



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD FARMACIA**

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS QUIMIOQUINAS
CXCL9 Y CXCL10 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN
IN VITRO DE LINFOCITOS B A CÉLULAS
PLASMÁTICAS”**

POR ROMINA ANDREA QUIROGA SANZANA

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado profesional de Magíster.

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dra. Estefanía Nova-Lamperti
Profesor Co-Guía: Dra. Alicia Colombo Flores
Laboratorio de Inmunología Molecular y Traslacional
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Octubre, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Estefanía Nova Lamperti, quien siempre me ha acogido con cariño, vocación y profesionalismo y me ha guiado la búsqueda del conocimiento a lo largo de todo el programa sin permitir que me rinda a pesar de las dificultades. A mis padres, Elena y Mario, quiénes me han brindado su amor y apoyo incondicional y son el pilar fundamental de mi vida. A mis hermanos, Gabriel y Claudia, quiénes han sabido darme su consejo, me han escuchado, me han orientado y jamás me han dejado sola. A mis compañeros de laboratorio y también mis amigos, por cada palabra de aliento y también por toda la ayuda que recibí de su parte al momento de realizar los experimentos, sin ellos nada de esto habría sido posible. A la Universidad de Concepción y al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología por recibirme en sus dependencias y brindarme las herramientas que fueron necesarias en todos estos años de formación.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	14
1. Generalidades sobre la COVID-19 y SARS-CoV-2	14
2. Producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en la población mundial	18
3. Estudio de la respuesta inmune humoral anti-SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 chilenos	23
3.1 Producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en pacientes COVID- 19 chilenos	24
3.2 Análisis del porcentaje de la población de células B RBD-específicas en pacientes COVID-19 chilenos	33
3.3 Estudio de los niveles circulantes de citoquinas y quimioquinas en pacientes COVID-19 chilenos	41
4. Quimioquinas CXCL9 y CXCL10	43
4.1 CXCL9 y CXCL10 se encuentran elevadas en patologías proinflamatorias	45
5. Receptor de quimioquinas CXCR3	50
6. Características fenotípicas de la diferenciación del linfocito B a células plasmáticas productoras de anticuerpos	55
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	61
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	61

HIPÓTESIS.....	62
OBJETIVO GENERAL	63
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
METODOLOGÍA	64
1. Reclutamiento de participantes y aspectos ético-legales.....	64
2. Aislamiento de linfocitos B y T desde sangre periférica de donantes sanos	64
3. Cultivos celulares.....	68
3.1. Optimización del sistema de cultivo de tres fases para linfocitos B.....	68
3.2. Sistema de cultivo de tres fases para la activación y diferenciación de linfocitos B	71
3.3. Sistema de cultivo de tres fases con adición de quimioquinas CXCL9 y CXCL10.....	73
3.4. Evaluación fenotípica del protocolo de activación y diferenciación del linfocito B.....	75
4. Evaluación de la expresión del receptor CXCR3	77
5. Análisis de la producción <i>in vitro</i> de anticuerpos IgG totales.....	77
6. Determinación del efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la expresión de CD40L durante la activación <i>in vitro</i> de linfocitos T <i>helper</i>	80
7. Análisis estadístico	83
RESULTADOS.....	85
Objetivo Específico 1: Evaluar la diferenciación <i>in vitro</i> de linfocito B a célula plasmática mediante el análisis de fenotipo y la expresión del receptor CXCR3	85
Objetivo Específico 2: Analizar el efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la diferenciación <i>in vitro</i> de linfocitos B y la producción de anticuerpos IgG provenientes de individuos sanos.....	105
Objetivo Específico 3: Determinar el efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la expresión de CD40L durante la activación <i>in vitro</i> de linfocitos T <i>helper</i>	123
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIÓN.....	143

BIBLIOGRAFÍA.....	145
ANEXOS.....	152
1. Sobre el consentimiento informado entregado a cada paciente	152
2. Sobre la correcta eliminación de los residuos generados	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquematización de la estructura del virus SARS-CoV-2 y su interacción con la célula huésped.....	17
Figura 2: Cinética de la producción de anticuerpos IgG específicos contra la proteína N y S en pacientes críticos y no críticos.	21
Figura 3: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección en pacientes severos, moderados y leves.	26
Figura 4: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.	29
Figura 5: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección determinados mediante CLIA de captura en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelados.	32
Figura 6: Los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770 reconocen a la célula B RBD específica.....	34
Figura 7: Porcentaje de la población de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección según severidad.	36
Figura 8: Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección según pacientes con secuelas pulmonares y no secuelados.	38
Figura 9: Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG y el porcentaje de células B RBD-específicas (CD20+RBD+) 4 meses luego de la infección.	40
Figura 10: Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG y las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 4 meses luego de la infección.....	42
Figura 11: Subtipos de receptores CXCR3 y ligandos relacionados que dan como resultado algunas funciones.	52

