerpos. Adicionalmente, se incluye la disminución de células B de memoria en <70%, comparado con valores normales relacionados a la edad, y la ausencia de evidencia de una deficiencia profunda de células T CD4<sup>+</sup>. Estos criterios son aplicables cuando el paciente es mayor a 4 años debido a la necesidad de excluir otros desordenes inmunológicos como hipogammaglobulinemia del infante, la cual se resuelve espontáneamente durante los primeros años de vida<sup>6</sup>.

### **1.2. Causas monogénicas en la etiología de la enfermedad.**

La mayoría de los casos de IDCV ocurren de manera espontánea y solo el 5-25% de los pacientes tienen antecedentes familiares que indiquen inmunodeficiencia, primordialmente autosómica dominante, como la deficiencia del antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4). Únicamente en el 2-10% de los pacientes se ha identificado un desorden genético, el resto tiene causa indefinida<sup>7</sup>. Algunas de las

alteraciones monogénicas descritas aparecen en la figura 2, dentro de las cuales se encuentra la deficiencia del coestimulador inducible de células T (ICOS), esencial para la formación del centro germinal y la diferenciación de células B; mutaciones en CD19, en el factor de activación de células B (BAFF); la deficiencia de la proteína de anclaje tipo beige en respuesta a lipopolisacáridos (LRBA) o del inhibidor del receptor de células T (CTLA-4)<sup>1,7,8</sup>.



**Figura 1. Participación estimada de cada mutación reportada dentro de la IDCV.**

### 1.3. Clasificación de pacientes con IDCV.

Basado en estos defectos indicados, es común que los individuos afectados sean clasificados por el fenotipo de células B y T presente, al igual que por la funcionalidad de las células B in vitro. En cultivo, las células B de algunos pacientes son capaces de producir inmunoglobulinas de manera normal, mientras que otros solo producen IgM o ninguno de los isotipos. Al realizar la activación celular vía BCR o TLR7,8 y 9, algunos cultivos provenientes de pacientes con IDCV no son capaces de efectuar un cambio de isotipo, pero sí la expansión de células B con la expresión disminuida de CD21<sup>7</sup>.

En conjunto con las manifestaciones clínicas, estas evidencias funcionales de las diferentes poblaciones celulares son necesarias para definir la probable alteración causante de esta inmunodeficiencia.

En 2002, investigadores clínicos provenientes de Alemania, sugiere una clasificación de la IDCV basada en el fenotipo presentado por las células B y su relación con las manifestaciones clínicas (Figura 2). Un primer acercamiento es mostrado por Warnatz y colaboradores, denominada la clasificación de Friburgo, divide los pacientes en tres

grupos bajo el análisis de la expresión de IgM, IgD, CD27 y CD21. El grupo 1 considera a los pacientes con una reducción severa de células B de memoria con cambio de isotipo

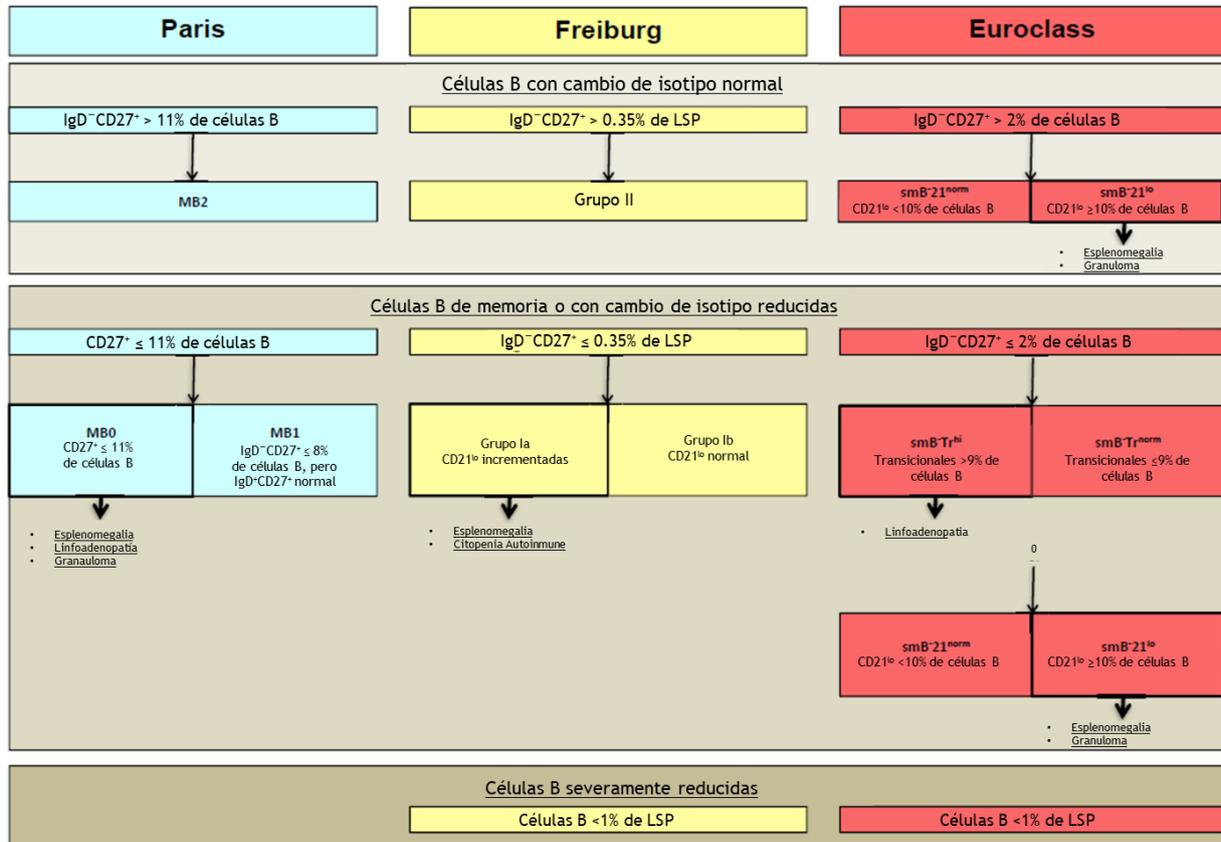


Figura 2. Clasificación por poblaciones de células B para la agrupación de características específicas asociadas a IDCV. Células B con cambio de isotipo= CD19+CD27+IgD-; célula B transicional =CD19+IgMhi+CD38hi; LSP=linfocitos de sangre periférica; Sm, memoria con cambio de isotipo; Tr, transicional.

(menos del 0.4% de los linfocitos), el grupo 2 representa el 25% de los pacientes y poseen números normales de células B de memoria con cambio de isotipo, sugiriendo un defecto posterior a la maduración en centro germinal. El grupo 1 se subdivide en 1a, el cual presenta incremento de las células CD21<sup>low</sup> mayor el 20% del total de células B y una relación con la incidencia de esplenomegalia<sup>9</sup>.

Por otro lado, se encuentra el agrupamiento de Piqueras y colaboradores, denominada la clasificación de Paris. Está considera un grupo MB0 los pacientes con una disminución de células B de memoria CD27<sup>+</sup> por debajo del 11% del total de células B, que al igual que la clasificación de Friburgo, se relaciona con la aparición de esplenomegalia. En los otros grupos, MB1 muestra una reducción de células B de memoria con cambio de isotipo menor al 8%, y MB2 que no encaja con los otros criterios de los otros grupos<sup>10</sup>.

Cinco años después, se lleva a cabo un consenso por diversos países europeos denominado EUROclass y publicado por Wehr C. y colaboradores, lograron obtener una cohorte más robusta con 303 pacientes, los cuales puede clasificar en 7 grupos. El grupo B-, con todos aquellos pacientes con niveles  $<1\%$  de células B son excluidos, evidentemente por la incapacidad de clasificarse por la ausencia de estas subpoblaciones. El grupo con células B de memoria con cambio de isotipo (smB+), con  $>2\%$  de células B de memoria con cambio de isotipo; el grupo con disminución de células B de memoria con cambio de isotipo (smB-), el cual presenta  $<2\%$  de células B de memoria con cambio de isotipo y una incidencia de esplenomegalia y granuloma del 52% y 17%, respectivamente; el grupo con disminución de células B de memoria con cambio de isotipo y elevación de frecuencia de células B transicionales (smB-Tr<sup>high</sup>), cuyas células de memoria con cambio de isotipo están disminuidas y  $>9\%$  de células B transicionales, con una mayor incidencia de linfadenopatía del 57%; el grupo con disminución de células B de memoria con cambio de isotipo y frecuencia normal de células B transicionales (smB-Tr<sup>norm</sup>), que, a diferencia del anterior, posee  $<9\%$  de células transicionales. Para los grupos con  $>2\%$  de células B de memoria con cambio de isotipo, se consideran las células con expresión de CD21. El grupo con células B de memoria con cambio de isotipo y elevación de frecuencia de células B CD21<sup>low</sup> (smB+21<sup>low</sup>), con niveles mayores al 10% tienen una incidencia de esplenomegalia del 50%; el grupo con células B de memoria con cambio de isotipo y frecuencia normal de células B CD21<sup>low</sup> (smB+21<sup>norm</sup>), en niveles normales de expresión de poblaciones CD21<sup>low</sup>. De la misma manera se subclasifican los individuos con  $<2\%$  de células de memoria con cambio de isotipo en grupo con disminución de células B de memoria con cambio de isotipo y elevación de frecuencia de células B CD21<sup>low</sup> (smB-21<sup>low</sup>), cuya incidencia para la presencia de esplenomegalia y granuloma es el mayor de todos los grupos en un 60% y 20%, respectivamente, y el grupo con disminución de células B de memoria con cambio de isotipo y frecuencia normal de células B CD21<sup>low</sup> (smB-21<sup>norm</sup>)<sup>11</sup>.

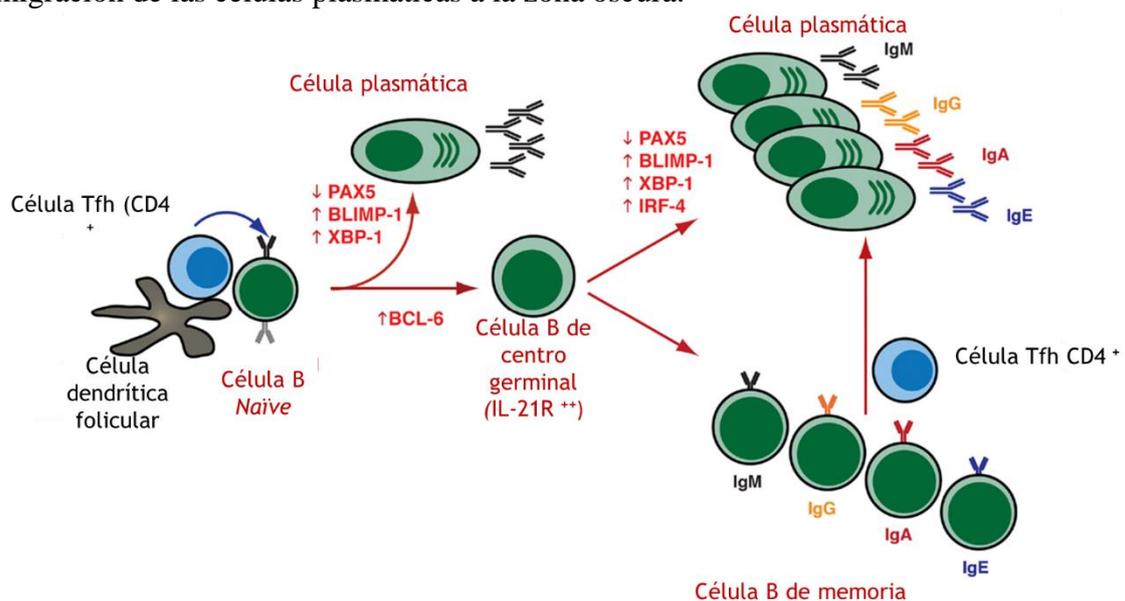
#### **1.4. Poblaciones celulares en IDCV**

Pese a la variabilidad de manifestaciones en los pacientes con IDCV, la marca característica en este padecimiento son los niveles bajos de anticuerpos, lo que indica una anomalía funcional en los linfocitos B. Sin embargo, esto no es restrictivo para esta estirpe celular ya que se requiere la participación de otras células para la producción de

anticuerpos lo que da como resultado una disminución de células B con cambio de isotipo en la mayoría de los casos<sup>7</sup>.

### 1.5. Subpoblaciones de linfocitos B.

El proceso de diferenciación a células de memoria con cambio de isotipo y células plasmáticas de larga vida productoras de anticuerpos ocurre dentro de estructuras en los folículos de órganos linfoides secundarios, denominadas centros germinales. Dentro de estas, podemos encontrar sitios específicos de selección, la zona clara, e hipermutación somática y proliferación de las células B en la zona oscura. Algunas de las células B que expresan la cadena variable del BCR que reconoce al antígeno presentado por las células dendríticas foliculares en la zona clara, son seleccionadas y sufren un proceso de diferenciación en células plasmáticas con cambio de isotipo ( $CD19^+CD38^+IgM-IgD^-$ ) que expresan niveles moderados del factor en respuesta a interferón 4 (IRF4), lo que lleva a la expresión de la proteína 6 del linfoma de células B (BCL6) y la enzima citidina-desaminasa inducida por activación (AICDA) la cual lleva a cabo la hipermutación somática, dándole especificidad por el antígeno presentado (Figura 3). Los niveles de IRF4 son cruciales, ya que al encontrarse elevados promueven la expresión de la proteína 1 de maduración de células B (BLIMP1) y a su vez la de la proteína 1 de unión a la caja X (XBP1) que induce la maquinaria necesaria para que las células produzcan anticuerpos y el incremento del receptor de quimiocina c-x-c de tipo 4 (CXCR4), lo que facilita la migración de las células plasmáticas a la zona oscura.



**Figura 3. Desarrollo de células plasmáticas y B de memoria en centros germinales.**

Aparentemente las proteínas BCL6 y BLIMP1 son mutuamente excluyentes por lo que al ser favorecida una de la otra, permite la formación de centros germinales o la

diferenciación a células plasmáticas respectivamente. Se puede prescindir de STAT3 en una respuesta independiente de células T, donde se encuentran bajos niveles de BCL6, pero es crucial para la diferenciación en centros germinales. BCL6 es un represor transcripcional que inhibe la expresión de tres de los principales factores para el desarrollo de células plasmáticas, STAT3, IRF4 y Blimp-1, por lo que su disminución es fundamental. IRF4 inducido por la activación por CD40/CD40L, regula de manera negativa a BCL6, permitiendo un estado permisivo posterior a la diferenciación de centros germinales<sup>12</sup>.

Este fenómeno requiere de un ambiente celular y de citocinas específicas, primordialmente el proporcionado por las células T foliculares (Tfh). Las células Tfh conllevan una comunicación muy estrecha con la célula B mediante la interacción de moléculas de superficie como CD40/CD40L y ICOS/ICOSL, así como la liberación de IL-4, IL-10 e IL-21<sup>13,14</sup>.

Por otro lado, poco se conoce sobre los mecanismos para que una célula B adquiriera un fenotipo de memoria (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>). A diferencia de las células plasmáticas, se postula un regulador maestro en la célula de memoria, sin embargo, se reportan niveles elevados de la proteína 2 del linfoma de células B (BCL2), considerada uno de los factores antiapoptóticos principales, y la proteína *paired-box 5* (PAX5), la cual se mantiene en estas células desde el proceso de maduración durante la selección en centros germinales, y desaparece en las células cuyo destino es la producción de anticuerpos. Se especula que, en la zona clara, algunas de las células con una afinidad moderada por el antígeno presentado no reciben suficientes estímulos por parte de las células Tfh para la diferenciación a células plasmáticas, lo que no favorece la expresión de CXCR4 impidiendo su migración a la zona oscura, pero sí reciben los suficientes para promover su supervivencia por el incremento de moléculas de interacción, como CD80/CD86<sup>14</sup>.

De acuerdo con un estudio realizado, por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID, por sus siglas en inglés), en 303 pacientes con IDCV provenientes de 8 centros europeos, es frecuente encontrar un porcentaje de células B dentro de los valores normales mínimos (9.7±6.8% V.N. 6%-19%). Sin embargo, un 10% presentó valores por debajo del 1%. Dentro de los fenotipos más comunes en estos individuos fue la disminución de las células B de memoria con cambio de isotipo en >58% de los pacientes (3.4 ± 5.2% de las células B totales V.N. 6.5%-29.2%). El 10.5% de los 303 pacientes presentaba una

severa reducción  $\leq 2\%$  en los valores de células B de zona marginal (V.N. 7.2%-30.8%) y un incremento de células B transicionales  $\geq 9\%$  en el 15% de 211 pacientes (V.N. 0.6%-3.5%). De forma relevante, se describe un incremento de  $13.3 \pm 13.4\%$  de una población particular de células B denominadas CD21<sup>low</sup> en 229 de 303 pacientes (V.N. 1.1%-6.9%)<sup>11</sup>. Estas células son identificadas con una baja expresión de los marcadores de superficie CD21 y CD38, con un incremento de CD19. Una elevación en la frecuencia de esta población ocurre en sujetos que sufren IDCV con manifestaciones autoinmunes comparado con aquellos sin autoinmunidad donde la frecuencia de estas células es menor ( $22.54$  vs.  $10.2$   $p=0.037$ )<sup>15</sup>.

### **1.6. Subpoblaciones de linfocitos T.**

Como se ha mencionado, en el proceso de diferenciación de células plasmáticas se requiere un ambiente celular y de citocinas que lo promuevan. Aunque en la mayoría de los pacientes la frecuencia de células T se encuentre normal, en el 29% de 473 pacientes se ha demostrado una disminución en las células CD3+CD4+ circulantes, y en un estudio de una cohorte de población francesa con diagnóstico de IDCV, destacan las células T CD4 ingenuas o *naïve* con valores por debajo de la media presentada en sujetos sanos. Aunado a esto, el 20% de 60 individuos de nacionalidad italiana con alteraciones en la diferenciación de células *naïve* a células B con cambio de isotipo, se reporta una disminución en la secreción de algunas citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  o IL-10, necesarias para la diferenciación celular<sup>7</sup>.

La evaluación de las poblaciones celulares regulatorias en estos individuos revela su correlación con manifestaciones autoinmunes y autoinflamatorias en alrededor del 20-30% de los pacientes. En 25 individuos estadounidenses con IDCV, la población de células Treg (CD4+, CD25<sup>low</sup>, CD127<sup>high</sup>, FOXP3+) de sangre periférica con o sin activación por anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -CD3/CD28, se encuentra disminuida con respecto a individuos sanos.

### **1.7. Interleucinas involucradas en la diferenciación y cambio de isotipo de células B.**

La diferenciación de células B está regulada por un gran número de citocinas, entre ellas IL10, IL-6 e IL21, producidas por linfocitos Tfh, lo que es necesario para el cambio de isotipo y diferenciación a células plasmáticas, no solo de células B maduras que no han

estado en contacto con su estímulo antigénico (*naïve*), sino también de células B de memoria, incluyendo las que sufren o no cambio de isotipo (tabla 1).

**Tabla 1. Contribución de citocinas en el comportamiento de la célula B *in-vitro*.**

Citocina	Efecto en células B
CD40L	Induce activación y proliferación
IL-2	Incrementa la proliferación de las células estimuladas con CD40L. En conjunto con otras citocinas incrementa la diferenciación de células B activadas.
IL-4	Incrementa la proliferación iniciada por CD40L y el reconocimiento por BCR. Induce expresión de AICDA y el cambio de isotipo a IgG1, IgG4 e IgE.
IL-6	Promueve la supervivencia y función de células plasmáticas en ensayos <i>in-vitro</i> .
IL-10	Promueve la proliferación inducida por CD40L y el reconocimiento por BCR. Induce expresión de AICDA, BLIMP-1 y el cambio de isotipo a IgG1 e IgG3. En conjunto con TGF $\beta$ el cambio a IgA.
IL-12	Induce la diferenciación a células secretoras de IgM. Coopera con IL-6 para aumentar la producción de IgM.
IL-21	Incrementa la proliferación iniciada por CD40L y el reconocimiento por BCR. Induce expresión de BLIMP1, AICDA, BCL6, XBP1. Induce cambio de isotipo a IgG1, IgG3 e IgA1. Promueve la diferenciación a células plasmáticas secretoras de IgM, IgG, IgA e IgE. Coopera con IL-4 para cambio de isotipo a IgG e IgE.

El proceso de diferenciación es de 10-100 veces más evidente debido a la IL-21, con respecto a la IL-10, por lo que su estudio de la primera ha tomado relevancia en la actualidad<sup>8</sup>. En pacientes con IDCV con una disminución de células B de memoria con cambio de isotipo (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>), plasmablastos (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>++</sup>CD38<sup>+++</sup>IgM), y concentraciones normales de células B de memoria sin cambio de isotipo (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son incapaces de diferenciarse a células B de memoria en respuesta a los estímulos anti-CD40, IL-21 y anti-IgM comparado con controles sanos, demostrando la interrupción de dichas señales en pacientes con IDCV, indicando una falla aparente en los mecanismos regulados por estos estímulos<sup>16</sup>.

### 1.8. Interleucina 21 y su receptor.

Dentro de la familia de citocinas de tipo I se encuentra la IL-21, que está codificada por el cromosoma 4q26-q27 en humanos. La IL-21 está conformada por 131 a.a. formando cuatro  $\alpha$ -hélices. Su receptor, IL21R, está codificado por el cromosoma 16 y se conforma de 538 a.a. de una cadena  $\alpha$  y la cadena  $\gamma$  común, la cual también existe en los receptores para IL2, IL4, IL9, IL13 e IL15, entre otras.

Es conocido que la IL-21 activa la vía de señalización de la cinasa de Janus (JAK 1 y 3) quienes fosforilan al transductor de señales y activador de la transcripción 3,1 y 5 (STAT 3, 1 y 5). La IL-21 controla factores de transcripción que son expresados en células que mantienen su capacidad proliferativa como la proteína del linfoma de células B (Bcl-6), la proteína de inducción de la maduración de linfocitos B 1 (Blimp-1), JAK3 y al supresor de la señalización de citocinas (SOCS1 y 3). El IL-21R se encuentra mayoritariamente expresado en linfocitos activados por lo que se piensa que actúa como co-estimulante<sup>17</sup>. Los ratones carentes del receptor de IL-21, inmunizados con antígenos T dependientes, presentan una disminución de anticuerpos de tipo IgG1 antígeno específicos, pero niveles elevados de IgE comparado con ratones silvestres. Además, estos ratones se ven afectados en la generación de centros germinales y células plasmáticas de vida larga. A pesar de que las células de memoria parecieran estar en niveles normales en los ratones cuyo receptor de IL-21 se eliminó, son incapaces de responder a un segundo reto con el antígeno, indicando una carencia de especificidad<sup>13</sup>.

La IL-6 y la IL-21 activan la vía de señalización de STAT3, permitiendo el fenómeno de diferenciación. Se reporta que se puede prescindir de STAT3 en una respuesta independiente de células T, donde se encuentran bajos niveles de BCL6, pero es crucial para la diferenciación en centros germinales<sup>18</sup>. Como se ha mencionado antes, BCL6 es un represor transcripcional que inhibe la expresión de tres de los principales factores para el desarrollo de células plasmáticas, IRF4, Blimp-1, incluso STAT3, por lo que su disminución es fundamental. El IRF4 inducido por la activación por CD40/CD40L, regula de manera negativa a BCL6, permitiendo un estado permisivo posterior a la diferenciación de centros germinales<sup>12</sup>.