Figura 12: Resumen de subconjuntos de células B periféricas humanas definidas por fenotipo de superficie.	58
Figura 13: Proceso de diferenciación de las células B hasta células plasmáticas o B de memoria mediante la activación del linfocito T CD4+.	59
Figura 14: Esquema del procedimiento para el aislamiento de linfocitos B y T desde sangre periférica de donantes sanos.	67
Figura 15: Esquema general del procedimiento realizado para los cultivos celulares de linfocitos B.	74
Figura 16: Esquema general de la metodología utilizada en la determinación de anticuerpos IgG totales.	79
Figura 17: Esquema general de las condiciones de cultivo trabajadas con los linfocitos T CD4+ y sus respectivos marcajes.	82
Figura 18: Esquema del manejo estadístico de los resultados.	84
Figura 19: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados y no activados en fase 1.	87
Figura 20: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados y no activados en fase 2.	90
Figura 21: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados y no activados en fase 3.	93
Figura 22: Dot plot representativo de la expresión de CD138 en linfocitos B activados en Fase 3.	96
Figura 23: Porcentaje de expresión de los marcadores de diferenciación en linfocitos B durante las fases del sistema de cultivo.	98
Figura 24: Niveles de anticuerpos IgG totales desde el sobrenadante de cultivo de linfocitos B activados en fase 3 en comparación con el medio de cultivo.	100

Figura 25: Expresión de CD86 en linfocitos B durante las fases del sistema de cultivo.	102
Figura 26: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en linfocitos B durante las fases del sistema de cultivo.	104
Figura 27: Expresión de CD86 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.	106
Figura 28: Expresión de CD25 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.	108
Figura 29: Expresión de HLA-DR en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.	110
Figura 30: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 3.	112
Figura 31: Expresión de CD138 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 3.	115
Figura 32: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.	118
Figura 33: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 3.	120
Figura 34: Niveles de anticuerpos IgG desde el sobrenadante de cultivo de linfocitos B activados en fase 3 con o sin adición de CXCL9 o CXCL10.	122
Figura 35: Expresión de CD25, CXCR3 y CD40L en linfocitos T CD4+ activados con o sin adición de CXCL9 o CXCL10.	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los pacientes en estudio según severidad.	25
Tabla 2: Clasificación de los pacientes en estudio según padecimiento o no de síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS).	28
Tabla 3: Clasificación de los pacientes en estudio según secuelas pulmonares.	31
Tabla 4: Evidencia del aumento de CXCL9/10 en enfermedades inflamatorias.	48
Tabla 5: Sistema de cultivo de tres fases utilizado para la activación y diferenciación de linfocitos B.....	72
Tabla 6: Anticuerpos utilizados para evaluar por citometría de flujo el protocolo de activación y diferenciación de linfocitos B.....	76
Tabla 7: Anticuerpos utilizados para evaluar por citometría de flujo la activación de linfocitos <i>T helper</i>	81

RESUMEN

La investigación sobre la producción de anticuerpos durante la infección por SARS-CoV-2 ha revelado diferencias en los niveles de IgG dependiendo de la gravedad de los síntomas. En pacientes chilenos, se observaron altos niveles de IgG anti-SARS-CoV-2 en aquellos experimentaron una forma grave de la enfermedad, caracterizada por el síndrome de distrés respiratorio agudo severo y la presencia de secuelas pulmonares estructurales tras la infección por COVID-19. Además, se ha observado que las citoquinas y quimioquinas desempeñan un papel relevante en la infección. En particular, CXCL9 y CXCL10 están elevadas en pacientes severos en lo que se conoce como la "tormenta de citoquinas". Datos preliminares sugieren una correlación positiva entre los niveles circulantes de CXCL9 y CXCL10 y los niveles de IgG anti-SARS-CoV-2. Sin embargo, no está claro si estas quimioquinas podrían estar contribuyendo a la exacerbación de la respuesta de anticuerpos observada en estos pacientes. Es importante destacar que CXCL9 y CXCL10 también se han encontrado en muchas otras enfermedades inflamatorias, y se ha demostrado que su receptor (CXCR3) se expresa en linfocitos B y en linfocitos TCD4+ que desempeñan un papel en la respuesta de anticuerpos dependiente de células T. El objetivo general de este proyecto es analizar el efecto *in vitro* de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 sobre la respuesta inmune humoral en linfocitos B y T *helper* provenientes de individuos sanos. Se implementó un sistema de cultivo de tres fases optimizado para la

diferenciación de los linfocitos B *in vitro* que se evaluó en ausencia y presencia de CXCL9 o CXCL10, al igual que la activación *in vitro* de linfocitos T *helper*. Los cambios fenotípicos en ambas poblaciones se analizaron mediante citometría de flujo, mientras que producción de anticuerpos IgG totales se evaluó al término de protocolo mediante ELISA. La activación de las células B se confirmó con la regulación positiva de CD86 y CD25, mientras que la diferenciación de las células plasmáticas se confirmó con la presencia de células CD38^{hi}CD27^{hi} y CD138⁺. La expresión de CXCR3 también se reguló positivamente con el cóctel de activación utilizado en la fase 1 y se mantuvo durante la fase 2 y 3. En cuanto a la expresión de CD86, solo CXCL9 aumentó la expresión de este marcador, mientras que la presencia de CXCL9 y CXCL10 aumentó significativamente el porcentaje de células CD38^{hi}CD27^{hi}, células CD138⁺ y secreción de IgG. Finalmente, dentro del contexto de la inducción del cambio de clase de la célula B, observamos que CXCL9 también aumentó la expresión de CD40L en las células TCD4⁺. En resumen, demostramos que CXCL9 y CXCL10 podrían ser claves en la modulación de la respuesta humoral. A futuro, sería interesante determinar qué rutas de señalización utilizan estas quimioquinas para producir dicho efecto.

ABSTRACT

Current investigations about antibody production during SARS-CoV-2 infection has revealed variations in IgG levels depending on severity. In Chilean patients, high levels of IgG antibodies against SARS-CoV-2 were observed in those who experienced a severe form of the disease, characterized by severe acute respiratory distress syndrome and the presence of lung sequelae following COVID-19 infection. Additionally, cytokines and chemokines have been found to play a significant role in the infection. Specifically, CXCL9 and CXCL10 are elevated in severe patients, a phenomenon known as the "cytokine storm." Preliminary data suggests a positive correlation between circulating levels of CXCL9 and CXCL10 and IgG antibodies against SARS-CoV-2. However, it remains unclear whether these chemokines may contribute to the exacerbation of the antibody response observed in these patients.

CXCL9 and CXCL10 have also been detected in various other inflammatory diseases, and their receptor (CXCR3) have been shown to be expressed in B cells and CD4+ T helper cells involved in T cell-dependent antibody responses. The general aim of this project was to analyze the *in vitro* effect of CXCL9 and CXCL10 chemokines on the humoral immune response in B and T helper lymphocytes from healthy individuals. A three-phase culture system optimized for *in vitro* B cell differentiation was implemented and evaluated in the absence and presence of CXCL9 or CXCL10. *In vitro* activation of T helper lymphocytes was

also assessed. Phenotypic changes in both cell populations were analyzed using flow cytometry, while the production of total IgG antibodies was assessed at the end of the protocol using ELISA. B cell activation was confirmed by the upregulation of CD86 and CD25, and the differentiation of plasma cells was confirmed by the presence of CD38^{hi}CD27^{hi}, and CD138⁺ cells. The expression of CXCR3 was also upregulated with the activation cocktail used in phase 1 and remained consistent during phases 2 and 3. Regarding CD86 expression, only CXCL9 increased its expression, whereas the presence of CXCL9 and CXCL10 significantly increased the percentage of CD38^{hi}CD27^{hi} cells, CD138⁺ cells, and IgG secretion. Finally, in the context of B cell class switch induction, it was observed that CXCL9 also increased CD40L expression in CD4⁺ T cells.