### **1.9. Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3).**

El STAT3 está codificado en el cromosoma 12q13, tiene una longitud de 770 a.a. en su isoforma principal  $\alpha$ . Hay cuatro subtipos de la proteína, incluyendo las generadas por “splicing” alternativo, STAT3 $\alpha$ (92kDa), STAT3 $\beta$ (83 kDa), y las producidas por procesamiento proteolítico, STAT3 $\gamma$ (72 kDa) y STAT3 $\delta$ (64 kDa)<sup>19</sup>. La isoforma  $\beta$  es obtenida por “splicing” alternativo del exón 23 generando el remplazo de 55 a.a. de  $\alpha$ , por 7 a.a. característicos en  $\beta$ . Los mecanismos que favorecen la expresión de las diferentes isoformas permanecen desconocidos, sin embargo, se produce variación en la expresión entre cada una de ellas durante el proceso de diferenciación de células de sangre periférica CD34<sup>+</sup> estimuladas con G-CSF, SCF, IL-6, IL-3 y 5% de O<sub>2</sub>. En estos ensayos

se demuestra una preferencia en la expresión de la isoforma  $\beta$  al noveno día. A pesar de ello, la presencia de activación es mostrada principalmente por la isoforma  $\alpha$ , mostrando una fluctuación mínima durante toda la cinética de 16 días (30%-50% de isoforma  $\alpha$  con respecto al total de STAT3 pY705)<sup>20</sup>.

La activación clásica de las isoformas de STAT3 es debida a la fosforilación por la cinasa JAK en su dominio SH2 en el residuo Tyr705, permitiendo su dimerización y traslocación al núcleo uniéndose a la secuencia canónica CCT(N)<sub>3</sub>GAA para modular la expresión génica.

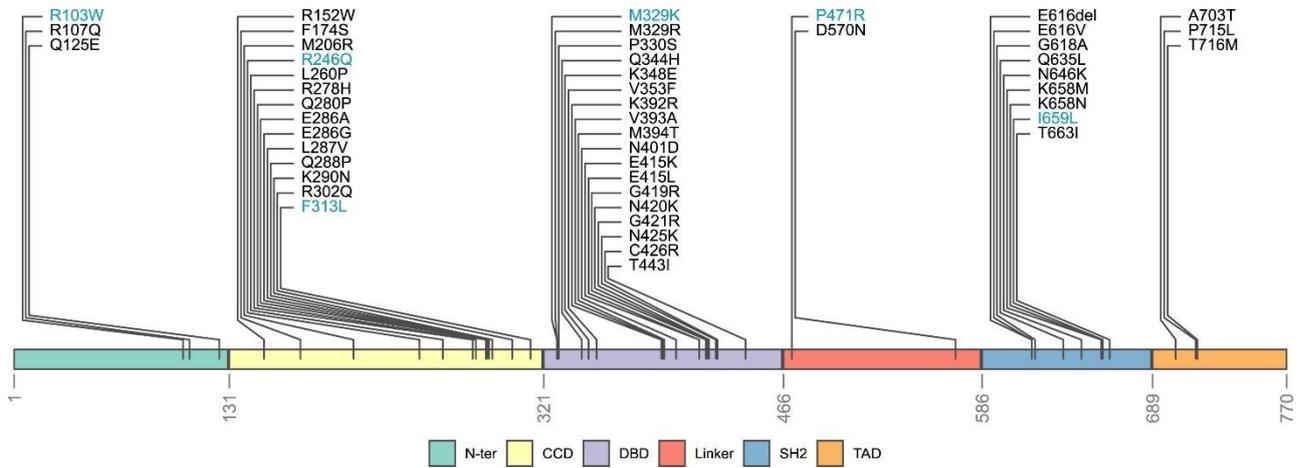
Varias regiones de STAT3 son indispensables para la correcta regulación de su actividad en el ciclo de fosforilación y desfosforilación. la remoción de aproximadamente 50 a.a. en el extremo terminal, resulta en una proteína que in vivo puede ser activada, dimerizar y unirse al DNA, sin embargo, su forma fosforilada puede permanecer al igual que su actividad hasta por 12 horas, comparada con la variante silvestre que no dura más de 4 horas<sup>21</sup>.

El STAT3 regresa al citoplasma debido a su desfosforilación. Su activación también está regulada por diferentes mecanismos, entre ellos, por SOCS3 (Figura 3)<sup>22</sup>. En un modelo de células AtT20, la activación de la secreción de la hormona adrenocorticotropina inducida por el factor inhibitorio de leucemia (LIF) se abate cuando se inactiva STAT3. LIF además induce la expresión de SOCS3 y al llegar a la sobreexpresión promueve una disminución de la fosforilación de STAT3 y una baja en la secreción de adrenocorticotropina, el proceso de transcripción, traducción y activación de SOCS3 demora aproximadamente 1 hora. Otras moléculas como SHP-1, una fosfatasa de tirosina citoplasmática encontrada de manera constitutiva, contiene dominios SH2 y posee actividad como regulador negativo de receptores de citocinas, así como de mediadores fosforilados, como JAK en los primeros 20 min de ser fosforilado el sustrato<sup>23,24</sup>. Se han descrito otras fosfatasas con potencial regulador de la vía JAK3/STAT3 (PTPN9, SH2, etc.) que, al encontrarse mutadas con una pérdida de función, promueven la desregulación de STAT3 en linfoma de células B<sup>25</sup>.

#### **1.10. Mutaciones asociadas a la ganancia de función de STAT3.**

En 2007 se determinó la mutación de STAT3 que le confería pérdida de función (LOF), característica que le atribuyó ser la base genética del desarrollo de síndrome de hiper-IgE (HIES) autosómico dominante, también conocido como síndrome de Job. Actualmente se conocen 89 diferentes mutaciones, muchas de las cuales dan lugar a la pérdida en su

actividad debido a la disminución en la fosforilación de Y705 posterior al estímulo con IL-6 o IL-21<sup>22</sup>.



**Figura 4. Representación esquemática de las mutaciones reportadas de la proteína STAT3 con ganancia de función.** Todas las mutaciones han sido reportadas en al menos un paciente con sintomatología clínica para STAT3 GOF. Las mutaciones indicadas en negro, la actividad de ganancia de función fue confirmada por ensayos in vitro usando la prueba de luciferasa o de manera ex vivo determinando la fosforilación de STAT3. Las mutaciones en azul, no se ha reportado actividad de ganancia de función. N-ter= extremo amino terminal; CCD=Dominio enrollado en espiral; DBD= Dominio de unión al DNA; SH2=Dominio con homología a Src 2; TAD=Dominio de transactivación<sup>26</sup>

Los pacientes con HIES poseen una clínica diferencial bien definida, además de los altos niveles de IgE, como lo es la presencia de eczema, disminución de la diferenciación de linfocitos Th17, así como manifestaciones aparentes en el desarrollo facial, dentario, articular y propensión a fracturas entre otras alteraciones óseas; características que los diferencia de los demás trastornos de inmunodeficiencia.

Por otro lado, han sido descritas múltiples mutaciones que le confieren ganancia de función (GOF) a STAT3 en pacientes con procesos de inflamación y/o autoinmunidad multiorgánica severa o de inicio, linfoproliferación, hipogammaglobulinemia, susceptibilidad a infecciones y una falla severa en el crecimiento<sup>22</sup>. En cuanto a su fenotipo, los pacientes GOF en STAT3 suele ser muy diverso, dificultando el diagnóstico y definición clínica. Dentro de estas mutaciones se encuentran en el dominio de hélice enrollada, como el cambio en K290N, promoviendo la actividad transcripcional de STAT3 con fenotipo muy similar al observado en pacientes con diagnóstico de inmunodeficiencia común variable (IDCV). A la fecha se han descrito diversas mutaciones a lo largo de toda la proteína STAT3 que confiere una ganancia de función (Figura 4), los cuales han sido confirmados in vitro por el ensayo de luciferasa<sup>26</sup>.

## **2. Justificación**

La IDCV es una de las inmunodeficiencias con mayor prevalencia a nivel mundial pero debido a la heterogeneidad clínica y fenotípica se ha complicado su estudio. Dado que la causa es de etiología desconocida en más del 90% de los afectados, múltiples investigaciones se han enfocado en determinar las causas directas e indirectas que conlleven a un defecto en la diferenciación de las células B. Los últimos reportes indican la relevancia de diversas citocinas en este proceso, catalogando a la IL-21 como uno de los estímulos más potentes de las células B para la diferenciación a células B de memoria y células plasmáticas. Poco se conoce con respecto a su participación en células B maduras de pacientes con IDCV, por lo que una alteración en la vía de señalización activada por esta citocina en la célula B podría explicar el fenotipo clínico de IDCV.

## **3. Hipótesis.**

Las células B maduras de pacientes con IDCV poseen alteraciones en la expresión del receptor y de las moléculas involucradas en la vía de señalización activada por IL-21.

## **4. Objetivo general**

Evaluar funcionalmente células B de pacientes con IDCV en respuesta a IL-21.

### **4.1. Objetivos Específicos:**

1. Determinar las subpoblaciones de linfocitos B y T en PBMC's de pacientes con IDCV por citometría de flujo.
2. Evaluar la secreción de IL-21 inducida por la estimulación de PBMC's.
3. Determinar la expresión del receptor de IL-21 en las células B *naïve* y de memoria de los pacientes de IDCV.
4. Determinar la fosforilación de STAT3 en células B *naïve* y de memoria, así como células inmortalizadas a partir de PBMC's de pacientes de IDCV previa y posterior a la activación por los diferentes estímulos.

## **5. Metodología**

### **5.1. Pacientes y donadores sanos.**

Se reclutaron 24 pacientes con diagnóstico de IDCV según los criterios de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (European Society of Immunodeficiency; ESID) y el Grupo Panamericano de Inmunodeficiencia (Pan-American group for Immunodeficiency; PAGID), siguiendo las guías de ética de la declaración de Helsinki de 1975. Los pacientes reciben terapia de remplazo de inmunoglobulinas cada 21-28 días y se consideró para la

toma de muestra la ausencia de infecciones severas, terapia con agentes biológicos o inmunosupresora. Adicionalmente se incluyen 20 sujetos sanos pareados por edad y sexo según los criterios mencionados en la tabla 2. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría (decisión número 027/2016).

Tabla 2. Criterios de exclusión e inclusión de la población de estudio.			
Muestras	Inclusión	Exclusión	Eliminación
Pacientes con IDCV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hombres y mujeres con diagnóstico de IDCV según los criterios de Conley y ESID.</li> <li>Edad &gt;4 años.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diagnóstico atribuible a otras causas de hipogammaglobulinemia.</li> <li>Inmunodeficiencia secundaria.</li> <li>No autorice el consentimiento informado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Muestra insuficiente.</li> <li>Abandono del estudio.</li> </ul>
Controles	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hombres y mujeres aparentemente sanos.</li> <li>Edad &gt;4 años.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Presentar sintomatología de alteraciones inmunológicas.</li> <li>No autorice el consentimiento informado.</li> </ul>	

IDCV: Inmunodeficiencia común variable. ESID: Sociedad Europea de Inmunodeficiencias.

## 5.2. Obtención de PBMC's

Utilizando el sistema vacutainer con tubos heparinizados de 6 ml; se obtuvieron 18 ml de sangre venosa de los pacientes y controles sanos. De la sangre total se separaron 0.5 ml para determinar las poblaciones leucocitarias. El resto de sangre total se utilizó para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) mediante gradiente de Ficoll (Histopaque®, Sigma-Aldrich, EEUU) en una proporción 1:3 respecto a sangre total en tubos Falcon de 15 ml. Se centrifugan 30 min a 1500 rpm a T.A. (Sorvall ST8R, Thermo Fisher Scientific, EEUU) con aceleración y desaceleración lenta. Posteriormente fue tomada únicamente la fracción intermedia del gradiente, conteniendo las PBMC's, y lavada con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 5 min a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se cuantificaron por hemocitómetro con azul tripano en una dilución 1:10.

## 5.3. Determinación de poblaciones celulares por citometría de flujo.

A partir de sangre periférica, se identificaron las diferentes poblaciones celulares utilizando la siguiente combinación de anticuerpos:

Se analizó la expresión de los marcadores de superficie celular por citometría de flujo usando el BD FACSAria I (BD Biosciences, EEUU). La tinción se realizó en muestras de sangre total incubados con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales:

<b>Tabla 3. Descripción de poblaciones celulares de acuerdo con sus marcadores de diferenciación celular.</b>	
<b>Población celular</b>	<b>Marcadores de diferenciación</b>
Células B	CD19 <sup>+</sup>
Células B Naïve	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>
Células B Memoria	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>
Células B Memoria con cambio de isotipo	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>
Células B Memoria sin cambio de isotipo	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>
Células Transicionales	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>+++</sup> CD38 <sup>+++</sup>
Plasmablastos	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup> CD38 <sup>+++</sup>
Células B CD21 <sup>low</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD21 <sup>-/low</sup> CD38 <sup>-</sup>
Células T	CD3 <sup>+</sup>
Células T cooperadoras	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
Células T citotóxicas	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
Células T Foliculares circulantes	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CXCR5 <sup>+</sup>
Células T Regulatoras	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup>

Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BD Biosciences, San Diego, EEUU. Las muestras fueron incubadas por 20 min a T.A. en oscuridad y posterior a este tiempo, se lisaron los eritrocitos con 500µl de solución FACS de lisis (BD Bioscience) por 10 min. Las células fueron lavadas con PBA (1% de albumina sérica bovina en PBS) y fijadas usando 1% de formol en PBS.

#### **5.4. Determinación de receptor de IL-21 por citometría de flujo.**

A partir de las PBMC's, se tiñeron  $1 \times 10^6$  células con mAb  $\alpha$ -IL21R PE y los anticuerpos respectivos para la identificación de las subpoblaciones de células B (CD19 APC/ CD27 FITC). Las muestras fueron incubadas por 20 min a T.A. en oscuridad. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBA y fijadas con 1% formol.

#### **5.5. ELISA para cuantificar la producción de IL-21.**

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células en medio RPMI que contenía 100 ng/ml PMA + 1µg/ml Ionomicina durante 24 horas a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la estimulación, el

sobrenadante se colectó y se cuantificó mediante el kit ELISA para IL-21 humana (Invitrogen, MA, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas Sunrise (TECAN, Männedorf, Suiza). La estimulación de PBMC's de cada paciente se evaluó en conjunto con la muestra de un donador sano al mismo tiempo, como control normal de activación. Los resultados fueron interpolados en la curva estándar que se realizó con la proteína provista por el fabricante, obteniendo un límite de detección de 8-1000 pg/ml.

### **5.6. Inmortalización de células B**

A partir del aislamiento de PBMC's se contabilizaron  $1 \times 10^6$  células contenidas en 500  $\mu$ l de RPMI 10% SFB y se le añadieron 500  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo de la línea celular B95-8 infectada con EBV, el cual fue filtrado a través de poros de 0.45  $\mu$ m. Para inducir la inmortalización con mayor eficiencia se colocaron 20  $\mu$ l de fitohemaglutinina (PHA) a 1mg/ml y se incubaron durante 3-4 semanas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se consideraron inmortalizadas aquellas muestras con formación de cúmulos celulares que sobrevivieron más de 5 semanas observadas bajo el microscopio.

### **5.7. Determinación de pSTAT3 por citometría de flujo.**

Para la inducción de la fosforilación de STAT3, se colocaron  $1 \times 10^6$  PBMC's o  $5 \times 10^5$  células inmortalizadas en tubos eppendorf de 1.5  $\mu$ l por condición y fueron teñidas con  $\alpha$ -CD19 APC y  $\alpha$ -CD27 FITC durante 30 min, posteriormente fueron lavadas con PBA 1% y centrifugadas 5 min a 1500rpm. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de RPMI 1640 base (Gibco, CA, EEUU) y se incubaron a 4° C por 30 min para llevar a las células a valores basales de fosforilación. Una vez pasado el tiempo, las células fueron estimuladas con 80 ng/ml de IL-21 recombinante resuspendida en PBS durante 15 y 60 min a 37° C. Se utilizó como control negativo PBMC's sin estímulo incubadas bajo las condiciones ya mencionadas. Las células fueron fijadas a los tiempos indicados con 80  $\mu$ l de formaldehído 14% durante 10 min y posteriormente lavadas con PBA. Después, fueron permeabilizadas 30 min con 500  $\mu$ l de metanol en hielo y lavadas con PBA. A continuación, se realizó su tinción con  $\alpha$ -pSTAT3 (pY705) PE por 30 min a T.A. Se realizó un último lavado antes de su lectura en el citómetro. Se utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con PE del isotipo IgG2a (BD Biosciences, CA, EEUU) como control de isotipo.

### **5.8. Determinación de pSTAT3 por Western Blot.**

Utilizando  $1 \times 10^6$  PBMC's o  $5 \times 10^5$  células inmortalizadas por condición, se estimularon durante 15 y 60 min a  $37^\circ \text{C}$  y  $5\% \text{CO}_2$  con 80 ng/ml de IL-21 en 500  $\mu\text{l}$  de medio RPMI 1640 base posterior a la incubación por 30 min en hielo. Para las células inmortalizadas se añadió el tiempo de 120 min de incubación con la citocina. Cada tiempo de estimulación contiene una condición sin citocina como control negativo. Una vez pasado el tiempo de estimulación correspondiente, se concentraron las células al centrifugarlas a 1500 rpm durante 5 min a T.A. y se deshecho el sobrenadante. Las células fueron lisadas con 50  $\mu\text{l}$  buffer de lisis 1X (Cell Signaling Tech, MA, EEUU) durante 20 min en hielo. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a  $4^\circ \text{C}$  para eliminar detritos celulares, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína utilizando el método de Bronsted-Lowry mediante el kit DC Protein Assay (BioRad, CA, EEUU). Los lisados fueron desnaturalizados con buffer Laemmli y calentamiento a  $70^\circ \text{C}$  por 10 min, seguido del corrimiento electroforético de 10  $\mu\text{g}$  de proteína de los lisados en un sistema SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida a 95 V siguiendo el frente de corrida. A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas en un sistema de transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa 0.2  $\mu\text{m}$  durante 90 min a 100 V (BioRad, CA, EEUU). La expresión de proteína se evaluó utilizando anticuerpos primarios producidos en conejo contra STAT3 total dilución 1:2000, pSTAT3 1:30000 y GAPDH dilución 1:5000 (Abcam, Cambridge, RU) como control de carga incubándolos toda la noche a  $4^\circ \text{C}$ . Se lavó el exceso de anticuerpo con TBS-Tween %0.01 por 30 min, desechando y agregando nuevo buffer de lavado, cada 10 min. Para identificar la fracción constante de los anticuerpos primarios, se utilizó un anticuerpo secundario anti-Fc de IgG de conejo producido en cabra marcado con IRDye® 680LT incubándolo por 1 hora a T.A. en oscuridad. Se realizó un último lavado previo al revelado de las bandas en el escáner Li-Cor Odyssey (LICOR Biosciences, NE, EEUU). La observación de las bandas para STAT3 y pSTAT3 se realizó individualmente al realizar un proceso de desnudamiento de la membrana con buffer de desnudamiento medio durante 30 min a T.A y lavados posteriores con TBS-Tween %0.01.

### **5.9. Extracción de DNA de sangre periférica.**

A partir de 2ml de sangre total, se realizó la lisis de eritrocitos utilizando una relación 1:3 de buffer de lisis de eritrocitos durante 10 min en hielo por duplicado, eliminando el primer lisado por centrifugación. A continuación, se centrifugó la muestra, se decantó el sobrenadante y se resuspendió por pipeteo en 2 ml de buffer de lisis de leucocitos hasta

homogeneizar. Las proteínas fueron precipitadas con 700µl de solución precipitante y se realizó agitación por vortex. Posteriormente se centrifugaron a 3700 rpm durante 10 min a T.A., se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo y se adicionó 1 volumen de isopropanol. A continuación, se agita la muestra suavemente para obtener la hebra de DNA genómico. Se concentra a máxima velocidad por 10 min, se decanta el sobrenadante y se lava con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifuga a máxima velocidad por duplicado y se seca en campana durante toda la noche. Se reconstituye en solución de rehidratación de DNA de acuerdo con el tamaño de la hebra observada 50-100 µl durante toda la noche. Se cuantifica por espectrofotometría a 260 nm en NanoDrop (Thermofisher Scientific, MA, EEUU). Se verificó integridad en gel de TAE-agarosa 0.8% durante 40 min 100V.

#### 5.10. Amplificación de gen STAT3 por PCR punto final.

La amplificación del gen STAT3 se realizó para cada uno de sus exones de tal manera que los amplificados tuvieran un tamaño  $\pm 500$ pb para su posterior secuenciación, se usaron para cada par de “primers”, las mezclas maestras (New England Biolabs, MA, EEUU) mostradas en tabla 1.

<b>Tabla 4. Mezclas maestras de PCR</b>		
Reactivo	Amplificación de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 9-10, 11, 12-13-14, 15, 18-19, 20, 21, 22-23, 24. (para 1 reacción de 25µl; expresado en µl).	Amplificación de los exones 7-8 y 16-17. (para 1 reacción de 25µl; expresado en µl).
Buffer Taq	2.5	2.5
Mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (dNTP's)	0.5	0.5
“Primer Fw” 0.025nM/µl.	0.2	0.2
“Primer Rv” 0.025nM/µl.	0.2	0.2
MgCl <sub>2</sub>	1.5	N/A

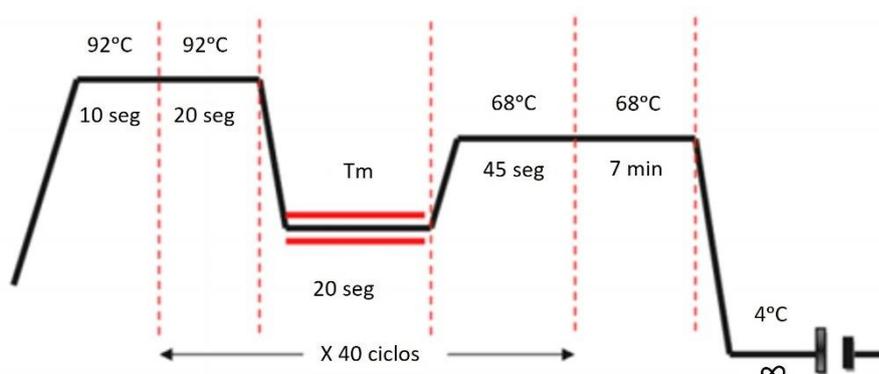
H <sub>2</sub> O libre de DNAsas	Ajustar hasta 25 µl	Ajustar hasta 25 µl
DNA polimerasa 5000 U/ml	0.125	0.125
Muestra	100 nm según concentración de muestra	100 nm según concentración de muestra

Los “primers” para cada exón se amplificaron según la temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) determinada con gradiente de temperaturas en el termociclador, las cuales se indican en la tabla a continuación.

Nombre del primer	Secuencia 5' a 3'	No. de bases	Amplicón (Pb)	T <sub>m</sub> determinada (°C)
STAT3_E2_Fw	AGTCCAGGAGTTCAAGGCCAC	21	569	66
STAT3_E2_Rv	ACAGTTGCCACATGCCCTTC	21		
STAT3_E3_Fw	CATGCCTGGCCTGGAATAATTG	22	555	66
STAT3_E3_Rw	TGACAAGAGAAGTGATTCTCAGG	23		
STAT3_E4_Fwd	ACCCAGGCTCTGAAGCCTTTG	21	468	64
STAT3_E4_Rv	CTGTTGGATTCTTTTGGTGGAAC	23		
STAT3_E5_Fw	TACTGGACACCACGTTTAAGTAG	23	731	64
STAT3_E5_Rv	AGGCTGAGTTGGGAGGATCAC	21		
STAT3_E6_Fw	CCAACAGGGAGCCTTCTCTTG	21	340	63
STAT3_E6_Rw	CCGCCTTAAGATCTAAACAGAG	22		
STAT3_E7_8_Fwd	CCAGGAGTATTCCTCAGGTC	21	1233/1133/653	55
STAT3_E7_8_Rv	AGTCCCCACGTTGGAGATATAG	22		
STAT3_E9_10_Fw	ATTGTAGTGGTCTCCATGTCTTC	23	590	64
STAT3_E9_10_Rw	TACTGCCTGTGACACCACACC	21		
STAT3_E11_Fwd	TACAGGTACATGCTACCACACC	22	498	67
STAT3_E11_Rv	CAGACACGTAAATGACAATGCAC	23		
STAT3_E12_13_14_Fw	AAATGCCCAGGAGCACAGAGG	21	595	64
STAT3_E12_13_14_Rw	ACTACAGCTGAAAGAACAGGTTG	23		
STAT3_E15_Fwd	ATAGGTGTGCACCACCACACC	21	447	67
STAT3_E15_Rw	AGACTTTATTGCCAGATGGGATG	23		
STAT3_E16_17_Fwd	TTGGCAGCAGGTGTGGTTTATG	22	588	66
STAT3_E16_17_Rv	CAGGAAAGAACATGGCCTAATG	23		
STAT3_E18_19_Fw	AACAGTGCCTACCTTCAAAGATG	23	595	66
STAT3_E18_19_Rw	TTATTGCTAACAGGGCATCCATC	23		
STAT3_E20_Fwd	AACATGGCTGGCAAGGGCTTC	21	550	67
STAT3_E20_Rv	TCACTGGAGCAAGCAAAACAAAG	23		

STAT3_E21_Fwd	AAGCCAGCCTGAATATTTCCAC	22	525	64
STAT3_E21_Rv	GCACTCACTACAATCTTTCCC	22		
STAT3_E22_E23_Fwd	TGAGTTTCAAATCAGTCCTGCC	22	606	62
STAT3_E22_E23_Rv	ATGTGAGAGCATCACACAAAGG	22		
STAT3_E24_Fw	CAGGAGATTGGATAGCAGTGG	21	572	66
STAT3_E24_Rv	AGAAACAGGCAGAAGGATGCC	21		

Se utilizaron las condiciones de PCR en el termociclador Veriti (Applied Biosystem, MA, EEUU) que se muestran en la siguiente figura.



**Figura 5. Condiciones de PCR para los diferentes exones de STAT3.**

Una vez obtenido el producto de amplificación se verifican los amplificados obtenidos mediante el corrimiento de 4µl del producto en un gel TAE-agarosa 2% a 75V por 45 min teñido con Bromuro de Etidio.

### 5.11. Preparación de producto de PCR para secuenciación.

La muestra restante se sometió a un tratamiento para la eliminación de componentes de la reacción diferentes a los productos de reacción utilizando las enzimas TSAP y EXO 1 según tabla 6 (Promega, WI, EEUU), incubadas por 15 min a 37° C seguido de un periodo de 10 min a 80° C.

<b>Tabla 6. Preparación de mezcla maestra para purificación.</b>	
Reactivos	Cantidades en µl para 1 reacción
TSAP	0.1 µl
EXO 1	0.5 µl

Buffer 10X	1µl
------------	-----

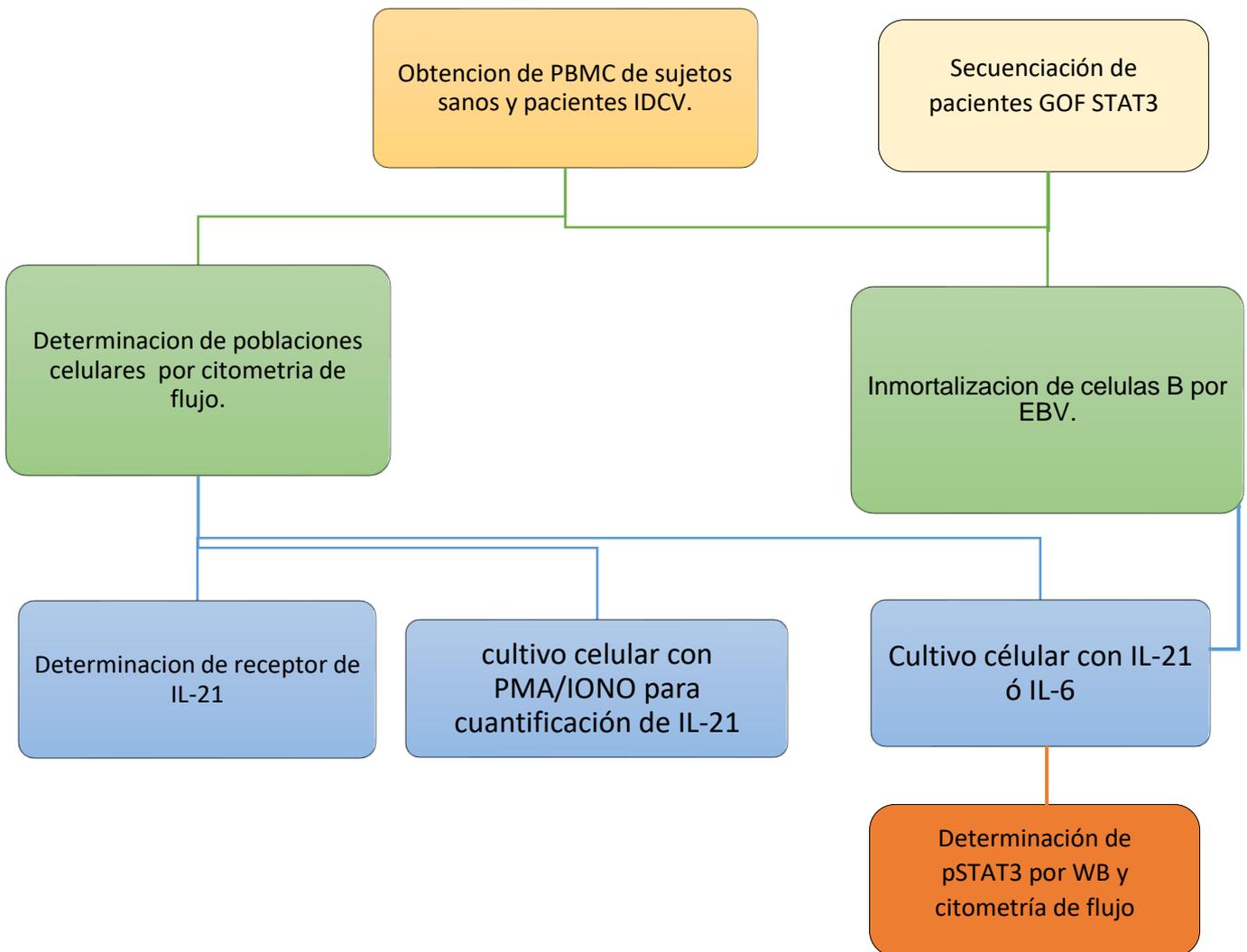
Posterior a la purificación de la muestra, se cuantificó el producto de amplificación utilizando el “kit” Qubit 3.0 dsDNA HS Q32851 (Invitrogen, MA, EEUU), según las indicaciones del proveedor. Posteriormente se ajustó el contenido a 10ng/µl para cada amplificado en agua inyectable con 10 µM del “primer” de interés Fw o Rv. El marcaje de secuenciación se realizó usando el “kit” de BigDye® Terminator (Applied Biosystems, CA, EEUU).

Las muestras fueron secuenciadas en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM, unidad Morelos y en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

#### **5.12. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de los programas GraphPad Prism 5.03 para Windows (San Diego, CA). Para todos los grupos realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, correspondiendo a datos no paramétricos. El análisis de comparación para 2 grupos se hizo mediante una prueba U de Mann Whitney para datos no paramétricos, mientras que para las comparaciones múltiples de 3 o 5 grupos, se realizó un ANOVA de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos con una prueba “posthoc” de Tamhane para datos no homogéneos. Se llevó a cabo un análisis de correlación en la población total de pacientes para los valores de inmunoglobulinas séricas, puntaje de severidad o los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares por medio de una R de Spearman para datos no paramétricos. El valor- P se determinó mediante la significancia bilateral a un intervalo de confianza de 95%. Se consideró como significativo un valor- P < 0.05.

## 6. Diagrama de flujo



## **7. Resultados**

### **7.1. Descripción de la población de estudio**

Se reclutaron 24 pacientes en el estudio, incluyendo 17 personas del sexo femenino y 7 del sexo masculino. La edad promedio de los pacientes al ser incluidos en el estudio, fueron 35.08 años, mientras que los donadores sanos, 29.04 años (Tablas 7, 8 y 9). La edad media de aparición de los síntomas en los pacientes con IDCV fue de 14.72 años en 16 de los 24 pacientes, mientras que la edad promedio en la que se realizó el diagnóstico de IDCV fue a los 27.60 años, se desconoce este dato del resto de los individuos. Realizando la comparación entre la edad de inicio y edad de diagnóstico, se determina una media de 13.37 años de diferencia entre ambas edades. Al momento de toma de muestra, los pacientes tenían una media de 6.07 años de haberse confirmado su diagnóstico como IDCV. Respecto a las manifestaciones clínicas, los episodios de sinusitis fueron los más frecuentes en el 70.83 % de los sujetos con IDCV. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan neumonía, enteropatías y enfermedades autoinmunes (54.16%, 45.83% y 45.83%, respectivamente) (Tabla 9). En menor medida, se encuentra la aparición de granulomas o tumores sólidos (8.33% y 4.17%, respectivamente). Se consideran de referencia los niveles de inmunoglobulinas en sujetos sanos en el rango de edad y el laboratorio donde se procesó la muestra<sup>27</sup>. Se considera hipoglobulinemia cuando el sujeto presenta una disminución, en el caso de las inmunoglobulinas de isotipo IgG con al menos 2 desviaciones estándar por debajo de la media y para los isotipos IgA e IgM al menos una desviación estándar por debajo del valor de referencia para la edad. Los datos individuales pueden observarse en la tabla 7 y 8 para los pacientes IDCV y sujetos sanos, respectivamente. Considerando las frecuencias de células B de memoria con cambio de isotipo, se divide la población de pacientes con IDCV, en grupo I aquellos con un porcentaje menor al 0.4% del total de linfocitos de sangre periférica (PBL) y grupo II a los pacientes con una frecuencia mayor a 0.4% de PBL<sup>28</sup>. Al realizar esta clasificación se observan diferencias significativas al comparar las proporciones de género en el grupo II comparado con el grupo control ( $p=0.0485$ ). En relación con los niveles séricos de IgA, los pacientes en el grupo I presentan menores niveles comparado con el grupo II ( $p=0.0458$ ). En el resto de los parámetros no se observan diferencias estadísticamente significativas al realizar la clasificación.

### **7.2. Comparación de poblaciones linfocitarias en sangre periférica de pacientes IDCV respecto a DS.**

### 7.2.1. Subpoblaciones de células T.

Se analizaron las poblaciones de linfocitos totales a partir de sangre total de los pacientes con IDCV comparadas con los DS (Figura 6A). Se determinó una disminución en los pacientes IDCV con diferencias estadísticamente significativas considerando la comparación de frecuencias, así como el correspondiente de cuentas linfocitarias absolutas ( $p=0.0118$  y  $0.0065$ , respectivamente). Con relación a las células T totales (Figura 6B), el comparativo de frecuencias indica un aumento en el grupo de pacientes

Tabla 7. Características clínicas e inmunológicas de los pacientes con IDCV de acuerdo con su frecuencia de células B con cambio de isotipo.

Parámetros	Controles sanos (n=20)	IDCV total (n=24)	IDCV grupo I* (n=14)	IDCV grupo II** (n=10)	$p^a$	$p^b$	$p^c$	$p^d$
Genero (F/M)	10/10	17/7	8/6	9/1	0.2176	0.7385	<b>0.0485</b>	0.1718
Edad (media±SD)	29.04 ± 17.35	35.08 ± 17.69	32.21 ± 17.03	39.10 ± 18.70	0.1830	0.4152	0.1577	0.4801
Edad de aparición de síntomas (media±SD)		14.72 ± 11.82	13.50 ± 10.29	17.40 ± 15.69				0.5288
Edad al diagnóstico (media±SD)		27.60 ± 15.26	23.81 ± 12.98	35.17 ± 17.84				0.2039
Años transcurridos para el diagnóstico (media±SD)		13.37 ± 12.92	22.67 ± 17.31	8.29 ± 6.10				0.1406
Años con diagnóstico (media±SD)		6.07 ± 7.38	3.67 ± 2.58	7.27 ± 8.74				0.5685
<b>Manifestaciones clínicas (número de casos (%))</b>								
Neumonía		13(54.16)	10(71.43)	3 (30)				0.0953
Sinusitis		17 (70.83)	12 (85.71)	5 (50)				0.0850
Bronquiectasias		9 (37.5)	7 (50)	2 (20)				0.2099
Esplenomegalia		6 (25)	5 (35.71)	1 (10)				0.3408
Linfadenopatía		10 (41.66)	6 (42.86)	4 (40)				>0.9999
Granulomas		2 (8.33)	2 (14.29)	0 (0)				0.4928
Enteropatías		11 (45.83)	8 (57.14)	3 (30)				0.2397
Enfermedades autoinmunes		11 (45.83)	6 (42.86)	5 (50)				>0.9999
Cáncer (tumores sólidos)		1 (4.17)	1 (7.14)	0 (0)				>0.9999
Puntaje de severidad (media±SD)		6.04 ± 4.50	7.14 ± 5.38	4.5 ± 2.32				0.1835
<b>Niveles de inmunoglobulinas mg/dL (media±SD)</b>								
IgG mg/dl	1350 a 640 <sup>#</sup>	292.4 ± 184.6	230.9 ± 162.2	378.5 ± 187				0.0539
IgA mg/dl	312 a 70 <sup>#</sup>	18.24 ± 29.63	5.81 ± 8.03	35.64 ± 39.68				<b>0.0458</b>
IgM mg/dl	352 a 56 <sup>#</sup>	60 ± 115.5	57.16 ± 143.3	63.97 ± 66.41				0.0983

\*Pacientes con una frecuencia de células B de memoria con cambio de isotipo menor al 0.4% de los linfocitos totales. \*\* Pacientes con una frecuencia de células B de memoria con cambio de isotipo por encima de 0.4% de los linfocitos totales. <sup>#</sup> Valores normales de inmunoglobulinas en adultos mayores de 16 años. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para analizar diferencias entre el sexo o las manifestaciones clínicas y la prueba U de Mann-Whitney para edad o niveles de inmunoglobulinas con respecto al grupo indicado por el superíndice. <sup>a</sup> comparación estadística de los controles sanos con IDCV total. <sup>b</sup> controles sanos con el grupo I. <sup>c</sup> Controles sanos con el grupo I. <sup>d</sup> Grupo I respecto a grupo II. El valor p es estadísticamente significativo a  $<0.05$  y se presenta en negritas

vs DS ( $p=0.0245$ ). Sin embargo, en el análisis de cuentas absolutas se observa una clara disminución de células en el grupo de pacientes ( $p<0.0001$ ). Comparando la subpoblación de células T CD8<sup>+</sup> en frecuencia (Figura 6C), no existe diferencia significativa ( $p=0.6325$ ). Al igual que las poblaciones anteriores, los valores absolutos arrojaron

menores números celulares en los pacientes IDCV ( $p<0.0001$ ). En contraparte, los porcentajes de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 6D) en IDCV son mayores que el grupo control comparadas con DS ( $p=0.0147$ ). Nuevamente, evaluando la población celular en cuentas absolutas, se aprecia una disminución en el grupo de pacientes ( $p=0.0105$ ). Los datos individuales pueden observarse en la tabla 10 y 11 para los pacientes IDCV y sujetos sanos, respectivamente.

### 3.1.1. Subpoblaciones de células B

Partiendo de los linfocitos B CD19<sup>+</sup>, se evalúan los porcentajes de células B totales (Figura 7A). Los pacientes no muestran una disminución con significancia estadística al ser comparadas con los donadores sanos ( $p=0.2730$ ). En concordancia con el bajo número de linfocitos totales, las células B también se encuentran disminuidas en los pacientes con IDCV respecto a DS ( $p=0.0030$ ). Relacionado a las subpoblaciones de células B, las células B naïve (Figura 7B) al ser comparadas en frecuencias se visualiza un incremento en los pacientes comparado con los sujetos sanos ( $p=0.0003$ ). Sin embargo, en cuentas absolutas, esta diferencia de pierde ( $p=0.0725$ ). Utilizando el marcador de memoria CD27 e IgD para indicar el cambio de isotipo en células B, se observa una disminución en las proporciones de células de memoria sin cambio de isotipo en los pacientes IDCV (Figura 7C) tanto en porcentajes como en cuentas absolutas ( $p=0.0055$  y  $p<0.0001$ , respectivamente). Siguiendo con los marcadores mencionados, se comparan los valores de células B de memoria con cambio de isotipo en los pacientes con respecto a los controles sanos (Figura 7D). En ambas comparaciones, frecuencias y valores absolutos, se determina una clara disminución de células B de memoria con cambio de isotipo en los pacientes IDCV ( $p<0.0001$  en ambos casos). Según las comparaciones realizadas, las células B inmaduras en circulación, las células B transicionales (Figura 7E), no presentan una variación en porcentajes o cuentas absolutas respecto a lo DS ( $p=0.9150$  y  $p=0.0681$ , respectivamente). La población de células B caracterizadas por una baja expresión de CD21 y ausencia de CD38 (Figura 7F), la cual se asocia a la severidad en las manifestaciones<sup>28</sup>, incrementan significativamente en los pacientes IDCV al comparar las frecuencias vs DS ( $p=0.0313$ ). Al comparar en números absolutos, la diferencia desaparece ( $p=0.5461$ ). Otra de las subpoblaciones de importancia inmunológica para la evaluación de la IDCV, son los plasmablastos (Figura 7G). Al ser comparadas las frecuencias o cuentas absolutas en los pacientes IDCV, se observa una clara disminución en ambos casos respecto a donadores sanos ( $p=0.0220$  y  $p=0.0002$ ).

**Tabla 8. Datos clínicos e inmunológicos en el total de pacientes con IDCV.**

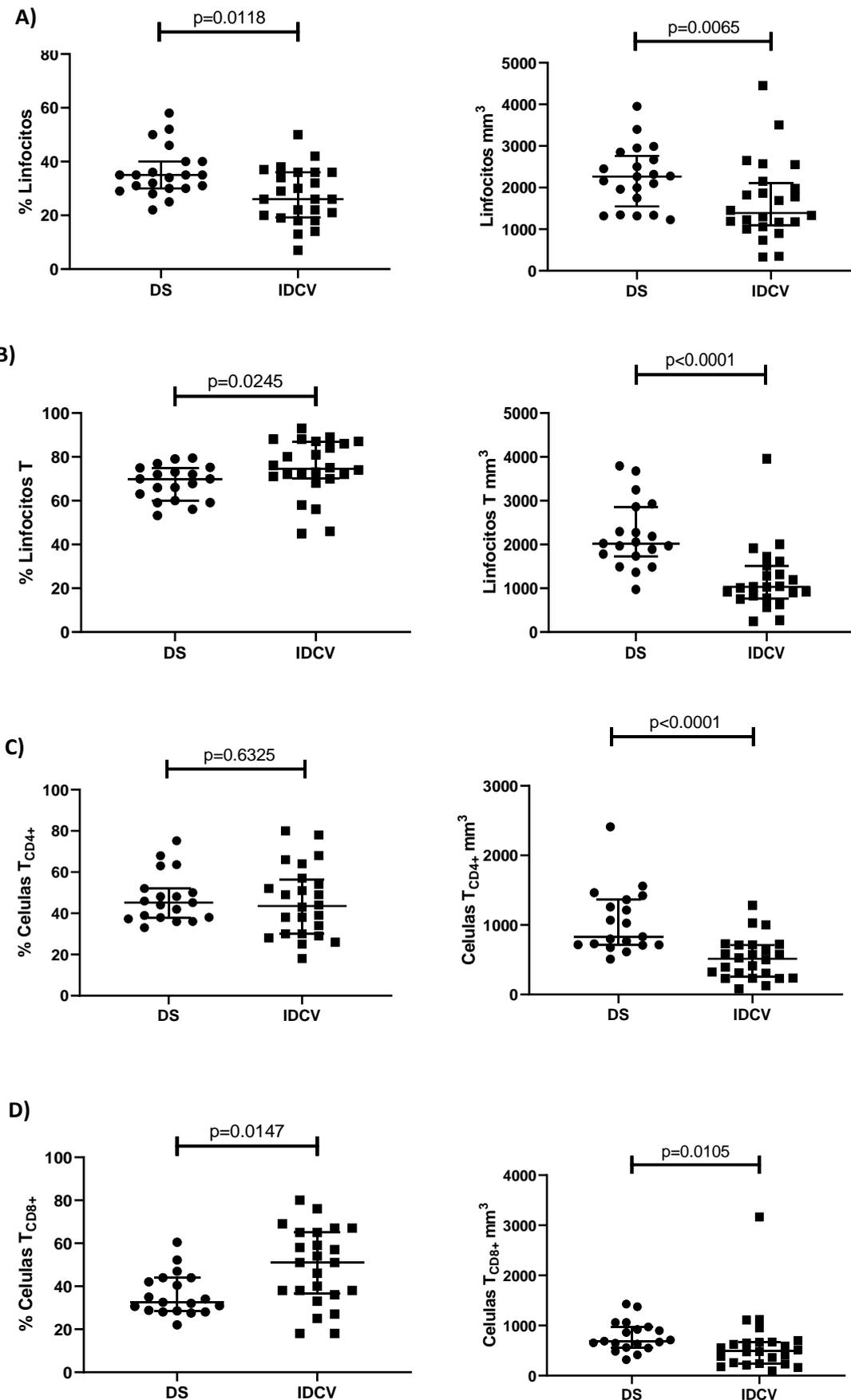
No. Paciente IDCV	Edad actual	Genero	Edad inicio síntomas	Edad al diagnóstico	Años transcurridos para el diagnóstico	Años con diagnóstico	Sinusitis	Neumonía	Bronquiectasias	Esplenomegalia	Linfadenopatías	Granulomas	Enteropatías	Enfermedades autoinmunes	cáncer	Puntaje de severidad	IgG	IgA	IgM
1	38	F	ND	ND	ND	ND	1	0	1	0	0	0	1	1	0	9	600	31	76
2	47	M	7	40	33	7	1	0	0	0	1	0	0	1	0	5	150	3	20
3	13	F	10	13	3	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	3	246	15.8	63.3
4	17	F	ND	14	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	526	83.6	79.4
5	49	F	39	45	6	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	75.8	88	21
6	57	F	10	55	45	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	7	301	0	4
7	56	F	15	50	35	6	0	1	0	0	1	0	1	0	0	5	301	1	5
8	32	F	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	568	4	173
9	65	F	ND	ND	ND	ND	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	487	30	15
10	17	F	ND	ND	ND	ND	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	530	100	183
11	21	M	0.5	0.75	0.25	20.25	1	1	1	1	0	0	0	0	0	7	501	1	1
12	43	F	27	37	10	6	1	1	1	1	1	0	1	1	0	16	6.1	1	5
13	16	M	ND	ND	ND	ND	1	0	0	0	0	0	1	1	0	6	356	1	2
14	21	F	5	13	8	8	1	1	0	1	1	0	0	1	0	8	252	1	1
15	36	F	7	30	23	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	85	1	3
16	27	F	23	27	4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3.3	1.8	40.9
17	19	M	15	17	2	2	1	0	1	1	1	1	0	1	0	10	281	2.3	17
18	37	F	20	30	10	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	33.3	6.7	62.3
19	47	M	ND	46	ND	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	4	473	10	47
20	20	F	4	17	13	3	1	0	1	0	1	0	1	0	0	5	171	1	1
21	19	F	7	14	7	5	1	1	1	0	1	0	1	0	0	5	183	1	9
22	62	M	ND	ND	ND	ND	0	1	1	0	0	0	1	0	0	6	373	25	25
23	67	M	31	38	7	29	1	1	0	0	0	0	0	0	0	4	228	6.6	550
24	16	F	9	16	7	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	4	287	22	36

IDCV: Inmunodeficiencia común variable; M=Masculino; F=Femenino; ND: No disponible; Valor de ausencia: 0 y valor de presencia: 1.