In summary, this study demonstrated that CXCL9 and CXCL10 may play a crucial role in modulating the humoral response. In the future, it would be interesting to determine the signaling pathways through which these chemokines produce this effect.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre la COVID-19 y SARS-CoV-2

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una enfermedad infecciosa provocada por una nueva cepa de coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, conocido como SARS-CoV-2. El primer caso de infección fue reportado en diciembre de 2019 en Wuhan, China y rápidamente se propagó a lo largo del mundo, declarándose pandemia en marzo de 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

De acuerdo con la sintomatología presentada por los pacientes, se ha clasificado la clínica de los casos en leves, severos y críticos. Alrededor de un 81% de los pacientes infectados exhiben síntomas que van de leves a moderados, incluyendo fiebre, tos y, en algunos casos, neumonía leve; cerca del 14% cursa un cuadro severo caracterizado por disnea, frecuencia respiratoria mayor a 30 respiraciones por minuto, saturación de oxígeno $\leq 93\%$, relación entre presión arterial de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno (PaO_2/FiO_2) < 300 y/o infiltrado pulmonar $> 50\%$ entre 24 a 48 horas; mientras que aproximadamente un 5% sufre una sintomatología crítica exhibiendo insuficiencia pulmonar, shock séptico, y/o fallo multiorgánico, elevando el riesgo de muerte (Team, 2020).

El virus SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, específicamente al género de los betacoronavirus. Estos corresponden a virus envueltos, de ARN

monocatenario de sentido positivo (+ssRNA) y cuenta con cuatro proteínas estructurales (Figura 1A). La proteína espiga (S) media la entrada del virus a la célula huésped; la proteína de la nucleocápside (N) se encuentra involucrada en la transcripción y replicación del ARN, y las proteínas de la membrana (M) y de la envoltura (E), son más pequeñas y necesarias para el ensamblaje viral (Siracusano et al., 2020).

El ectodominio de la proteína S se organiza en dos subunidades (Figura 1B). La subunidad S1 N-terminal que contiene el dominio de unión al receptor (RBD), capaz de acoplarse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) ubicado en las células epiteliales alveolares humanas del tracto respiratorio y facilitar la unión a la célula diana. Esta interacción ocasiona un cambio conformacional en la subunidad S2 C-terminal de la proteína S, siendo ésta la porción responsable de la fusión de la membrana viral y la célula huésped, permitiendo la entrada del virus a la célula (Chambers et al., 2020).

La proteína S es considerada altamente inmunogénica debido a su capacidad de interactuar con el receptor ACE2 y, también, a su ubicación en la superficie de las partículas virales (Hoffmann et al., 2020; Walls et al., 2020).

Por su parte, la proteína N también posee una alta actividad inmunogénica, ya que, además de ser una de las principales proteínas estructurales, participa en la transcripción, replicación y el empaquetamiento del genoma, por lo que se expresa abundantemente durante la infección (Che et al., 2004). Debido a esto,

la producción de anticuerpos contra ambas proteínas ha sido ampliamente estudiada en los pacientes infectados con COVID-19.

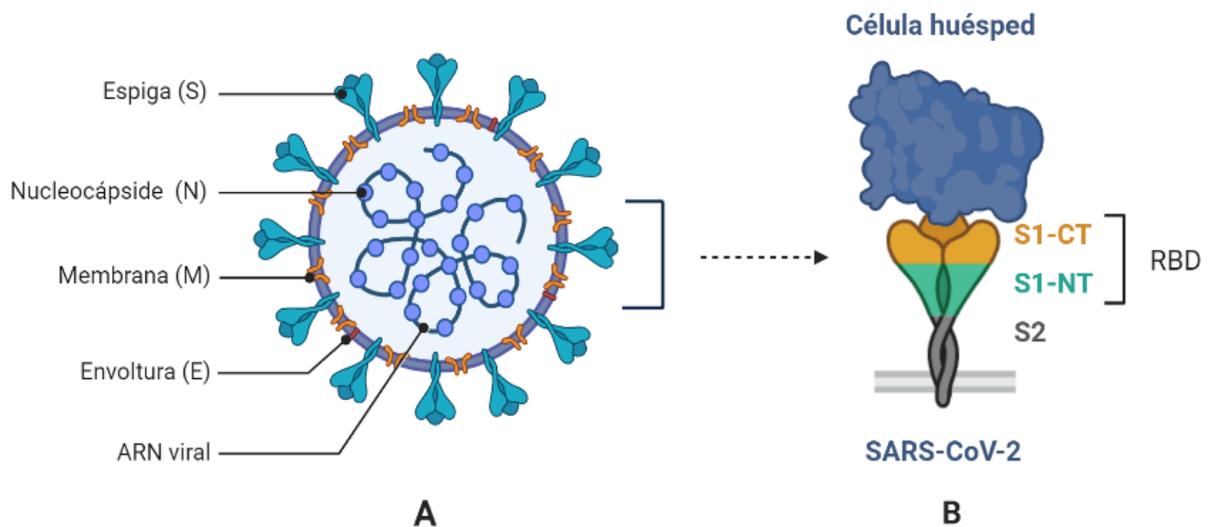


Figura 1: Esquematización de la estructura del virus SARS-CoV-2 y su interacción con la célula huésped.

A. Esquema del SARS-CoV-2 formado por 4 proteínas estructurales: S, N, M y E. **B.** Esquema de la proteína S que detalla el dominio de unión al receptor (RBD) ubicado en la subunidad S1 y que es capaz de unirse al receptor ACE2 de las células epiteliales alveolares y mediar la entrada del virus. Figura realizada en *Biorender*.

2. Producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en la población mundial

Los informes sobre la producción de anticuerpos IgG contra el virus se acumularon rápidamente desde la aparición de la enfermedad, destacándose una posible relación entre los niveles de éstos y la clínica desarrollada por el paciente. Tan y colaboradores en 2020 analizaron la respuesta de anticuerpos IgM e IgG específicos contra la proteína N del SARS-CoV-2 en muestras de suero de 67 pacientes en diferentes etapas de progresión de la enfermedad. Los pacientes fueron reclutados desde el Centro Médico de Salud Pública de Chongqing, China. Para el análisis la cohorte se dividió en 29 pacientes severos, quienes desarrollaron un cuadro de neumonía severo, y 35 pacientes no severos que cursaron con un cuadro de neumonía leve o moderado. Los anticuerpos IgM se detectaron el día 7 después de la infección y la tasa positiva alcanzó su punto máximo al día 28 y luego disminuyó a los 42 días, mientras que IgG apareció el día 10 y alcanzó el máximo nivel el día 42 después del inicio de la enfermedad, permaneciendo alta. Curiosamente en este estudio, los niveles de IgM e IgG son significativamente más altos en pacientes severos en comparación a los pacientes no severos (Tan et al., 2020).

Esta diferencia en la producción de anticuerpos comienza a ser un punto discrepante en las próximas investigaciones. Por ejemplo, otro informe sobre la dinámica del perfil de anticuerpos en pacientes con COVID-19 mostró que la seroconversión apareció secuencialmente para anticuerpos totales IgM e IgG contra las proteínas S y N, con una media de tiempo de 11 y 12 días,

respectivamente, y no se observaron diferencias entre pacientes críticos y no críticos (Zhao et al., 2020).

Dentro de este contexto, un estudio interesante fue el realizado por Sun y colaboradores, en donde se colectaron muestras de sangre de 38 pacientes entre 3 a 28 días tras el inicio de los síntomas y se analizaron los niveles de anticuerpos específicos para las proteínas N y S. Estas muestras se recolectaron de 27 pacientes no críticos, es decir, que no estuvieron internados en la UCI (Unidad de cuidados intensivos) lo que sería equivalente a pacientes leves y moderados, y de 11 pacientes críticos con sintomatología severa, internados en la UCI del Primer Hospital Afiliado de la Universidad Médica de Guangzhou en China.

Los resultados mostraron que, en la mayoría de los pacientes no críticos, la producción de anticuerpos obedecía a lo ya publicado en estudios anteriores, en donde los anticuerpos IgG anti-N y anti-S lograron sobrepasar los niveles de los IgM tras las dos semanas luego del comienzo de los síntomas, mostrándose dinámicas similares para ambos antígenos. Sin embargo, los autores describen que la dinámica observada en pacientes críticos es más irregular. Los niveles de anticuerpos N-IgG en todos los pacientes críticos alcanzaron niveles altos dentro de las 2 semanas posteriores al inicio de los síntomas (Figura 2A) sobrepasando los niveles alcanzados para pacientes no críticos (Figura 2B). Sin embargo, los niveles de anticuerpos S-IgG en pacientes críticos (Figura 2C) parecieron aumentar lentamente en comparación con el aumento de N-IgG en estos mismos pacientes y la producción de S-IgG en pacientes no críticos (Figura 2D). Por otro