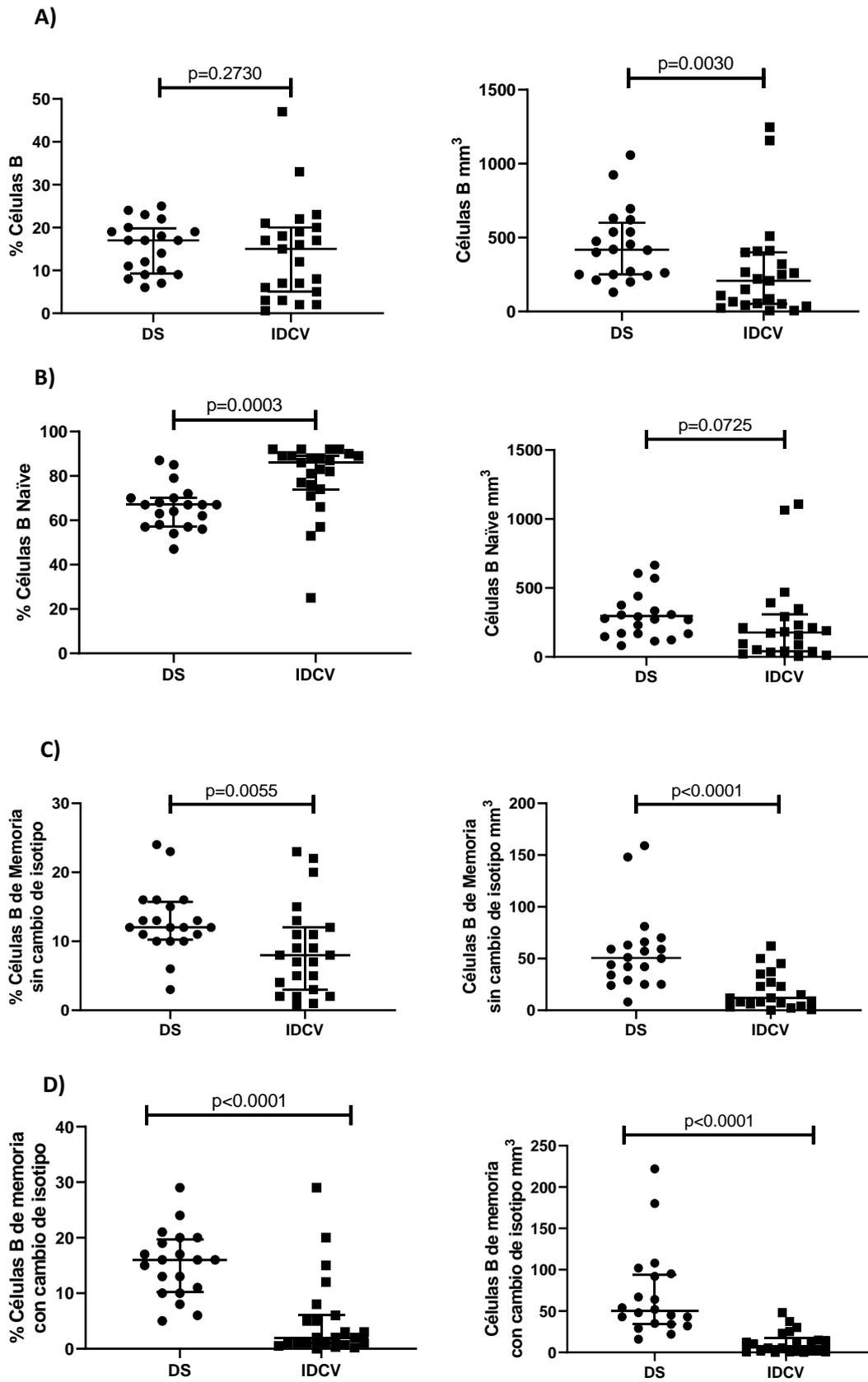
**Tabla 9. Composición por edad y genero de sujetos sanos.**

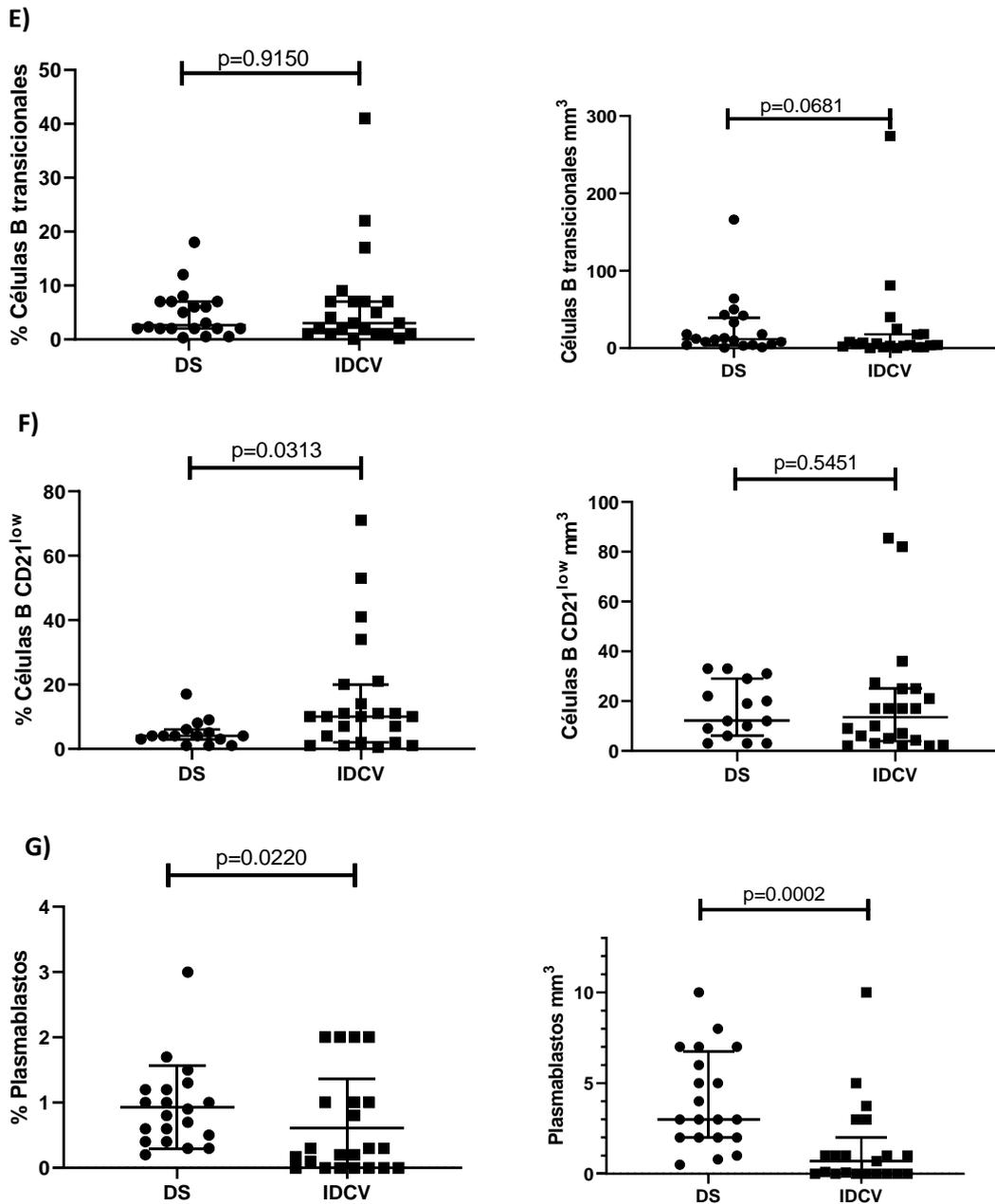
No. Testigo	Edad	Genero
1	5	M
2	5	M
3	5	M
4	4	M
5	5	F
6	9	F
7	6	M
8	9	M
9	9	F
10	6	F
11	11	M
12	12	M
13	12	F
14	15	M
15	17	M
16	36	F
17	33	F
18	40	F
19	38	F
20	36	F

M=Masculino; F=Femenino.



**Figura 6. Distribución de subpoblaciones de linfocitos T en muestras de sangre periférica de pacientes IDCV comparada con donadores sanos.** A) frecuencias (%) y cuentas absolutas ( $\text{mm}^3$ ) de linfocitos totales a partir de PBMC's. B) frecuencias (%) y cuentas absolutas ( $\text{mm}^3$ ) de linfocitos T  $\text{CD}3^+$  a partir de PBMC's. C) frecuencias (%) y cuentas absolutas ( $\text{mm}^3$ ) de linfocitos T  $\text{CD}4^+$  a partir de PBMC's. D) frecuencias (%) y cuentas absolutas ( $\text{mm}^3$ ) de linfocitos T  $\text{CD}8^+$  a partir de PBMC's. DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.





**Figura 7. Distribución de subpoblaciones de linfocitos B en muestras de sangre periférica de pacientes IDCV comparada con donadores sanos.** A) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) de linfocitos B totales a partir de PBMC's. B) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) de linfocitos B CD27<sup>-</sup> a partir de PBMC's. C) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) de linfocitos B CD27<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> a partir de PBMC's. D) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) de linfocitos B CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> a partir de PBMC's. E) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) de linfocitos B transicionales a partir de PBMC's. F) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) de linfocitos B CD21<sup>low</sup> a partir de PBMC's. G) frecuencias (%) y cuentas absolutas (mm<sup>3</sup>) plasmablastos a partir de PBMC's. DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

**Tabla 10. Frecuencias de linfocitos T en el total de donadores sanos.**

No. Sujeto	Linfocitos %	Linfocitos mm3	CD3 %	CD3 mm3	CD4 %	CD4 mm3	CD8 %	CD8 mm3	
1	58	6320	60	3792	63,6075949	2412	28,0063291	1062	
2	40	3276	69,993895	2293	67,9895334	1559	27,5185347	631	
3	40	1650	59,030303	974	63,0390144	614	32,5462012	317	
4	36	5796	56,0041408	3246	41,9901417	1363	43,9926063	1428	
5	31	2556	76,9953052	1968	36,0264228	709	28,5060976	561	
6	35	3621	79,0113228	2861	44,0055925	1259	34,0090877	973	
7	31	2479	69,9878983	1735	45,9942363	798	28,0115274	486	
8	22	3312	66,0024155	2186	38,0146386	831	30,6495883	670	
9	32	2623	74,9904689	1967	38,993391	767	34,9771225	688	
10	46	2772	73,015873	2024	35,9683794	728	32,0158103	648	
11	50	5838	63,0010277	3678	33,0070691	1214	28,8200109	1060	
12	35	4067	71,9940988	2928	50	1464	46,9945355	1376	
13	34	2475	72	1782	37,9910213	677	30,976431	552	
14	25	2862	65,9993012	1888.9	75,1972047	1420.4	22,0075176	415.7	
15	52	3030	67,7986799	2054.3	52,0031154	1068.3	42,0094436	863	
16	35	1718.4	79,4983706	1366.1	37,295952	509.5	52,1996926	713.1	
17	29	2800	53,1785714	1489	48,0859637	716	43,9220954	654	
18	35	3845.4	59,0991834	2272.6	45,1993312	1027.2	40,499868	920.4	
19	30	1973.4	75,1798926	1483.6	48,0924778	713.5	60,4610407	897	
20	30								
	<b>36,63</b>	<b>3317</b>	<b>68,04</b>	<b>2210</b>	<b>47,50</b>	<b>1045</b>	<b>36,22</b>	<b>785,0</b>	<b>Media</b>
	<b>9,239</b>	<b>1352</b>	<b>7,888</b>	<b>769,5</b>	<b>12,01</b>	<b>462,4</b>	<b>9,870</b>	<b>300,4</b>	<b>SD</b>

**Tabla 11. Frecuencias de linfocitos T en el total de pacientes IDCV.**

No. Paciente IDCV	Linfocitos %	Linfocitos mm3	CD3 %	CD3 mm3	CD4 %	CD4 mm3	CD8 %	CD8 mm3	
1	19	1225.5	74	906.87	26	235.7862	69	625.7403	
2	21	2152.5	93	2001.825	64	1281.168	33	660.60225	
3	22	737	86	633.82	49	310.5718	38	240.8516	
4	29	1450	72	1044	68	710	25	261	
5	37	1332	58	773	30	232	67	517	
6	36	1980	87	1723	29	500	65	1120	
7	26	1690	76	1284	80	1028	18	231	
8	38	1824	72	1313	44	578	51	670	
9	36	1008	56	565	54	305	38	215	
10	20	1870	81	1515	66	1000	27	409	
11	50	4450	89	3961	18	713	80	3169	
12	30	2550	75	1912	38	728	58	1109	
13	14	896	84	753	43	324	51	384	
14	22	1177	88	1035	38	394	57	590	
15	26	2652	45	1193.4	49	584.766	40	477.36	
16	13	331.5	73	241.995	52	125.8374	38	91.9581	
17	36	2574	72	1007	57	574	36	363	
18	7	349	80	272	30	82	65	177	
19	32	1776	68	12108	34	410	54	652	
20	18	1062	87	924	78	721	18	166	
21	34	1190	70	833	28	233	67	558	
22	42	3507	46	1613	39	629	59	952	
23	26	1170	88	1030	51	525	46	474	
24	18	1296	71	920	25	230	76	700	
	<b>27,17</b>	<b>1677</b>	<b>74,63</b>	<b>1648</b>	<b>45,42</b>	<b>518,9</b>	<b>49,00</b>	<b>617,2</b>	<b>Media</b>
	<b>10,29</b>	<b>957,8</b>	<b>13,05</b>	<b>2349</b>	<b>17,10</b>	<b>300,8</b>	<b>17,92</b>	<b>611,5</b>	<b>SD</b>

**Tabla 12. Frecuencias y números absolutos de subpoblaciones de células B de donadores sanos.**

No. sujetos	LINFOCIT O B %	LINFOCIT O B mm3	CELULA B NAIVE %	CELULA B NAIVE mm3	CELULA B MEMORIA SIN CAMBIO DE ISOTIPO %	CELULAS B MEMORIA SIN CAMBIO ISOTIPO mm3	CELULA B MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO %	CELULAS B MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO mm3	CELULA B MEMORIA CON CAMBIO DE ISOTIPO %	CELULAS B TRANSICI ONALES mm3	CELULAS B TRANSICI ONALES mm3	21 LOW %	21 LOW mm3	PLASMAB LASTOS %	PLASMAB LASTOS mm3
1	23	924	72	665	16	148	10	92	18	166	1	3	0.8	7	
2	20	538	57	307	13	70	20	108	2	11	3	19	0.9	5	
3	25	1058	54	571	15	159	21	222	6	64	6	9	0.7	7	
4	10	454	67	304	13	59	10	45	2.3	10	5	20	1	5	
5	14	476	79	376	12	57	6	29	7	33	1	3	1.3	6	
6	17	415	67	278	16	66	13	54	12	50	4	29	0.5	2	
7	18	538	62	334	11	59	19	102	8	43	4	33	1.5	8	
8	9	420	64	269	12	50	16	67	2	8	8	33	0.6	3	
9	11	243	70	170	12	29	13	32	0.3	0.7	17	31	3	7	
10	17	621	47	292	13	81	29	180	2	12	4	12	0.4	3	
11	22	695	87	605	6	42	5	35	6	42	4	12	0.3	2	
12	12	262	56	147	16	42	20	52	5	13	9	22	0.6	2	
13	6	200	57	114	12	24	24	48	0.5	1	3	6	0.4	0.8	
14	17	270	85	230	3	8	8	22	2	5	4	10	0.2	0.5	
15	8	213	58	123	24	51	16	34	2	4			0.3	1	
16	19	251	67	168	10	25	17	43	7	18			1.2	3	
17	9	630	70	441	10	63	15	95	0.5	3			1.7	10	
18	7	130	63	82	23	34	11	16	3	4			1	2	
19	24	401	68	273	11	44	16	64	2	8			1	4	
20	19	251	67	168	10	25	17	43	7	18			1.2	3	
	<b>15,35</b>	<b>449,5</b>	<b>65,85</b>	<b>295,9</b>	<b>12,90</b>	<b>56,80</b>	<b>15,30</b>	<b>69,15</b>	<b>4,730</b>	<b>25,69</b>	<b>5,214</b>	<b>17,29</b>	<b>0,9300</b>	<b>4,065</b>	Media
	<b>6,011</b>	<b>245,8</b>	<b>10,02</b>	<b>165,7</b>	<b>4,811</b>	<b>37,77</b>	<b>6,036</b>	<b>52,73</b>	<b>4,397</b>	<b>37,72</b>	<b>4,061</b>	<b>10,97</b>	<b>0,6433</b>	<b>2,679</b>	SD

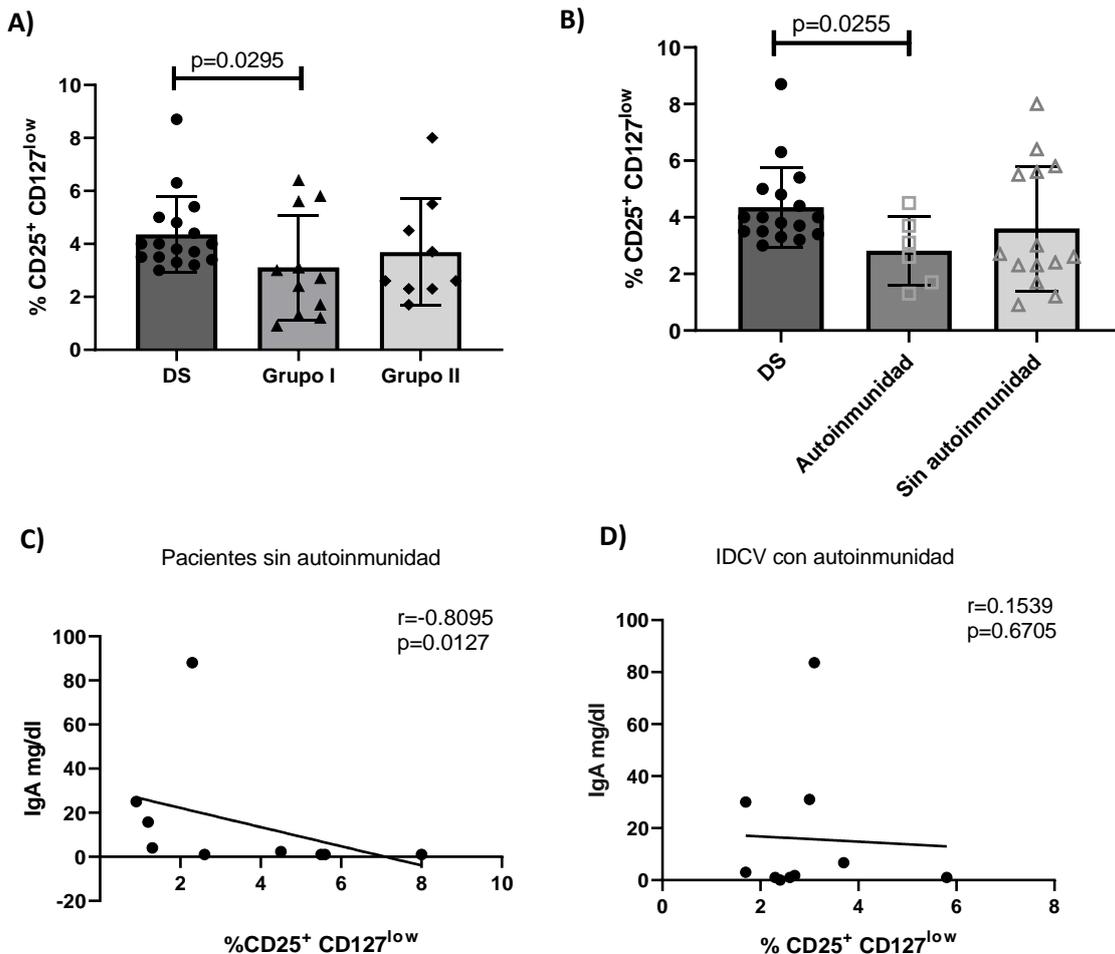
**Tabla 13. Frecuencias y números absolutos de subpoblaciones de células B de pacientes con IDCV.**

No. Paciente IDCV	LINFOCIT O B %	LINFOCIT O B mm3	CELULA B NAIVE %	CELULA B NAIVE mm3	CELULA B MEMORI A SIN CAMBIO DE ISOTIPO %	CELULAS B MEMORA SIN CAMBIO ISOTIPO mm3	CELULA B MEMORI A CON CAMBIO DE ISOTIPO %	CELULA B MEMORI A CON CAMBIO DE ISOTIPO mm3	CELULAS B TRANSICI ONALES %	CELULAS B TRANSICI ONALES mm3	21 LOW %	21 LOW mm3	PLASMA B LASTOS %	PLASMA B LASTOS mm3	
1	17	208.335	90	33	7	3	1	1	2	1	21	7	2	1	
2	2	43.05	88	NSD	7		0		17	NSD	11	NSD	0		
3	7	51.59	92	1064	2	23	2	23	7	81	1	10	1	10	
4	18	261	92	469	3	15	2	10	5	25	7	36	0.3	0	
5	5	67	86	230	2	6	5	14	0.2	1	1	3	1	3	
6	nsd	nsd	92	157	4	7	1	2	4	7	10	17	0.2	0	
7	19	321	88	393	15		3	13	9	40	1	5	0.2	1	
8	22	401	66	212	11	35	15	48	2	6	0.5	2	0	0	
9	15	151	89	351	9	37	0.7	12	1	4	4	2	0.1	0.1	
10	3	56	82	20	1	2	1	2	NSR	NSR	71	17	NSR	NSR	
11	6	267	77	52	12	8	8	5	7	5	14	9	0	0	
12	20	510	81	211	9	23	5	13	7	18	7	17	0	0	
13	12	108	53	3.5139	8	0.5304	12	0.7956	1	0.0663	34	2.2542	1	0.0663	
14	0.6	7	92	39.606	0.7	0.30135	0.3	0.12915	41	17.6505	10	4.305	0	0	
15	47	1246.44	87	191	2	4	1	2	1	2	11	21	0.3	1	
16	2	6.63	89	96	8	9	0.2	0	3	3	2	2	0.8	1	
17	16	412	74	181	20	50	2	5	3	8	10	25	2	5	
18	7	24	76	43	22	12	1	1	1	1	10	6	2	1	
19	23	408	57	86	5	8	20	30	2	3	11	17	2	3	
20	8	85	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	
21	21	250	71	293	11	45	6	25	1	4	20	82	0.17	0.7	
22	33	1157	25	12.8975	23	11.8657	29	14.9611	7	3.6113	53	27.3427	0	0	
23	3	35	83	172.91805	13	27.08355	0.5	1.041675	0.06	0.125001	41	85.41735	0	0	
24	17	220	89	1109.3316	5	62.322	3	37.3932	22	274.2168	2	24.9288	0.3	3.73932	
	14,07	273,7	79,09	246,4	8,683	18,53	5,161	11,83	6,512	24,03	15,33	19,19	0,6077	1,457	Media
	11,15	328,8	16,16	300,9	6,521	17,91	7,334	13,35	9,447	60,30	18,10	23,03	0,7529	2,428	SD

Los datos individuales pueden observarse en la tabla 12 y 13 para los pacientes IDCV y sujetos sanos, respectivamente.