lado, la producción de anticuerpos se comparó con los niveles de proteína C reactiva. La proteína C reactiva es una proteína de fase aguda que aumenta en gran cantidad en el plasma cuando el cuerpo está infectado o el tejido está dañado, siendo un marcador no específico de inflamación. Los hallazgos demostraron que, a medida que avanzaba la enfermedad, el aumento de IgG anti-S se correlacionaba positivamente con la disminución de la proteína C reactiva en pacientes no críticos, lo que no sucedió en pacientes críticos. En pocas palabras, mientras que los pacientes críticos tendían a producir mayores niveles de IgG anti-N que los pacientes no críticos, éstos últimos evidencian un cambio de clase de IgM a IgG anti-S más rápido y de niveles más altos que los pacientes críticos. Este resultado sugirió que el cambio de clase de IgM a IgG anti-S es vital para eliminar el virus y podría usarse como un indicador para predecir el resultado y el pronóstico de la enfermedad COVID-19, según proponen los autores (Sun et al., 2020).

Cabe destacar que todos estos estudios fueron realizados a comienzos de la pandemia por lo que fueron anteriores al proceso de vacunación de carácter mundial, siendo capaces de evidenciar cómo se desarrolla la respuesta inmune humoral natural contra el virus.

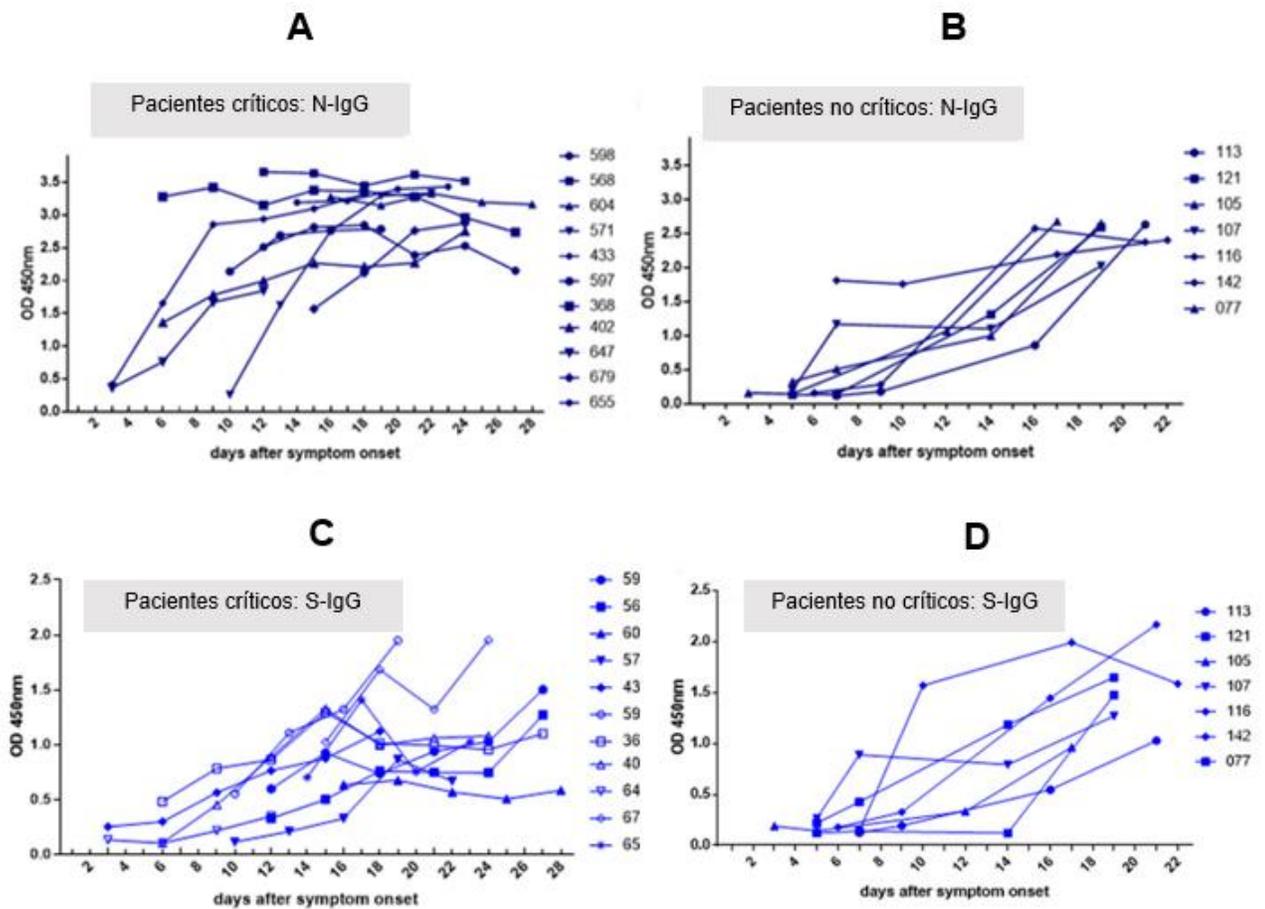


Figura 2: Cinética de la producción de anticuerpos IgG específicos contra la proteína N y S en pacientes críticos y no críticos.

A. Gráficos de la producción de anticuerpos N-IgG (IgG anti-N) en el tiempo en 11 pacientes críticos y **B.** 7 pacientes no críticos. **C.** Gráficos de la producción de anticuerpos S-IgG (IgG anti-S) en el tiempo en 11 pacientes críticos y **D.** 7 pacientes no críticos. (Fuente: Sun et al., 2020)

La gran cantidad de investigaciones que han sido publicadas hasta el día de hoy en cuanto a la temática ha permitido la realización de metaanálisis y estudios sistemáticos que apoyan la relación señalada. Qin y colaboradores publicaron recientemente un estudio sistemático en el que identificaron parámetros representativos de la disfunción inmune en pacientes con COVID-19 severos o con término fatal, entre los que consideraron los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2. De los 145 estudios elegidos, 13 estaban relacionados con la medición y el estudio de estos IgG en pacientes, de los cuales se concluyó que existía una diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos IgG de los pacientes severos en relación con los no severos. También se observó dentro de estos estudios, que los niveles de IgG eran estadísticamente mayores en los pacientes que no lograron sobrevivir en comparación con los que sí sobrevivieron (Qin et al., 2023). Por otro lado, Maniu y colaboradores realizaron una revisión bibliométrica de la respuesta