### 3.2. Distribución de linfocitos T reguladoras en pacientes con IDCV clasificados por grupos respecto a sujetos sanos.

El análisis de frecuencias de células T reguladoras (Treg) mostrada en la figura 8, definidas por la presencia de CD25 y ausencia de CD127 a partir de células T CD4<sup>+</sup> en los pacientes con IDCV clasificados por los niveles de células B de memoria con cambio de isotipo, indica que aquellos dentro del grupo I presentan menores porcentajes de linfocitos Treg respecto a los sujetos sanos ( $p=0.0295$ ) (figura 8A). Este comportamiento se comparte cuando la clasificación de los pacientes con IDCV son clasificados en el contexto de manifestaciones autoinmunes ( $p=0.0255$ ) comparado con sujetos control (Figura 8B).



**Figura 8. Distribución de frecuencias de células T reguladoras en muestras de sangre periférica de pacientes IDCV comparada con donadores sanos** A) Comparación de frecuencias de células Treg a partir de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes del grupo I y II, respecto a DS. B) Comparación de frecuencias de células Treg a partir de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes con IDCV con y sin autoinmunidad, respecto a DS. C) Correlación de frecuencias de células Treg y valores séricos de inmunoglobulina A en pacientes con IDCV con autoinmunidad. D) Correlación de frecuencias de células Treg y valores séricos de inmunoglobulina A en pacientes con IDCV sin autoinmunidad. DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

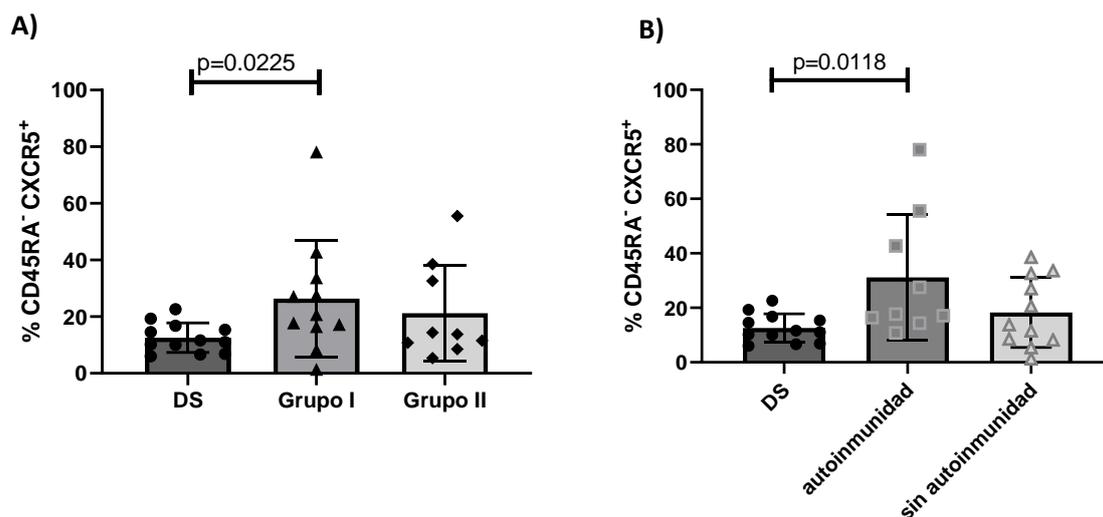
Considerando las características clínicas e inmunológicas de los pacientes IDCV con autoinmunidad y en aquellos sin autoinmunidad para asociarse a los niveles de células Treg, se observa únicamente una correlación negativa entre esta población celular y los niveles de IgA sérica en los pacientes sin autoinmunidad ( $p=0.0127$ ) (Figura 8C). Los pacientes con autoinmunidad no se observa este fenómeno (Figura 8D). Los datos individuales pueden observarse en la tabla 14 para los pacientes IDCV y sujetos sanos.

**Tabla 14. Frecuencias de células reguladoras en los diferentes grupos analizados.**

No. de sujeto	DS	IDCV	IDCV Grupo I	IDCV grupo II	IDCV con autoinmunidad	IDCV sin autoinmunidad	
1	4	3.7	2.4	3.7	3.7	8	
2	3.5	8	1.2	8	2.6	2.6	
3	3.4	2.6	5.8	2.6	4.5	2.3	
4	3	2.6	0.9	2.6	1.3	5.5	
5	3.3	2.3	3	2.3	1.7	1.7	
6	3.5	5.5	1.3	5.5	3.1	2.3	
7	3.7	1.7	1.7	1.7		2.4	
8	4.4	2.3	5.6	2.3		1.2	
9	5.4	4.5	6.4	4.5		5.8	
10	4	2.4	2.7			0.9	
11	3.2	1.2	3.1			3	
12	3.8	5.8				5.6	
13	8.7	0.9				6.4	
14	6.3	3				2.7	
15	4	1.3					
16	5	1.7					
17	4.8	5.6					
18		6.4					
19		2.7					
20		3.1					
	<b>4.353</b>	<b>3.365</b>	<b>3.1</b>	<b>3.689</b>	<b>2.817</b>	<b>3.6</b>	<b>Media</b>
	<b>1.417</b>	<b>1.962</b>	<b>1.968</b>	<b>2.022</b>	<b>1.207</b>	<b>2.207</b>	<b>SD</b>

### 3.3. Distribución de linfocitos T Foliculares en pacientes con IDCV clasificados por grupos respecto a sujetos sanos.

En contraste con las células Treg, las células T foliculares (Thf) se encuentran incrementadas en el grupo I de los pacientes con IDCV respecto a los DS ( $p=0.0225$ ) (Figura 9A). Analizando las frecuencias de esta población celular en los pacientes con IDCV con autoinmunidad o con ausencia de sintomatología de esta, se demuestra el aumento de Thf en los pacientes IDCV con autoinmunidad ( $p=0.0118$ ) (Figura 9B). Los datos individuales pueden observarse en la tabla 15 para los pacientes IDCV y sujetos sanos.



**Figura 9. Distribución de frecuencias de células T foliculares (Thf) en muestras de sangre periférica de pacientes IDCV comparada con donadores sanos.** A) Comparación de frecuencias de células Thf a partir de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes del grupo I y II, respecto a DS. B) Comparación de frecuencias de células Thf a partir de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes con IDCV con y sin autoinmunidad, respecto a DS. DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

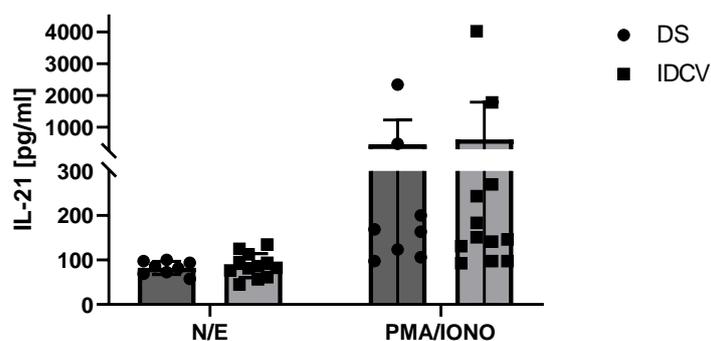
**Tabla 15. Frecuencias de células foliculares en los diferentes grupos analizados.**

No. de sujeto	DS	IDCV	IDCV Grupo I	IDCV Grupo II	
1	10.2	27.5	16.4	10.8	
2	32.6	78	42.7	32.6	
3	10.8	16.4	1.28	55.5	
4	42.7	42.7	33.6	11.5	
5	5.39	1.28	20.6	8.5	
6	11.5	33.6	8.18	5.39	
7	20.6	10.8	78	14.4	
8	17.1	32.6	17.1	13.8	
9	14.5	55.5	17.7	38.5	
10	11	20.6	27		
11	33.6	8.18	27.5		
12	55.5	78			
13	10.2	11.5			
14	6.9	8.5			
15	14.5	5.39			
16	11	17.1			
17	10				
18	6.62				
19	11.6				
20	15.4				
21	16.8				
22	19.3				
23	22.6				
24	6.03				
	<b>12.44</b>	<b>26.33</b>	<b>26.37</b>	<b>21.22</b>	<b>Media</b>
	<b>4.729</b>	<b>19.74</b>	<b>20.59</b>	<b>17.03</b>	<b>SD</b>

### 3.4. Secreción de IL-21 posterior a la estimulación con PMA/IONOMICINA de PBMC's de pacientes con IDCV.

Se evaluó la secreción de IL-21 por parte de las PBMC's de los pacientes con IDCV bajo la estimulación con PMA/IONOMICINA para verificar como las variables en las proporciones de células en los pacientes con IDCV repercuten en el fenómeno. En la

figura 10 se muestra la cuantificación de la IL-21 de los sobrenadantes de los cultivos. Esta no arroja diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de los pacientes con IDCV comparado con los DS estimuladas con PMA/IONOMICINA ( $p=0.6551$ ). Los datos individuales pueden observarse en la tabla 16 para los pacientes IDCV y sujetos sanos.



**Figura 10. Concentración de IL-21 en sobrenadante de cultivo de PBMC's de pacientes IDCV comparada con donadores sanos estimulados y no estimulados con PMA/IONOMICINA.** Comparación de niveles de IL-21 secretados por PBMC's estimuladas con 100 ng/ml PMA + 1µg/ml Ionomicina durante 24 horas a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>. DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

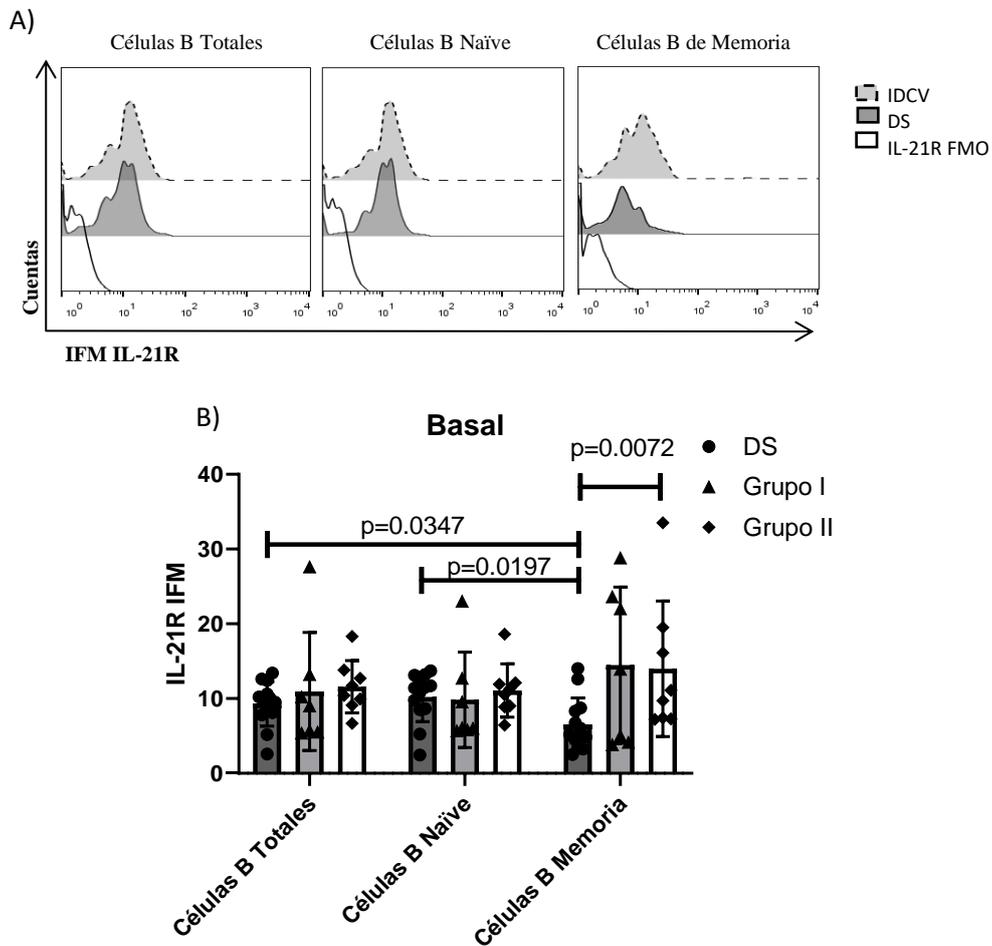
**Tabla 16. Niveles de IL-21 en sobrenadante de cultivo de PBMC's posterior al estímulo con PMA/IONOMICINA.**

No. de sujeto	DS N/E	DS PMA/IONO	IDCV N/E	IDCV PMA/IONO	
1	81.25	92.5	95	146.25	
2	100	106.25	93.75	151.25	
3	93.75	168.75	61.25	97.5	
4	97.5	97.5	112.5	243.75	
5	57.5	480	56.25	141.25	
6	72.5	2341.25	135	183.75	
7	86.25	123.75	125	4018.75	
8	81.25	163.75	45	97.5	
9	68.75	200	82.5	270	
10			76.25	131.25	
11			86.25	1776.25	
	<b>82.08</b>	<b>419.3</b>	<b>88.07</b>	<b>659.8</b>	<b>Media</b>
	<b>14.09</b>	<b>730.5</b>	<b>28.29</b>	<b>1216</b>	<b>SD</b>

### 3.5. Expresión del receptor de IL-21 en subpoblaciones de células B de pacientes con IDCV.

Una vez analizado los factores extrínsecos a las células B, se procedió a la evaluación del receptor de IL-21 (IL-21R) en las diferentes subpoblaciones de células B (Figura 11B). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la IFM de IL-21R presente en las células B de memoria en los pacientes con IDCV del grupo II comparado con DS ( $p=0.0072$ ). Sin embargo, entre ambos grupos de pacientes no existen diferencias en la expresión ( $p=0.8665$ ). La expresión del receptor de IL-21 presenta significancia

estadística al comparar las células B naïve y de memoria en los DS ( $p=0.0197$ ), siendo mayor en las células naïve. Esta diferencia, no solo no ocurre en los pacientes tanto del grupo I o II ( $p=0.9015$  y  $p=0.9591$ ), sino que algunos de los pacientes parecen invertir este comportamiento. Este fenómeno se puede observar mejor en la figura 11A donde se muestra un paciente representativo del grupo II con una mayor expresión del receptor en las células B de memoria. Los datos individuales pueden observarse en la tabla 17 para los pacientes IDCV clasificados en grupo I y II, y sujetos sanos.



**Figura 11. IFM de la expresión del receptor de IL-21 en subpoblaciones de células B de PBMC's de pacientes IDCV del grupo I y II comparada con donadores sanos. A) Histogramas de IFM de IL-21R representativos de paciente IDCV del grupo II y DS en células B naïve y de memoria total. Se muestra control FMO como control de ausencia de expresión. B) comparación de IFM de IL-21R expresado en subpoblaciones de células B de pacientes IDCV del grupo I y II, respecto a DS. DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable; FMO= fluorescencia menos uno.**

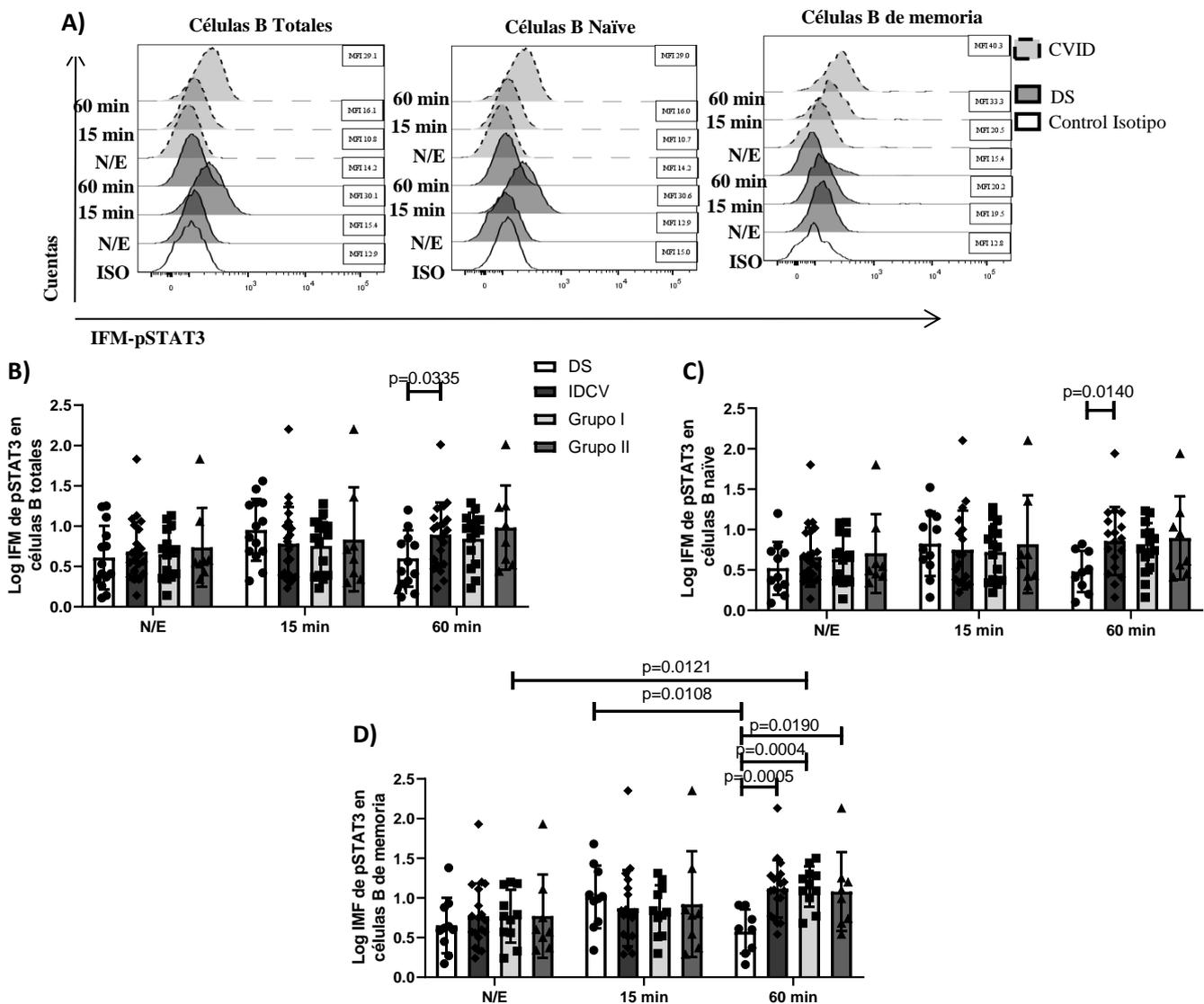
**Tabla 17. Valores de IFM del receptor de IL-21 en subpoblaciones de células B en los grupos analizados.**

No. de sujeto	DS B total	DS B naïve	DS B memoria	Grupo I B total	Grupo I B Naïve	Grupo I B memoria	Grupo II B total	Grupo II B naïve	Grupo II B memoria	
1	12.4	13.7	8.76	13.2	12.7	23.6	13.8	11.3	33.5	
2	2.59	2.46	2.52	5.37	5.81	4.16	18.3	18.6	16.1	
3	9.43	11.7	4.86	9.03	5.69	22	12.7	8.87	19.5	
4	10.1	13.2	5.18	5.52	6.03	5.02	10.4	12.1	7.23	
5	8.96	9.79	3.26	27.6	23	28.8	9.12	9.03	9.71	
6	10.2	11.4	4.49	5.73	6.07	3.81	9.96	10.5	7.43	
7	7.82	8.52	6.02	10.2	9.54	13.9	6.68	6.45	7.29	
8	8.13	8.66	3.36				11.7	11.9	11.1	
9	9.51	10.8	6.75							
10	13.4	13.12	14							
11	12.6	12.6	12.6							
12	5.17	5.26	4.92							
13	10.6	11.5	8.32							
	<b>9.301</b>	<b>10.21</b>	<b>6.542</b>	<b>10.95</b>	<b>9.834</b>	<b>14.47</b>	<b>11.58</b>	<b>11.09</b>	<b>13.98</b>	<b>Media</b>
	<b>2.976</b>	<b>3.303</b>	<b>3.527</b>	<b>7.899</b>	<b>6.372</b>	<b>10.45</b>	<b>3.494</b>	<b>3.569</b>	<b>9.069</b>	<b>SD</b>

### 3.6. Fosforilación de STAT3 basal, 15 min, 60 min posterior a la estimulación con IL-21 en los subgrupos de pacientes con IDCV.

#### 3.6.1. Estimulación en PBMC's.

Los valores de IFM de pSTAT3 fueron transformados a logaritmo base 10 para realizar la comparación entre grupos (Figura 12). La comparación de la expresión entre el total de pacientes con IDCV respecto al grupo control, indica mayores niveles de fosforilación de STAT3 a los 60 min posterior a la estimulación con IL-21 tanto en células B naïve (figura 12C) y memoria (figura 12D) de los pacientes ( $p=0.0140$  y  $p=0.0005$ , respectivamente). La tendencia desaparece en las células B naïve cuando los pacientes fueron divididos en el grupo I y II. Por otro lado, la expresión de pSTAT3 a los 60 min en las células B de memoria (Figura 12 D) se observa en mayor nivel en los pacientes IDCV, independiente del grupo al que pertenecen respecto al grupo control ( $p=0.0004$  vs grupo I y  $p=0.0190$  vs grupo II). Mientras las células B de memoria de los DS expresan pSTAT3 una menor cantidad a los 60 min comparado con la expresión a los 15 min ( $p=0.0108$ ), las células B de memoria del grupo I expresan mayor cantidad de pSTAT3 a los 60 min respecto a la condición sin estímulo ( $p=0.0121$ ). En la figura 12A se muestran los histogramas de IFM de pSTAT3, posterior a la estimulación con IL-21, representativos de paciente IDCV del grupo I y DS en células B naïve y de memoria. Se muestra expresión de control de isotipo y de células sin estimular como controles negativos. Los datos individuales en células B totales pueden observarse en la tabla 18, en células B naïve en tabla 19 y en células B de memoria en tabla 20 para el total de pacientes IDCV y clasificados en grupo I y II, así como de DS.



**Figura 12. Log IFM de la fosforilación de STAT3 posterior a la estimulación con IL-21 en subpoblaciones de células B de PBMC's de pacientes IDCV del grupo I y II comparada con donadores sanos.** A) Histogramas de IFM de pSTAT3, posterior a la estimulación con IL-21, representativos de paciente IDCV del grupo I y DS en células B naïve y de memoria total. Se muestra expresión de control de isotipo y de células sin estimular como controles negativos. B) Comparación de log IFM de pSTAT3 expresado en células B totales del total de pacientes IDCV, así como divididos en grupo I y II, respecto a DS a los 15 min y 60 min posterior al estímulo con IL-21. C) Comparación de log IFM de pSTAT3 expresado en células B naïve del total de pacientes IDCV, así como divididos en grupo I y II, respecto a DS a los 15 min y 60 min posterior al estímulo con IL-21. D) Comparación de log IFM de pSTAT3 expresado en células B de memoria del total de pacientes IDCV, así como divididos en grupo I y II, respecto a DS, a los 15 min y 60 min posterior al estímulo con IL-21. N/E= No estimulado; DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

**Tabla 18. Log IFM de pSTAT3 en células B totales posterior al estímulo de PBMC's con IL-21 en los grupos analizados.**

No. de sujeto	DS N/E	DS 15 min	DS 60 min	IDCV N/E	IDCV1 5 min	IDCV6 0 min	Grupo I N/E	Grupo I 15 min	Grupo I 60 min	Grupo II N/E	Grupo II 15 min	Grupo II 60 min	
1	0.41	1.26	0.56	0.53	0.34	0.8	0.64	0.81	0.7	0.53	0.34	0.8	
2	0.26	0.69		0.64	0.81	0.7	0.67	1.16	0.47	0.58	0.71	0.59	
3	0.75	0.86	0.76	0.67	1.16	0.47	0.78	0.85	1.08	0.34	0.59	0.44	
4	0.53	1	0.78	0.78	0.85	1.08	0.34	0.37	0.53	0.55	0.75	0.52	
5	0.74	1.06	0.44	0.58	0.71	0.59	0.45	0.34	0.32	1.06	1.36	1.25	
6	0.11	0.32	0.12	0.34	0.37	0.53	0.96	1	1.1	0.56	0.3	1.01	
7	0.14	0.42	0.16	0.45	0.34	0.32	0.72	1.01	1.03	1.83	2.2	2.01	
8	1.11	1.29	1.2	0.34	0.59	0.44	1.13	1.28	0.97	0.43	0.42	1.23	
9	1.24	1.46	1	0.96	1	1.1	1.09	1.05	1				
10	0.41	0.79		0.72	1.01	1.03	0.14	0.23	0.23				
11	0.34	0.63	0.32	1.13	1.28	0.97	0.37	0.57	0.91				
12	0.88	1.29	0.85	1.09	1.05	1	0.35	0.39	1.29				
13	0.37	0.69	0.41	0.55	0.75	0.52	1.01	0.97	0.85				
14	1.25	1.56		0.14	0.23	0.23	0.71	0.89	0.95				
15				0.37	0.57	0.91	0.41	0.39	1.22				
16				0.35	0.39	1.29							
17				1.06	1.36	1.25							
18				1.01	0.97	0.85							
19				0.56	0.3	1.01							
20				1.83	2.2	2.01							
21				0.71	0.89	0.95							
22				0.43	0.42	1.23							
23				0.41	0.39	1.22							
	<b>0.61</b>	<b>0.9514</b>	<b>0.6</b>	<b>0.6804</b>	<b>0.7817</b>	<b>0.8913</b>	<b>0.6513</b>	<b>0.754</b>	<b>0.8433</b>	<b>0.735</b>	<b>0.8338</b>	<b>0.9813</b>	<b>Media</b>
	<b>0.3899</b>	<b>0.3846</b>	<b>0.3473</b>	<b>0.3704</b>	<b>0.4564</b>	<b>0.3958</b>	<b>0.3045</b>	<b>0.3407</b>	<b>0.3232</b>	<b>0.4906</b>	<b>0.6464</b>	<b>0.5189</b>	<b>SD</b>

**Tabla 19. Log IFM de pSTAT3 en células B naïve posterior al estímulo de PBMC's con IL-21 en los grupos analizados.**

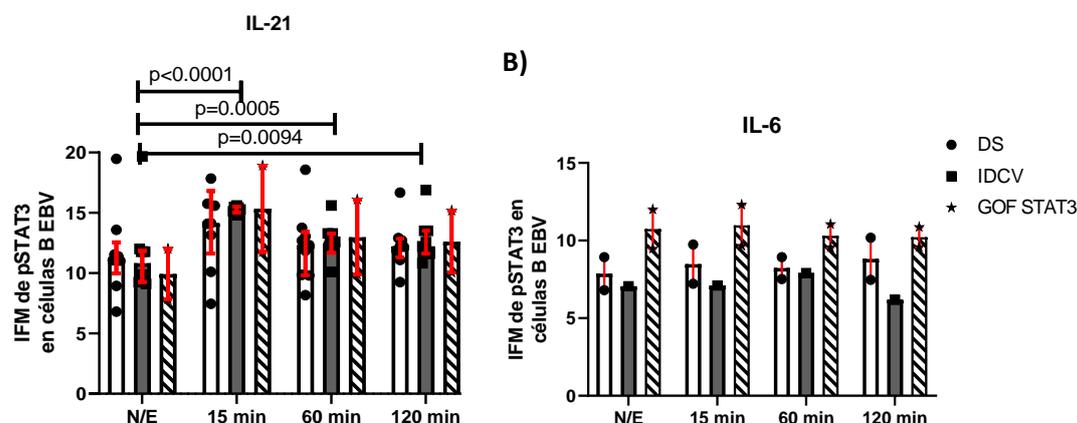
No. de sujeto	DS N/E	DS 15 min	DS 60 min	IDCV N/E	IDCV1 5 min	IDCV6 0 min	Grupo I N/E	Grupo I 15 min	Grupo I 60 min	Grupo II N/E	Grupo II 15 min	Grupo II 60 min	
1	0.37	1.16	0.51	0.49	0.37	0.53	0.34	0.37	0.53	0.42	0.69	0.45	
2	0.73	0.75	0.73	0.62	0.34	0.32	0.45	0.34	0.32	1.02	1.35	1.21	
3	0.64	1	0.82	0.67	0.57	0.41	0.96	1	1.1	0.54	0.3	0.95	
4	0.71	1.03	0.41	0.7	1	1.1	0.68	0.69	0.66	1.8	2.1	1.94	
5	0.09	0.16	0.1	0.58	0.69	0.66	1.09	1.27	0.85	0.45	0.42	1.03	
6	0.18	0.37	0.2	0.34	1.27	0.85	1.08	1.12	0.96	0.62	0.81	0.7	
7	0.28	0.63		0.45	1.12	0.96	0.14	0.22	0.16	0.67	1.16	0.47	
8	0.32	0.56	0.31	0.34	0.69	0.45	0.36	0.51	0.74	0.7	0.78	0.95	
9	0.8	1.2	0.76	0.96	0.22	0.16	0.35	0.38	1.23				
10	0.41	0.68	0.47	0.68	0.51	0.74	0.97	0.95	0.76				
11	1.2	1.52		1.09	0.38	1.23	0.72	0.88	0.89				
12	0.49	0.43	0.61	1.08	1.35	1.21	0.38	0.32	1.21				
13	0.58	0.69	0.56	0.42	0.95	0.76							
14	0.34	0.57	0.41	0.14	0.3	0.95							
15				0.36	2.1	1.94							
16				0.35	0.88	0.89							
17				1.02	0.42	1.03							
18				0.97	0.32	1.21							
19				0.54									
20				1.8									
21				0.72									
22				0.45									
23				0.38									
	<b>0.5100</b>	<b>0.7679</b>	<b>0.4908</b>	<b>0.6587</b>	<b>0.7489</b>	<b>0.8556</b>	<b>0.6267</b>	<b>0.6708</b>	<b>0.7842</b>	<b>0.7775</b>	<b>0.9513</b>	<b>0.9625</b>	<b>Media</b>
	<b>0.2914</b>	<b>0.3707</b>	<b>0.2217</b>	<b>0.3643</b>	<b>0.4871</b>	<b>0.4186</b>	<b>0.3330</b>	<b>0.3603</b>	<b>0.3322</b>	<b>0.4533</b>	<b>0.5789</b>	<b>0.4775</b>	<b>SD</b>

**Tabla 20. Log IFM de pSTAT3 en células B de memoria posterior al estímulo de PBMC's con IL-21 en los grupos analizados.**

No. de sujeto	DS N/E	DS 15 min	DS 60 min	IDCV N/E	IDCV1 5 min	IDCV6 0 min	Grupo I N/E	Grupo I 15 min	Grupo I 60 min	Grupo II N/E	Grupo II 15 min	Grupo II 60 min	
1	0.6	1.43	0.73	0.6	0.54	0.99	0.72	0.82	0.77	0.6	0.54	0.99	
2	0.88	1.02	0.91	0.72	0.82	0.77	0.9	0.78	1.3	0.75	0.8	0.68	
3	0.62	0.96	0.61	0.9	0.78	1.3	0.77	0.84	1.44	0.34	0.78	0.54	
4	0.64	1.04	0.6	0.75	0.8	0.68	1.17	1.31	1.09	0.5	0.85	0.74	
5	0.17	0.34	0.16	0.34	0.78	0.54	1.2	1.23	1.18	1.11	1.37	1.25	
6	0.27	0.7	0.3	0.77	0.84	1.44	0.24	0.3	0.68	0.57	0.29	1.1	
7	0.59	0.99		1.17	1.31	1.09	0.57	0.75	1.28	1.93	2.35	2.13	
8	0.45	0.63	0.37	1.2	1.23	1.18	0.33	0.52	1.5	0.37	0.37	1.2	
9	0.93	1.33	0.91	0.5	0.85	0.74	1.18	1.04	1				
10	1.38	1.68		0.24	0.3	0.68	0.79	1.12	1.09				
11				0.57	0.75	1.28	0.56	0.51	1.24				
12				0.33	0.52	1.5							
13				1.11	1.37	1.25							
14				1.18	1.04	1							
15				0.57	0.29	1.1							
16				1.93	2.35	2.13							
17				0.79	1.12	1.09							
18				0.37	0.37	1.2							
19				0.56	0.51	1.24							
20													
21													
22													
23													
	<b>0,7664</b>	<b>0,6530</b>	<b>1,012</b>	<b>0,5738</b>	<b>0,7684</b>	<b>0,8721</b>	<b>1,116</b>	<b>0,7664</b>	<b>0,8382</b>	<b>1,143</b>	<b>0,7713</b>	<b>0,9188</b>	<b>Media</b>
	<b>0,3303</b>	<b>0,3474</b>	<b>0,3973</b>	<b>0,2778</b>	<b>0,4109</b>	<b>0,4811</b>	<b>0,3644</b>	<b>0,3303</b>	<b>0,3172</b>	<b>0,2548</b>	<b>0,5276</b>	<b>0,6687</b>	<b>SD</b>

### 3.6.2. Estimulación en células inmortalizadas con EBV

Debido a la limitante de células B en las muestras de los pacientes con IDCV, se procedió a la inmortalización con EBV que tiene el receptor de entrada viral en las células B. Se decidió incluir en el estudio, células inmortalizadas de 2 pacientes con ganancia de función en STAT3, de los cuales en los datos anexos se muestra la determinación de la mutación sin sentido correspondiente Asp334Val y pro715leu, paciente 1 y 2 respectivamente. Analizando las células inmortalizadas de algunos pacientes, se aprecia el incremento en la fosforilación de STAT3 posterior a la estimulación con IL-21 a los 15 min, 60 min y 120 min, comparados con la condición sin estimular ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0005$  y  $p = 0.0094$ , respectivamente). Este comportamiento es muy similar en los sujetos sanos y pacientes GOF STAT3, sin embargo, no se observan significancia estadística en los diferentes tiempos (Figura 13A). Como se muestra en la figura 13B, se observa una tendencia en las células del paciente con IDCV al incremento de fosforilación a los 60 min posterior a la estimulación con IL-6, como se indica en los estímulos con IL-21 de PBMC's (Figura 12). Las muestras de DS sufren de una ligera activación, mientras las muestras de los pacientes GOF STAT3 expresan mayores niveles de expresión de pSTAT3 incluso en condiciones basales. Los datos individuales pueden observarse en la tabla 21 estimulados con IL-21 y en la tabla 22 los estimulados con IL-6, para los pacientes IDCV, GOF STAT3 y sujetos sanos.



**Figura 13.** IFM de la fosforilación de STAT3 posterior a la estimulación con IL-21 e IL-6 en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's de pacientes IDCV comparada con donadores sanos y pacientes STAT3 GOF. A) Comparación de IFM de pSTAT3 expresado en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's de pacientes IDCV, respecto a DS y paciente STAT3 GOF a los 15 min, 60 min y 120 min posterior al estímulo con IL-21. B) Comparación de IFM de pSTAT3 expresado en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's de pacientes IDCV, respecto a DS y paciente STAT3 GOF a los 15 min, 60 min y 120 min posterior al estímulo con IL-6. N/E= No estimulado; DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

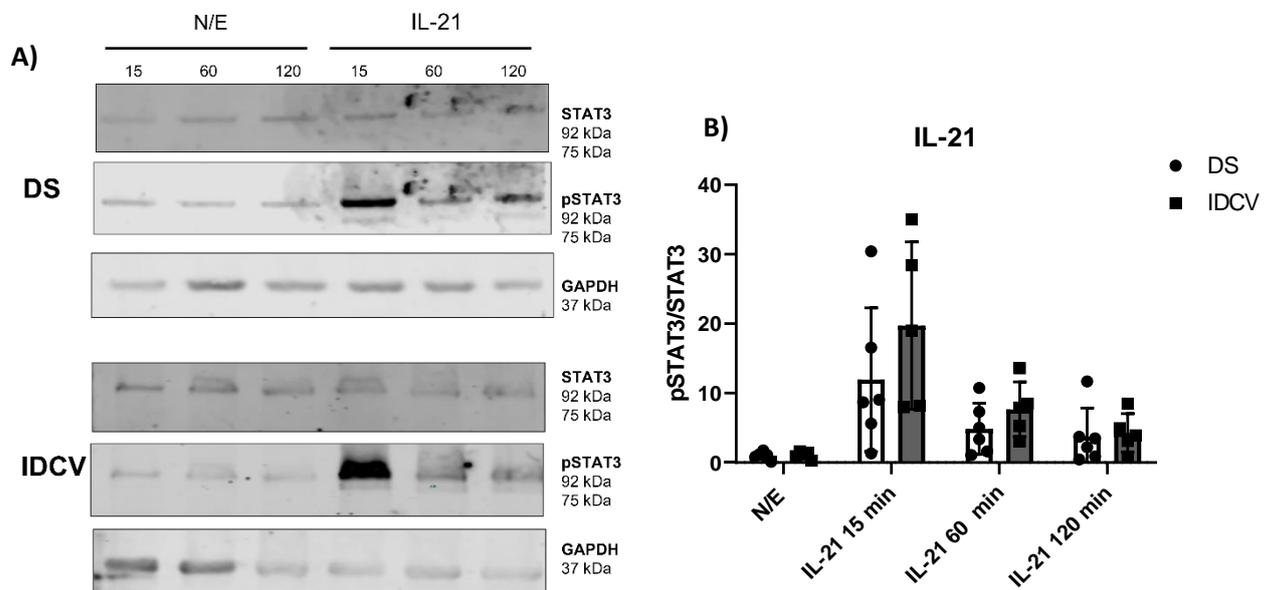
**Tabla 21.** IFM de pSTAT3 en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's posterior al estímulo con IL-21 en los grupos analizados.

No. de sujeto	DS N/E	DS 15 min	DS 60 min	DS 120 min	IDCV N/E	IDCV 15 min	IDCV 60 min	IDCV 120 min	GOF STAT3 N/S	GOF STAT3 15 min	GOF STAT3 60 min	GOF STAT3 120 min	Media SD
1	19.471 45759	21.5983 62	18.5822 399	16.6806 206	19.6699 6592	20.9012 831	15.6143 136	16.890 0133	12.0095 2398	18.9158 463	16.0884 239	15.1701 744	
2	13.593 61232	14.1398 917	12.6834 754	ND	12.0097 8135	15.6143 136	12.6679 616	12.572 0855	7.84596 981	11.7634 822	9.87493 768	10.0492 303	
3	11.076 21482	14.0890 796	13.7659 754	12.2447 834	9.11129 6434	15.2827 877	12.5881 309	10.826 7188					
4	11.095 50421	13.1640 549	11.8550 745	11.8550 745	11.7679 8666	15.4435 685	13.2992 943	13.506 1396					
5	11.537 51846	15.7587 542	13.0576 466	12.9036 111	9.87527 9459	15.4926 031	12.2287 615	11.609 0671					
6	6.8039 64861	7.45287 728	8.16919 645	9.25634 516	9.25634 5164	14.8126 52	10.1134 601	11.785 4724					
7	11.392 66002	15.5900 704	12.3281 265	12.7155 472	11.7679 8666	15.4435 685	13.2992 943	13.506 1396					
8	11.038 6256	17.8491 336	9.85325 374	12.1954 052	9.87527 9459	15.4926 031	12.2287 615	11.609 0671					
9	8.9381 77416	10.1134 601	9.80900 881	11.0955 062	9.25634 5164	14.8126 52	10.1134 601	11.785 4724					
10					11.7846 7549	15.1197 222	12.3773 724	12.228 7532					
	<b>11,66</b> <b>3,480</b>	<b>14,42</b> <b>4,113</b>	<b>12,23</b> <b>2,995</b>	<b>12,37</b> <b>2,091</b>	<b>11,44</b> <b>3,131</b>	<b>15,84</b> <b>1,800</b>	<b>12,45</b> <b>1,583</b>	<b>12,63</b> <b>1,720</b>	<b>11,66</b> <b>3,480</b>	<b>14,42</b> <b>4,113</b>	<b>12,23</b> <b>2,995</b>	<b>12,37</b> <b>2,091</b>	<b>Media</b> <b>SD</b>

**Tabla 22. IFM de pSTAT3 en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's posterior al estímulo con IL-6 en los grupos analizados.**

No. de sujeto	DS N/E	DS 15 min	DS 60 min	DS 120 min	IDCV N/E	IDCV 15 min	IDCV 60 min	IDCV 120 min	GOF STAT3 N/S	GOF STAT3 15 min	GOF STAT3 60 min	GOF STAT3 120 min	Media	SD
1	8.9352 1311	9.73765 18	8.93521 311	10.1756 743	7.05516 301	7.10267 007	7.91045 941	6.1852 5405	12.0095 24	12.3049 301	11.0562 956	10.8656 482		
2	6.8005 2626	7.22104 732	7.51574 385	7.46331 735					9.46783 25	9.65040 613	9.56011 733	9.58377 333		
	<b>7,868</b>	<b>8,479</b>	<b>8,225</b>	<b>8,819</b>	<b>7,055</b>	<b>7,103</b>	<b>7,910</b>	<b>6,185</b>	<b>10,74</b>	<b>10,98</b>	<b>10,31</b>	<b>10,22</b>		
	<b>1,509</b>	<b>1,780</b>	<b>1,004</b>	<b>1,918</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>1,797</b>	<b>1,877</b>	<b>1,058</b>	<b>0,9064</b>		

La inmortalización de las células de los pacientes con IDCV permitió el análisis de pSTAT3 a los 15 min, 60 min y 120 min posterior al estímulo con IL-21 mediante western blot como se muestra en la figura 14. La comparación entre la relación de expresión pSTAT3/STAT3 en las muestras de pacientes con IDCV respecto a DS, no determina diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tiempos posterior a la estimulación con IL-21 (Figura 14B). En la figura 14A se muestran las membranas con las bandas para pSTAT3, STAT3 y GAPDH posterior a la estimulación con IL-21, representativos de paciente IDCV y DS en células inmortalizadas con EBV. Los datos individuales pueden observarse en la tabla 23 para los estímulos con IL-21 de las muestras de los pacientes IDCV y sujetos sanos.



**Figura 14. Relación de la densidad en la intensidad de expresión de fosforilación de STAT3 respecto a STAT3 total posterior a la estimulación con IL-21 en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's de pacientes IDCV comparada con donadores sanos.** A) Membrana representativa para la expresión de STAT3, pSTAT3 y GAPDH en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's de pacientes IDCV y DS, a los 15 min, 60 min y 120 min posterior al estímulo con IL-21. B) Comparación de la relación pSTAT3/STAT3 expresado en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's de pacientes IDCV, respecto a DS, a los 15 min, 60 min y 120 min posterior al estímulo con IL-21. N/E= No estimulado; DS= Donadores sanos; IDCV= Inmunodeficiencia común variable.

**Tabla 23. Densidad de intensidad de pSTAT3/STAT3 en células inmortalizadas con EBV a partir de PBMC's posterior al estímulo con IL-21 en los grupos analizados.**

No. de sujeto	DS N/E	DS 15 min	DS 60 min	DS 120 min	IDCV N/E	IDCV 15 min	IDCV 60 min	IDCV 120 min	
1	0.1243 4783	1.30136 986	1.07780 98	0.45437 262	1.24193 548	8.19548 872	5.256 41026	3.115942 03	
2	1.7361 1111	16.5346 535	7.31884 058	0.89256 198	1.41052 632	19.0322 581	8.468 35443	4.934579 44	
3	0.8573 4072	30.4301 075	10.7480 916	11.6972 477	1.60526 316	28.4297 521	7.904 7619	0.882758 62	
4	1.0723 7636	5.60165 975	1.61658 031	2.21041 445	0.28221 574	7.96812 749	3.099 21962	3.919821 83	
5	1.0112 9944	8.69203 329	5.02380 952	3.73049 645	0.93099 671	35.0272 232	13.58 79218	8.482871 13	
6	1.1877 0227	9.05303 03	3.34894 614	3.49315 068					
	<b>2,420</b>	<b>2,628</b>	<b>2,479</b>	<b>2,503</b>	<b>2,385</b>	<b>2,748</b>	<b>2,508</b>	<b>2,515</b>	<b>Media</b>
	<b>0,2838</b>	<b>0,3120</b>	<b>0,2367</b>	<b>0,1642</b>	<b>0,2008</b>	<b>0,08276</b>	<b>0,1174</b>	<b>0,1119</b>	<b>SD</b>

#### 4. Discusión

La patogénesis de la IDCV es un desorden clínicamente heterogéneo y la principal inmunodeficiencia primaria en adultos, que aún no se conoce totalmente, a pesar de los múltiples esfuerzos de investigación. Tanto la diversidad clínica como el fenotipo celular heterogéneo que se muestra son los principales factores que dificultan el estudio de esta enfermedad inmunológica. Sin embargo, un defecto común observado en pacientes con IDCV es la producción anormal de anticuerpos. Se han estudiado diferentes grupos poblacionales afectados por esta inmunodeficiencia para determinar el pronóstico y mejorar su diagnóstico. En cohortes estadounidenses, la edad promedio de la aparición de los síntomas es a los 23-28 años y el diagnóstico generalmente se realiza a los 29-33 años de edad<sup>29</sup>. Considerando estos datos realizados en una población de 248 pacientes en 1998, las edades registradas por este trabajo en población mexicana indican un retraso en el diagnóstico de 13.37 años en promedio (tabla 7). Cabe destacar que la proporción de género, con una mayoría de mujeres, no coincide con las observaciones de que el retraso en el diagnóstico es debido a que los varones tienden a presentar síntomas a menor edad, en países europeos<sup>30</sup>. En este mismo estudio, se indica como ha disminuido el tiempo de diagnóstico posterior al año 2000. Por lo que se estima que la deficiencia en el seguimiento y atención de los pacientes en México pueda mejorar con la visibilidad de las inmunodeficiencias con respecto al tiempo e incrementar el diagnóstico temprano de esta inmunodeficiencia. Nuestra cohorte presenta enfermedades autoinmunes en el 45.83% de los pacientes, los cuales no están asociadas con el género.