de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos donde incluyeron 84 publicaciones. Sus resultados indican que la severidad se relaciona con una mayor respuesta humoral. Gran parte de los estudios revisados muestran que existen niveles más altos de IgG en pacientes pediátricos que cursaron con síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico asociado a COVID-19 (MIS-C) versus aquellos que no, como también se observó que los niveles eran significativamente mayores en pacientes pediátricos sintomáticos en comparación con los no cursaron un cuadro sintomático (Maniu et al., 2023).

3. Estudio de la respuesta inmune humoral anti-SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 chilenos

La funcionalidad de los anticuerpos producidos durante la enfermedad por SARS-CoV-2 aún no está del todo dilucidada y las investigaciones anteriormente mencionadas, han evidenciado que la producción de anticuerpos es bastante heterogénea según la sintomatología presentada por los pacientes durante el cuadro agudo de la infección. Por otro lado, es importante recalcar que la mayoría de las publicaciones realizadas a la fecha, incluyen población china, europea o estadounidense, haciendo necesaria la investigación en pacientes chilenos. Con el objetivo de aportar en la respuesta a esta problemática fue llevada a cabo mi tesis de pregrado para optar al título profesional de Bioquímico que lleva por nombre “Análisis de la producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 chilenos leves y severos”, la cual se encuentra enmarcada dentro del proyecto COVID1005 financiado por ANID (Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile). En esta investigación se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 mediante quimioluminiscencia (CLIA) de captura en 60 pacientes chilenos según la severidad de la sintomatología presentada durante la fase aguda de la enfermedad, secuelas pulmonares funcionales y estructurales, alteraciones presentadas en el metabolismo glucídico y también se determinó el porcentaje de células B RBD-específicas en circulación. Todos estos parámetros fueron estudiados tras 4 meses post infección.

3.1 Producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19 chilenos

Los resultados arrojaron que 4 meses tras la fase aguda de la enfermedad, la producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 estaba relacionada con la gravedad de los síntomas presentados por los pacientes (Tabla 1). Así, los pacientes severos mostraron niveles de anticuerpos IgG significativamente mayores que aquellos con sintomatología leve ($p=0,0002$) (Figura 3A y B). Este fenómeno también se vio reflejado en los pacientes que registraron síntomas moderados, quienes de igual forma presentaron niveles de anticuerpos significativamente más elevados que aquellos leves ($p=0,0006$).