Al realizar la clasificación de los pacientes con IDCV de acuerdo con los valores de células de memoria con cambio de isotipo, no se encontraron diferencias estadísticamente significancia con la aparición de manifestaciones clínicas de esplenomegalia ni autoinmunidad. Esta clasificación está basada en lo descrito por Piqueras y colaboradores<sup>9</sup>, quienes describieron un incremento de las células CD21<sup>low</sup> en el grupo I que se asocia con la aparición de dichas manifestaciones. En nuestra cohorte, analizando las poblaciones de esta clasificación en grupos I y II, se observa un incremento de la frecuencia en las células que expresan CD21<sup>low</sup> en ambos grupos, respecto a los donadores sanos ( $p=0.0272$ ), así como manifestaciones de autoinmunidad y esplenomegalia en pacientes, independientemente de que se encuentren clasificados en los grupos I y II. Sin embargo, la comparación entre los grupos I y II no arrojó diferencias significativas en las proporciones de las células B CD21<sup>low</sup>, por lo que esta subpoblación de células B, no

explica (en nuestra cohorte) las manifestaciones clínicas descritas en los pacientes. Esta discrepancia con los datos de la literatura se puede explicar por el número reducido de casos en este estudio por lo que se requiere incrementar la población de estudio y dar un mejor seguimiento clínico de los sujetos en ambos grupos. Un estudio con más sujetos y por más tiempo podría arrojar más datos que concuerden con una mayor susceptibilidad para presentar manifestaciones clínicas severas.

Al analizar las diferentes poblaciones celulares en sangre periférica, se observó una clara disminución de los linfocitos totales, lo cual afecta las cuentas absolutas de todos los linfocitos, a pesar de que subpoblaciones como los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, células B naïve y células B CD21<sup>low</sup> tengan una elevación en frecuencias comparadas contra el grupo control ( $p=0.0147$ ,  $p=0.0003$  y  $p=0.0313$ , respectivamente). El comportamiento se invierte, es decir, disminuyeron los números absolutos de las células T CD8<sup>+</sup> y las células B naïve de los pacientes IDCV al compararlos con el grupo control.

Desde la primera descripción de IDCV, se ha estudiado la función de las células B en busca de comprender su participación en esta inmunodeficiencia. La activación adecuada de las células B induce la diferenciación de las células B naïve en células B de memoria, para permitir una respuesta rápida y eficiente durante la reacción inmune<sup>31</sup>. En los últimos años, se han demostrado varios defectos de señalización en una diversidad de células inmunes en pacientes con IDCV, incluido el receptor de células B (BCR), la señalización mediada por células<sup>32</sup>, la vía del receptor tipo Toll y otras moléculas asociadas a la señalización a través del receptor de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)<sup>33-35</sup>.

Yazdani y colaboradores<sup>36</sup>, reportaron, en una cohorte de 30 pacientes con IDCV, una disminución estadísticamente significativa en las cuentas absolutas de algunas de las subpoblaciones de células B. Por otro lado, en este mismo estudio, las células B transicionales y las CD21<sup>low</sup> mostraron un incremento en sus cuentas absolutas. En nuestra cohorte, solo algunos pacientes mostraron valores elevados de las células B CD21<sup>low</sup>. Estos datos demuestran que el análisis de frecuencias en estos pacientes, requieren evaluarse en conjunto con las cuentas absolutas. La pérdida drástica de estas poblaciones celulares en los pacientes IDCV, puede deberse a que son células maduras que no pueden concluir su proceso de diferenciación y mueren por apoptosis<sup>37</sup>. Ochstrop y colaboradores, analizaron los defectos de la maduración de las células B empleando en aspirados de medula ósea. Encontraron que, en 9 de 25 pacientes con IDCV, había un

bloqueo en las células pre-B que son incapaces de diferenciarse a transicionales o células maduras<sup>38</sup>. En nuestra cohorte, no observamos esta disminución, por lo que se descartamos que los pacientes analizados en este trabajo presenten alteraciones en la maduración de sus células B.

Considerando que las células B de memoria y aquellas en proceso de diferenciación a plasmáticas están disminuidas en los pacientes, sospechamos que la disminución de linfocitos T totales y CD4<sup>+</sup>, pudiera también afectar a las subpoblaciones de células T foliculares y las T reguladoras, posiblemente involucradas en la aparición de las manifestaciones clínicas severas. El análisis comparativo de las células T reguladoras en los pacientes IDCV clasificados en grupo I y II, mostraron como los pacientes con una disminución de células B de memoria con cambio de isotipo, tienen una baja frecuencia, significativamente diferente, con respecto al grupo control (p=0.0295). Estos datos se asemejan a lo reportado en pacientes con IDCV clasificados de la misma manera. Lopez Herrera y colaboradores<sup>39</sup>, han publicado que las células Treg disminuyen severamente en aquellos pacientes del grupo I con un aumento de las células B CD21<sup>low</sup>. Adicionalmente, al clasificar los pacientes IDCV con autoinmunidad o ausencia de esta, sus resultados mostraron la disminución de las Treg entre los pacientes con autoinmunidad, tal y como se observa en nuestra cohorte. Los resultados de estas comparaciones muestran que las Treg juegan un papel esencial en la patogénesis de IDCV con una importante asociación con autoinmunidad.

Interesantemente, a pesar de que los valores de IgA se encuentran disminuidos entre los pacientes con IDCV, al realizar la clasificación por grupos, se observan mayores niveles de IgA sérica en los pacientes del grupo II. Al realizar correlaciones entre las Treg, los valores de inmunoglobulinas, y la autoinmunidad, se distingue una asociación negativa con los valores de IgA. Esto podría explicarse con los datos descritos por López-Herrera y colaboradores, en donde los pacientes IDCV sin autoinmunidad presentan frecuencias normales de Treg FOXP3<sup>+</sup>. Es probable las Treg en los pacientes sin autoinmunidad, de la cohorte evaluada en el presente trabajo, no sean capaces de activarse y generar el TGF- $\beta$  que favorezca el cambio de isotipo a IgA<sup>40</sup>.

Las células T foliculares tienen una participación fundamental en la respuesta humoral contra antígenos T-dependientes. En el caso de los pacientes con IDCV, se describe un incremento en porcentaje del total de Thf en el grupo I y el total de los pacientes IDCV

con autoinmunidad. Cunill y colaboradores determinaron subpoblaciones de células Tfh utilizando los marcadores CXCR3 y CCR6, con ellos demuestran una disminución de subpoblaciones similares a las Th17 y Th2 fuera de centro germinal, y un aumento en las Tfh similar a Th1(Tfh1)<sup>41</sup>. Estas poblaciones asociadas a los centros germinales, caracterizadas por la expresión de CXCR5, tienen la capacidad de producir IL-21 y colaborar con las células B maduras, a excepción de las Tfh1<sup>42</sup>. Estas observaciones, sugieren la importancia de estudiar a las células Tfh1, por lo que sería de utilidad incluir en estudios futuros a la tinción de los receptores CXCR3 y CCR6 para confirmar si hay un incremento de las Tfh1 en los pacientes con IDCV del grupo I.

La IL-21 fue descrita por primera vez en 2000 por Parrish-Novak et al. y Ozaki et al.<sup>43,44</sup> como una citocina clave para la expansión de células B en órganos linfoides secundarios. Además, el desarrollo normal de las células B de la memoria depende de las condiciones del medio, siendo la IL-21 una de las señales más importantes para inducir la memoria de células B. Se ha demostrado que la IL-21 es una citocina crucial para establecer, mantener y regular las respuestas de anticuerpos en ratones y células B humanas<sup>45,46</sup>. Varios estudios han revelado que varias citocinas que activan STAT3, predominantemente IL-21, son mediadores críticos de las células B humanas en las respuestas inmunes humorales<sup>47</sup>. Por esta razón, en este trabajo evaluamos la producción de IL-21 en PBMC's de los pacientes con IDCV. Los datos del presente estudio no definen una alteración en la secreción de IL-21 por parte de las PBMC's bajo estímulos potentes, como lo es PMA/IONOMICINA. Se requiere un ensayo más detallado, mediante el aislamiento de subpoblaciones Tfh circulantes, para confirmar que no exista un defecto en sus perfiles de citocinas secretadas. De igual manera, el uso de otros estímulos, como anti-CD3 o CD28 podría generar diferentes niveles de actividad que modifique la secreción en los pacientes con IDCV<sup>48</sup>. Zdenek Hel y colaboradores reportan una alteración en los niveles séricos de citocinas producidas por las células T CD4 de pacientes con IDCV<sup>49</sup>. La IL-10, uno de los principales componentes de regulación inflamatoria e inductor de la secreción de inmunoglobulinas, se encontró elevada en los pacientes con IDCV. Adicionalmente, Coraglia y colaboradores demostraron que esta elevación de IL-10, así como de la IL-21, posterior a la estimulación de PBMC's con fitohemaglutinina (PHA) e IL-2, es producida principalmente por células CXCR5<sup>50</sup>. Estos datos indican que la producción de IL-10 o IL-21 no está alterada en los centros germinales, apoyando nuestros resultados de la ausencia de un desorden a nivel de disponibilidad de la IL-21.

El receptor de IL-21 se expresa con alta densidad en las células B naïve, y su expresión disminuye en las células B de memoria con y sin cambio de isotipo<sup>51</sup>. Este comportamiento no se ha evaluado previamente en pacientes que padecen IDCV, por lo que la observación de que las células B de memoria de los pacientes del grupo II expresan más IL-21R que las células B naïve del mismo grupo podría indicar defectos en la activación de la vía IL-21/STAT3. En procesos de autoinmunidad, como lupus eritematoso sistémica, se ha observado un incremento del IL-21R en células B atípicas, caracterizadas por la expresión de CD11c y disminución de CD21. Estas células se asocian positivamente con el riesgo de sufrir nefropatía lúpica y, por el fenotipo similar a CD21<sup>low</sup>, a los fenómenos de autoinmunidad en IDCV<sup>52,53</sup>. Por lo anterior, sería útil analizar la densidad de IL-21R en las células B atípicas de pacientes COVID. Dichos resultados podría explicar defectos de proliferación que favorezca la expansión de estas células.

La señalización anormal a través de la vía IL-21R/ $\gamma$ c/JAK-3/STAT3 se ha asociado con una respuesta deficiente de anticuerpos específicos después de la vacunación, quizá causada por defectos en la generación de células B de memoria. Esta relación se ha mostrado con claridad en pacientes con errores congénitos de la inmunidad<sup>16</sup>. Además, el aumento de la susceptibilidad a las infecciones por bacterias encapsuladas también se ha relacionado con el eje IL-21R/ $\gamma$ c/JAK-3/STAT3, como lo demuestran los pacientes diagnosticados con síndrome de hiper-IgE, formas ligadas al cromosoma X y deficiencias relacionadas con JAK3 en inmunodeficiencia combinada grave, mutaciones de pérdida de función en el gen del receptor IL-21 y mutaciones de ganancia de función en la proteína STAT3<sup>54-56</sup>.

El eje IL-21/STAT3 es esencial en el desarrollo de células B, pero este mecanismo en pacientes con IDCV ha sido poco estudiado. De acuerdo con los antecedentes mencionados, hipotetizamos que el desarrollo deficiente de las células B en IDCV está relacionado probables defectos del IL-21R, que se manifiestan en alteraciones en la fosforilación de la proteína STAT3, posterior a la estimulación con IL-21 recombinante. Para ello, determinamos la fosforilación de STAT3 en tres momentos diferentes, sin estímulos y 15 min y 60 min después de estimular con IL-21, con el fin de evaluar la cinética de fosforilación de las células B. Se consideró la respuesta de las células B totales, naïve y de memoria; así como el patrón de fosforilación en los donantes sanos. En primera

instancia, los resultados mostraron diferencias a los 60 min entre los donantes sanos y el total de pacientes, independientemente del grupo de subpoblaciones de células B. La fosforilación de STAT3 se observó incrementada, aunque se esperaba disminuida. Después de estos hallazgos, los pacientes se clasificaron de acuerdo con las frecuencias de células B de memoria; grupo I y grupo II. Ambos grupos mostraron diferencias estadísticas en comparación con los donantes sanos, con un aumento de pSTAT3 a los 60 min en las células B de memoria. Además, los pacientes del grupo I, mostraron una diferencia significativa entre pSTAT3 sin estímulo y pSTAT3 a los 60 min, discrepando con el patrón de fosforilación de los donantes sanos. Respecto al grupo II, se observó como la fosforilación de STAT3 aumentó a los 15 y 60 min. Aunque en este grupo no hubo diferencias significativas respecto a su condición sin estímulo, se requieren mayor número de muestras para definirlo. Nuestros resultados apoyan que existe un defecto en la actividad de la vía IL-21/STAT3 y se refleja un patrón atípico en la fosforilación de STAT3, principalmente en las células B de memoria, a los 60 min post estimulación. Resultados similares han sido reportados en varios trabajos de investigación, Clemente A y colaboradores concluyeron que el aumento de pSTAT3 detectado en las células B de los pacientes con IDCV y la expresión reducida de las células B de memoria en estos pacientes podría deberse a la susceptibilidad de estas células a morir por apoptosis<sup>57,58</sup>.

A pesar de que las técnicas y los estímulos no son similares en los dos estudios, se observaron defectos similares dentro de la vía de señalización IL-21 / STAT3 en pacientes con IDCV. Además, en el presente estudio, los pacientes con IDCV se caracterizan por una alta frecuencia de procesos inflamatorios o autoinmunes; enfermedades autoinmunes (45.83%), esplenomegalia (25%), granuloma (8.33%) y linfadenopatía (41.66%).

En los últimos años, se ha acumulado evidencia de la participación clave de IL-21 en enfermedades autoinmunes, alergias y trastornos inflamatorios<sup>59</sup>. Entre estas funciones, un papel relevante de esta interleucina en el contexto de la autoinmunidad es participar como un importante regulador de la proliferación y diferenciación de las células B y las células secretoras de anticuerpos<sup>46</sup>. Rasmussen T.K. y colaboradores demostraron que los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) tienen una reducción de la fosforilación de STAT3 en las células T CD4 + después de la estimulación de IL-21 y altos niveles de SOCS1 en comparación con los donantes sanos<sup>60</sup>. Por otro lado, Huang X y colaboradores observaron altos niveles de STAT3 total y STAT3 fosforilada en células T CD4+ así

como después de la estimulación con otros activadores del eje STAT3, como IL-6 o IL-10<sup>61</sup>.

Recientemente, Lemarquis A.L. et al. determinaron que la deficiencia selectiva de IgA (sIgAD) tiene defectos en las respuestas de las células B, ya sean dependientes de T o independientes de T; además, sus resultados indican una reducción de la fosforilación de STAT3 inducida por IL-21 en células B de pacientes con sIgAD. La conclusión a la que llegan es que la disminución de pSTAT3 podría representar una formación aberrante del centro germinal o una interrupción en su desarrollo<sup>62</sup>. A pesar del trabajo limitado sobre STAT3 en las células B, se podría concluir que el defecto está en el proceso de la diferenciación de las células plasmáticas. Adicionalmente, se han descrito defectos en el TLR-9 en pacientes IDCV. Se ha demostrado que una coestimulación de CpG e IL-21 mejora la fosforilación de STAT3 en células B humanas<sup>63,64</sup>. Por lo que sería deseable en un próximo estudio analizar el papel de TLR9, en conjunto con IL-21 en nuestra cohorte de pacientes.

Además de STAT3, IL-21 puede activar a STAT5 y STAT1. En pacientes con ganancia de función de STAT3 se observa un fenómeno que afecta los otros miembros de la familia de STAT, como por ejemplo, la disminución en la fosforilación de STAT5 bajo la estimulación con IL-2, y de STAT1 estimulada con INF- $\gamma$ <sup>56</sup>. STAT5, activado por IL-21, induce la expresión de SOCS3 y de BCL6 en células B naïve. Los PBMC's de pacientes carentes de STAT5 presentan una expansión de las células B con cambio de isotipo<sup>65</sup>. Esto nos habla de cómo STAT5 podría tener una participación relevante bajo la estimulación de IL-21 en los pacientes con IDCV. La diferenciación a plasmablastos podría deberse al bloqueo de la vía de señalización por la actividad de SOCS3 y de BCL6 inducidos por STAT5.

Por otro lado, una de las técnicas con mayor recurrencia, cuando la muestra de células B es limitada, es la inmortalización de células B con EBV<sup>66</sup>. Diversos ensayos "in vitro" se llevan a cabo en estas células denominadas líneas celulares de células B linfoblastoides (LCL), debido a que los desórdenes genéticos intrínsecos de las células B se mantienen independientemente del estado de latencia que provoca el EBV. Algunos reportes de la literatura indican que el uso de LCL es un buen modelo para observar alteraciones en señalización por IL-21 de STAT's<sup>67</sup>. Sin embargo, en el presente estudio, la estimulación con IL-21 no mostró el patrón de fosforilación, con diferencias significativas, como el

observado en PBMC's en células de los donadores sanos; incluso las células inmortalizadas de los pacientes con GOF STAT3 no presentaron un patrón de fosforilación diferente al de los controles. Por otro lado, únicamente las LCL de los pacientes IDCV mantienen una fosforilación incrementada (observable por WB hasta los 120 min posterior a la activación con IL-21). La estimulación continua por 6 días podría fomentar la inducción de la proteína LMP1 (CD40-Like) del EBV y la disminución de la proteína de latencia EBNA2<sup>68</sup>, que podría corregir el defecto intrínseco de las células B para diferenciarse a células B de memoria en los sujetos con IDCV del grupo I.

Entre nuestros hallazgos, describimos una correlación entre la gravedad de las manifestaciones clínicas con un alto porcentaje de fosforilación de STAT3 en células B de memoria a los 60 min posterior a la estimulación con IL-21. Mientras las infecciones respiratorias se presentan en la mayoría de los pacientes, muchos de ellos también tienen otras complicaciones no infecciosas como esplenomegalia y enfermedades autoinmunes altamente relacionadas con la mortalidad. Por esta razón, la puntuación de severidad clínica tiene niveles elevados debido a procesos inflamatorios y autoinmunes. Además, al correlacionar el aumento de la fosforilación de STAT3 con la puntuación de severidad clínica se encontró una asociación positiva ( $r= 0.7901$   $p<0.0001$ ). Estos resultados sugieren que el patrón atípico de pSTAT3 a los 60 min posterior a la estimulación con IL-21, este relacionado con presencia de manifestaciones clínicas graves en pacientes con IDCV, como enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Recientemente, se ha demostrado que la disminución de la diferenciación de las células B naïve a células plasmáticas en humanos, es una consecuencia de la alteración de las señales de la vía IL-21R/STAT3. Apoyando este hecho, se han descrito pacientes con variantes genéticas hipomórficas de STAT3 con defectos en la diferenciación de las células B naïve a plasmáticas, estimuladas con IL-10 o IL-21 "in vitro"<sup>69</sup>.

Es necesario realizar un estudio más profundo de las moléculas implicadas la vía IL-21R/STAT3, como Blimp-1, SOCS3, etc., para comprender la forma en que los defectos en este eje participan en pacientes con IDCV. En conjunto con lo reportado previamente en población iraní con IDCV, estos hallazgos permiten sospechar de defectos no solo en la activación de STAT3, sino también en la regulación de sus genes blanco<sup>70</sup>. Sin embargo, este trabajo no alcanzó a abordar estas preguntas.

## **5. Conclusión.**

Los pacientes con IDCV con frecuencias normales de células B de memoria con cambio de isotipo (grupo II) presentan un aumento en la densidad IL-21R en las células B de memoria respecto a las células naïve. Este incremento en el receptor en las células B de memoria, conduce a una cinética alterada en la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-21. Los pacientes con IDCV con una disminución de células de memoria con cambio de isotipo (grupo I) tienen una expresión similar de IL-21R en células B naïve y de memoria. Esta diferencia en el grupo I respecto a los pacientes del grupo II, se asocia a un mayor puntaje de severidad, a la disminución de Tregs y al incremento de Thf, como ocurre en los pacientes con IDCV con autoinmunidad. Los pacientes con IDCV muestran defectos en la expresión del receptor y en la señalización de IL-21.

## **6. Perspectivas.**

- Determinar la diferenciación de células B en PBMC's de pacientes con IDCV a células plasmáticas productoras de anticuerpos bajo la estimulación con  $\alpha$ IgM, CD40L con y sin IL-21.
- Estudiar las proporciones de subpoblaciones de células Thf17, Thf1 y Thf2 circulantes usando los receptores CXCR3 y CCR6.
- Evaluar la fosforilación de STAT5 y STAT1 posterior a la estimulación con IL-21 en subpoblaciones de células B.
- Determinar la localización nuclear de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y STAT1 por WB y microscopia confocal.
- Cuantificar los transcritos de los genes blanco de STAT3 por qPCR.

## 7. Referencias.

1. Cunningham-Rundles, C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood* **116**, 7–15 (2010).
2. Modell, V., Quinn, J., Orange, J., Notarangelo, L. D. & Modell, F. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. *Immunol. Res.* **64**, 736–753 (2016).
3. Lehman, H., Hernandez-Trujillo, V. & Ballow, M. Diagnosing primary immunodeficiency: a practical approach for the non-immunologist. *Curr. Med. Res. Opin.* **31**, 697–706 (2015).
4. Conley, M. E., Notarangelo, L. D. & Etzioni, A. Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies. *Clin. Immunol.* **93**, 190–197 (1999).
5. Picard, C. *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).
6. Saikia, B. & Gupta, S. Common Variable Immunodeficiency. *Indian J. Pediatr.* **83**, 338–344 (2016).
7. Bonilla, F. A. *et al.* International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **4**, 38–59 (2016).
8. Deenick, E. K. *et al.* Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2739–2753 (2013).
9. Warnatz, K. *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* **99**, 1544–1551 (2002).
10. Piqueras, B. *et al.* Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J. Clin. Immunol.* **23**, 385–400 (2003).
11. Wehr, C. *et al.* The EUROclass trial: defining subgroups in common variable

- immunodeficiency. *Blood* **111**, 77–85 (2008).
12. Ding, B. B., Bi, E., Chen, H., Yu, J. J. & Ye, B. H. IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J. Immunol.* **190**, 1827–1836 (2013).
  13. Moens, L. & Tangye, S. G. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
  14. Suan, D., Sundling, C. & Brink, R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr. Opin. Immunol.* **45**, 97–102 (2017).
  15. Azizi, G. *et al.* Autoimmunity and its association with regulatory T cells and B cell subsets in patients with common variable immunodeficiency. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. **46**, 127–135 (2018).
  16. Desjardins, M. & Mazer, B. D. B-cell memory and primary immune deficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **13**, 639–645 (2013).
  17. Gharibi, T. *et al.* Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology* **221**, 357–367 (2016).
  18. Kitamura, H. *et al.* Interleukin-6/ <sc>STAT</sc> 3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* **108**, 1947–1952 (2017).
  19. Zhang, H.-X., Yang, P.-L., Li, E.-M. & Xu, L.-Y. STAT3beta, a distinct isoform from STAT3. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **110**, 130–139 (2019).
  20. Hevehan, D. L., Miller, W. M. & Papoutsakis, E. T. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood* **99**, 1627–1637 (2002).
  21. Darnell, J. E. STATs and Gene Regulation. *Science (80-. )*. **277**, 1630–1635 (1997).
  22. Vogel, T. P., Milner, J. D. & Cooper, M. A. The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *J. Clin. Immunol.* **35**, 615–623 (2015).
  23. Bousquet, C., Susini, C. & Melmed, S. Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor.

- J. Clin. Invest.* **104**, 1277–1285 (1999).
24. Sadreev, I. I. *et al.* A Systems Model of Phosphorylation for Inflammatory Signaling Events. *PLoS One* **9**, e110913 (2014).
  25. Kim, M., Morales, L., Jang, I.-S., Cho, Y.-Y. & Kim, D. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2708 (2018).
  26. Faletti, L., Ehl, S. & Heeg, M. Germline STAT3 gain-of-function mutations in primary immunodeficiency: Impact on the cellular and clinical phenotype. *Biomed. J.* **44**, 412–421 (2021).
  27. Jolliff, C. R. *et al.* Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. *Clin. Chem.* **28**, 126–128 (1982).
  28. Piqueras, B., Galicier, L. & Cruyssen, F. B. D. E. R. Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates with Clinical Aspects. *J. Clin. Immunol.* **23**, 385–400 (2003).
  29. Cunningham-Rundles, C. & Bodian, C. Common Variable Immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 Patients. *Clin. Immunol.* **92**, 34–48 (1999).
  30. Gathmann, B. *et al.* Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 116-126.e11 (2014).
  31. Yazdani, R. *et al.* Evaluation of Known Defective Signaling-Associated Molecules in Patients Who Primarily Diagnosed as Common Variable Immunodeficiency. *Int. Rev. Immunol.* **35**, 7–24 (2016).
  32. Foerster, C. *et al.* B Cell Receptor-Mediated Calcium Signaling Is Impaired in B Lymphocytes of Type Ia Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J. Immunol.* **184**, 7305–7313 (2010).
  33. THON, V. *et al.* Defective integration of activating signals derived from the T cell receptor (TCR) and costimulatory molecules in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin. Exp. Immunol.* **110**, 174–181 (2007).

34. Escobar, D. *et al.* Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cell. Immunol.* **262**, 105–111 (2010).
35. del Pino Molina, L. *et al.* Defective Bcl-2 expression in memory B cells from common variable immunodeficiency patients. *Clin. Exp. Immunol.* **203**, 341–350 (2021).
36. Yazdani, R. *et al.* Comparison of various classifications for patients with common variable immunodeficiency (CVID) using measurement of B-cell subsets. *Allergol. Immunopathol. (Madr).* **45**, 183–192 (2017).
37. Yazdani, R. *et al.* Role of apoptosis in common variable immunodeficiency and selective immunoglobulin A deficiency. *Mol. Immunol.* **71**, 1–9 (2016).
38. Ochtrop, M. L. G. *et al.* T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood* **118**, 309–318 (2011).
39. López-Herrera, G. *et al.* Low percentages of regulatory T cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune diseases and its association with increased numbers of CD4+CD45RO+ T and CD21low B cells. *Allergol. Immunopathol. (Madr).* **47**, 457–466 (2019).
40. Feng, T., Elson, C. O. & Cong, Y. Treg cell–IgA axis in maintenance of host immune homeostasis with microbiota. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 589–592 (2011).
41. Cunill, V. *et al.* Follicular T Cells from smB- Common Variable Immunodeficiency Patients Are Skewed Toward a Th1 Phenotype. *Front. Immunol.* **8**, 174 (2017).
42. Yesillik, S. & Gupta, S. Phenotypically defined subpopulations of circulating follicular helper T cells in common variable immunodeficiency. *Immunity, Inflamm. Dis.* **8**, 441–446 (2020).
43. Parrish-Novak, J. *et al.* Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**, 57–63 (2000).
44. Ozaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P. R. & Leonard, W. J. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* **97**, 11439–11444 (2000).
45. Leonard, W. J. & Wan, C.-K. IL-21 Signaling in Immunity. *F1000Research* **5**, 224 (2016).
  46. Ettinger, R., Kuchen, S. & Lipsky, P. E. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol. Rev.* **223**, 60–86 (2008).
  47. Avery, D. T. *et al.* B cell–intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med.* **207**, 155–171 (2010).
  48. Agrawal, A. *et al.* Increased IL-21 secretion by aged CD4+T cells is associated with prolonged STAT-4 activation and CMV seropositivity. *Aging (Albany. NY)*. **4**, 648–659 (2012).
  49. Hel, Z. *et al.* Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* **34**, 971–8 (2014).
  50. Coraglia, A. *et al.* Common Variable Immunodeficiency and Circulating T FH. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–10 (2016).
  51. Good, K. L., Bryant, V. L. & Tangye, S. G. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *J. Immunol.* **177**, 5236–5247 (2006).
  52. Visentini, M. *et al.* Persistence of a Large Population of Exhausted Monoclonal B cells in Mixed Cryoglobuliemia After the Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *J. Clin. Immunol.* **32**, 729–735 (2012).
  53. Wang, S. *et al.* IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c<sup>hi</sup>T-bet<sup>+</sup> B cells in SLE. *Nat. Commun.* **9**, 1758 (2018).
  54. Recher, M. *et al.* IL-21 is the primary common  $\gamma$  chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood* **118**, 6824–6835 (2011).
  55. Miggelbrink, A. M. *et al.* B-cell differentiation and IL-21 response in IL2RG/JAK3 SCID patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **131**, 2967–2977 (2018).
  56. Milner, J. D. *et al.* Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by

- germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* **125**, 591–599 (2015).
57. Clemente, A. *et al.* Increased STAT3 phosphorylation on CD27 + B-cells from common variable immunodeficiency disease patients. *Clin. Immunol.* **161**, 77–88 (2015).
  58. Clemente, A., Pons, J., Lanio, N., Matamoros, N. & Ferrer, J. M. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 97–108 (2013).
  59. Long, D., Chen, Y., Wu, H., Zhao, M. & Lu, Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **99**, 1–14 (2019).
  60. Rasmussen, T. K. *et al.* Overexpression of microRNA-155 increases IL-21 mediated STAT3 signaling and IL-21 production in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 154 (2015).
  61. Huang, X., Guo, Y., Bao, C. & Shen, N. Multidimensional Single Cell Based STAT Phosphorylation Profiling Identifies a Novel Biosignature for Evaluation of Systemic Lupus Erythematosus Activity. *PLoS One* **6**, e21671 (2011).
  62. Lemarquis, A. L., Theodors, F., Einarsdottir, H. K. & Ludviksson, B. R. Mapping of Signaling Pathways Linked to sIgAD Reveals Impaired IL-21 Driven STAT3 B-Cell Activation. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
  63. Borzutzky, A. *et al.* Defective TLR9-driven STAT3 activation in B cells of patients with COVID. *Clin. Immunol.* **197**, 40–44 (2018).
  64. Liu, B.-S., Stoop, J. N., Huizinga, T. W. & Toes, R. E. M. IL-21 Enhances the Activity of the TLR–MyD88–STAT3 Pathway but Not the Classical TLR–MyD88–NF- $\kappa$ B Pathway in Human B Cells To Boost Antibody Production. *J. Immunol.* **191**, 4086–4094 (2013).
  65. Pelham, S. J. *et al.* STAT5B restrains human B-cell differentiation to maintain humoral immune homeostasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **150**, 931–946 (2022).
  66. TSUCHIYA, S., KONNO, T., TADA, K. & ONO, Y. Epstein-Barr Virus-induced Lymphoblastoid Cell Lines from Patients with Primary Immunodeficiency Diseases. *Scand. J. Immunol.* **11**, 155–162 (1980).

67. Berglund, L. J. *et al.* IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* **122**, 3940–3950 (2013).
68. Konforte, D., Simard, N. & Paige, C. J. Interleukin-21 regulates expression of key Epstein–Barr virus oncoproteins, EBNA2 and LMP1, in infected human B cells. *Virology* **374**, 100–113 (2008).
69. Tangye, S. G. & Ma, C. S. Regulation of the germinal center and humoral immunity by interleukin-21. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).
70. Hamidi Esfahani, Z. *et al.* Evaluation of MicroRNA-125b-5p and Transcription Factors BLIMP1 and IRF4 Expression in Unsolved Common Variable Immunodeficiency Patients. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* (2021) doi:10.18502/ijaai.v20i6.8021.

## 9. Anexos.

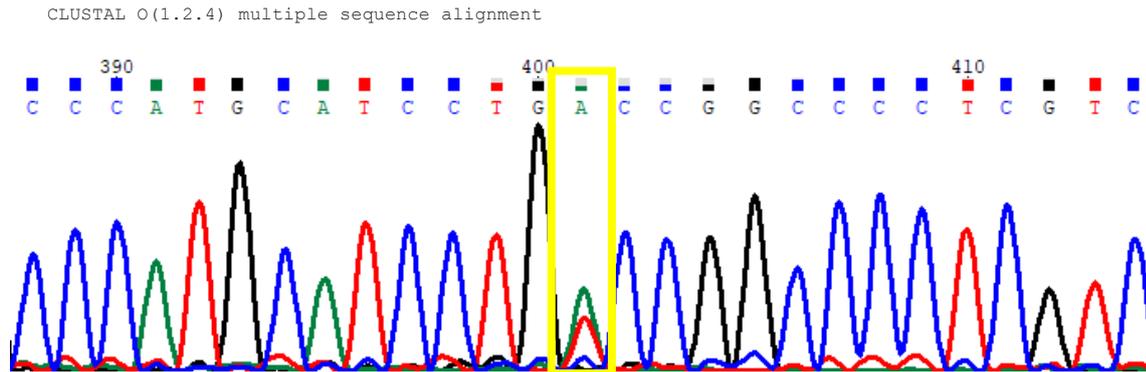
### 9.1. Secuenciación de exones 9-10 de STAT3 de paciente 1

Ambos "primers" fueron diseñados para amplificar la secuencia de los 2 exones.

Se utiliza el software Chromas (v2.6.6) para la visualización de la secuencia amplificada y el software en línea CLUSTAL O (v1.2.4) para el alineamiento múltiple de secuencias.

Se confirma la mutación en el exón 10 (resaltado amarillo), sin reportes previos.

Primer Fw



### 9.2. Secuenciación de exones 22-23 de STAT3 de paciente 2

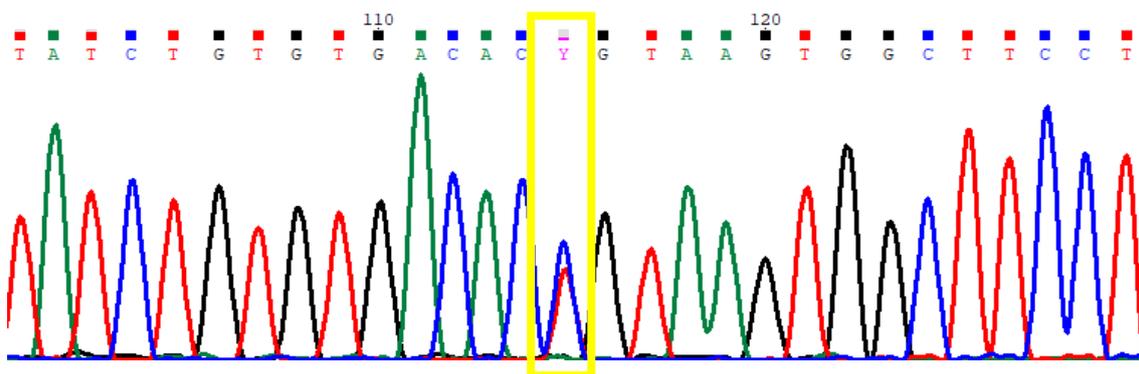
Ambos "primers" fueron diseñados para amplificar la secuencia de los 2 exones.

Se utiliza el software Chromas (v2.6.6) para la visualización de la secuencia amplificada y el software en línea CLUSTAL O (v1.2.4) para el alineamiento múltiple de secuencias.

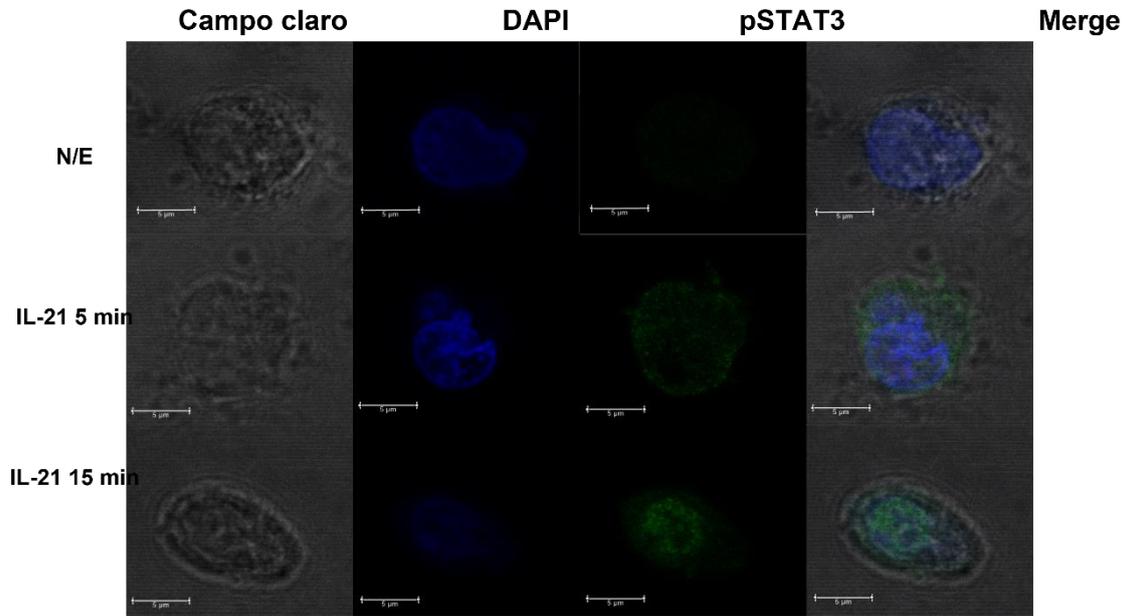
Se confirma la mutación en el exón 22 (resaltado amarillo), previamente reportada en:

Alperin, J. M., & Sawalha, A. H. (2018). Monogenic Lupus: A Developing Paradigm of Disease. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02496>

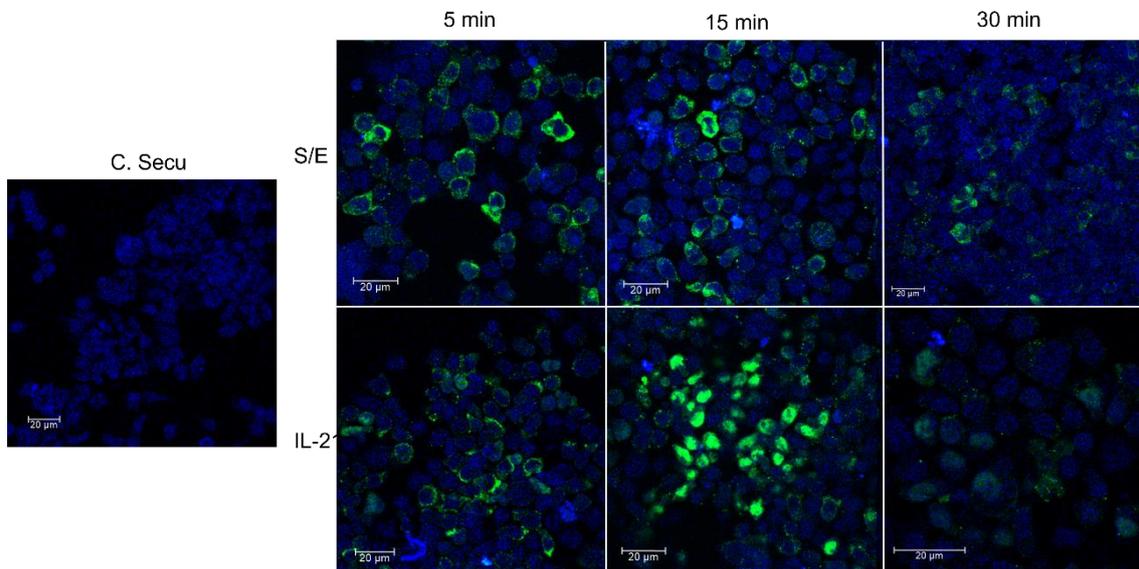
Primer Fw

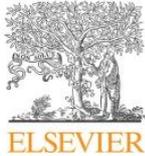


**9.3. Expresión de pSTAT3 en núcleo en LCL's de donador sano posterior al estímulo con IL-21.**



**9.1. Expresión de pSTAT3 en núcleo en LCL's de paciente GOF STAT3 posterior al estímulo con IL-21.**





Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/humimm](http://www.elsevier.com/locate/humimm)

Research article

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

Diana Olgún-Calderón<sup>a,1</sup>, Ma. Guadalupe Velásquez-Ortiz<sup>b,1</sup>, H. M. Raquel Huerta-Robles<sup>c</sup>, Gabriela López-Herrera<sup>c</sup>, Nora H. Segura-Méndez<sup>d,2</sup>, Patricia Ófarrill-Romanillos<sup>d</sup>, Selma Scheffer-Mendoza<sup>e</sup>, Marco A. Yamazaki-Nakashimada<sup>e</sup>, Ma. Lourdes García-Cruz<sup>f</sup>, Sara E. Espinosa-Padilla<sup>c</sup>, Tamara A. Staines-Boone<sup>g</sup>, Leopoldo Santos-Argumedo<sup>a</sup>, Laura Berrón-Ruiz<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV IPN, Ciudad de México, Mexico<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico<sup>c</sup> Laboratorio de Inmunodeficiencias, Instituto Nacional de Pediatría SSA, Ciudad de México, Mexico<sup>d</sup> Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI, IMSS, Mexico<sup>e</sup> Servicio de Inmunología y Alergia, Instituto Nacional de Pediatría SSA, Ciudad de México, Mexico<sup>f</sup> Departamento de Otorrinolaringología, INER, Ciudad de México, Mexico<sup>g</sup> Servicio de Alta Especialidad, Centro Médico Noreste IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 June 2021

Revised 9 January 2022

Accepted 24 January 2022

Available online xxxx

## Keywords:

CVID

STAT3

IL-21

B cell

## ABSTRACT

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

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

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

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

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

## 1. Introduction

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

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

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

\* Corresponding author.

E-mail address: [lberronruiz@yahoo.com.mx](mailto:lberronruiz@yahoo.com.mx) (L. Berrón-Ruiz).<sup>1</sup> These authors contribute equally to this work.<sup>2</sup> Segura-Méndez Nora H, MD, Rest in Peace, June, 2021.<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.01.013>

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

Please cite this article as: D. Olgún-Calderón, Ma. Guadalupe Velásquez-Ortiz, H. M. Raquel Huerta-Robles et al., Atypical patterns of STAT3 phosphorylation in subpopulations B cells in patients with common variable immunodeficiency, Human Immunology, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.01.013>

# Activating *de novo* monoallelic variants causing inborn errors of immunity in two unrelated children born of HIV-seroconcordant couples

Saul O. Lugo Reyes<sup>a</sup>, Andrea Solórzano Suárez<sup>a</sup>,  
Selma C. Scheffler Mendoza<sup>b</sup>, Luis Xóchihua Díaz<sup>c</sup>,  
M. Edith González Serrano<sup>a</sup>, Gabriela López Herrera<sup>a</sup>,  
Edgar Alejandro Medina-Torres<sup>a</sup>, Claudia I. Cruz Ugalde<sup>e</sup>,  
Diana Olguín-Calderón<sup>f</sup>, Laura Berrón Ruiz<sup>a</sup>, Sara E. Espinosa-Padilla<sup>a</sup>,  
Marco Antonio Yamazaki-Nakashimada<sup>b</sup> and Chiharu Murata<sup>d</sup>

See related paper on page 2215

**Introduction:** Around 20% of all inborn errors of immunity (IEI) are autosomal dominant or monoallelic, either by haploinsufficiency, negative dominance, or gain of function (GOF). GOF phenotypes usually include autoinflammation, autoimmunity, lymphoproliferation, allergies, and some infections.

**Case series:** We describe the cases of two unrelated patients born of HIV-seroconcordant parents. Both patients are HIV-negative but carry *de novo* GOF missense variants that resulted in inflammatory lymphoproliferative IEI diseases: signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-GOF and phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic delta (PIK3CD)-GOF. Both variants were found through whole-exome sequencing and confirmed by Sanger.

An 11-year-old male with recurrent sinopulmonary infections, dysmorphism, growth delay, bronchiectasis, and mild mental retardation, as well as lymphopenia, thrombocytopenia, and high immunoglobulin M. Both his parents were known to be HIV-positive under anti-retroviral treatment. HIV infection was repeatedly ruled out in the patient, whom through whole-exome sequencing was found to have a heterozygous missense variant in exon 24 of *PIK3CD*, a hotspot transition, and the most reported variant in PIK3CD-GOF patients.

A 6-year-old male with autoimmune hemolytic anemia, lymphoproliferation, short stature, and intractable diarrhea. Both his parents were found to be HIV-positive. HIV was repeatedly ruled out in the patient by ELISA and viral load. He was found to have a heterozygous missense/splice variant in exon 22 of *STAT3*, a hotspot transition, and the most reported variant in STAT3-GOF patients.

**Discussion:** The AID/APOBEC3 A-H family of proteins are cytidine deaminases that induce G>A hypermutation in both the invading viral DNA and the host genome, which results in stop codons inside the endogenized retroviral sequence. Both variants

<sup>a</sup>Immune Deficiencies Laboratory, <sup>b</sup>Clinical Immunology Service, <sup>c</sup>Infectology Department, <sup>d</sup>Research Methodology Department at the National Institute of Pediatrics, Health Secretariat, Mexico City, <sup>e</sup>Medical Genetics, Dr Alberto Pizanti Clinic, ISSSTE, Mexico City, and <sup>f</sup>Molecular Biomedicine Department, CINVESTAV IPN, Mexico City, Mexico.

Correspondence to Saul O. Lugo Reyes, MD, MSc Laboratorio de Inmunodeficiencias, Instituto Nacional de Pediatría. Av Iman 1, Torre de Investigación Piso 9, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacan 04530, Mexico City, Mexico. E-mail: dr.lugo.reyes@gmail.com and Sara Elva Espinosa-Padilla, MD, PhD, Head of the Immune Deficiencies Lab, INP.

E-mail: saraelvaespino@gmail.com

Received: 25 January 2022; revised: 8 May 2022; accepted: 6 June 2022.

DOI:10.1097/QAD.0000000000003367