Tabla 1: Clasificación de los pacientes en estudio según severidad.

	Total (n= 60)	Leve (n=18)	Moderado (n=17)	Severo (n=25)
Sexo				
Masculino	32 (53,33%)	6 (33,33%)	11 (64,71%)	15 (60,00%)
Femenino	28 (46,67%)	12 (66,66%)	6 (35,29%)	10 (40,00%)
Edad (años)	46,42 ± 13,13 (20-74)	39,28 ± 14,36 (20-69)	47,53 ± 11,19 (27-66)	50,80 ± 11,62 (27-74)

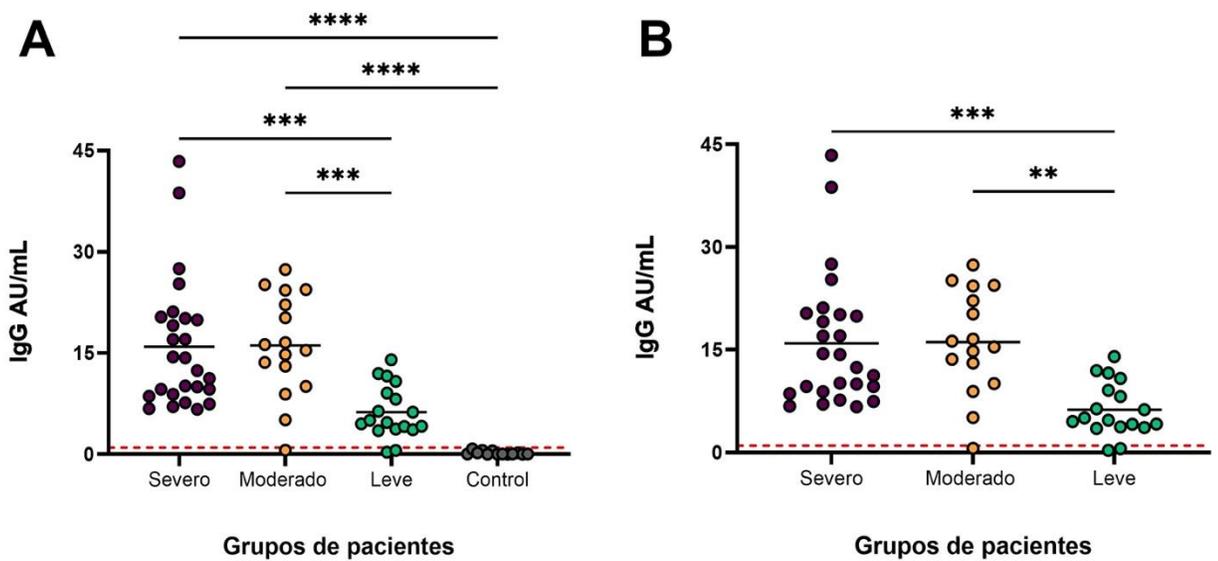


Figura 3: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección en pacientes severos, moderados y leves.

A. Niveles de IgG según severidad tras 4 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. **B.** Niveles de IgG según severidad tras 4 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura sin grupo control. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente.

Por otro lado, se utilizó una segunda clasificación para evaluar la severidad del cuadro en donde los pacientes en estudio fueron divididos según el padecimiento o no del síndrome de distrés respiratorio agudo o ARDS (por sus siglas en inglés, *Acute respiratory distress syndrome*). El síndrome de distrés respiratorio agudo constituye la complicación pulmonar máxima en aquellos pacientes con neumonía causada por la COVID-19. Este se define por la aparición de insuficiencia respiratoria aguda como principal síntoma, infiltrados pulmonares bilaterales diagnosticados a través de algún examen imagenológico y ausencia de disfunción cardíaca como causa fundamental del cuadro de insuficiencia respiratoria. La definición de Berlín (2012) considera cuatro criterios para el diagnóstico de ARDS: temporalidad, radiografía, origen de edema y oxigenación (Vera Carrasco, 2021).

Los resultados obtenidos para esta categoría indican que aquellos pacientes que padecieron distrés respiratorio durante la infección poseen niveles de IgG significativamente mayores que aquellos que no cursaron con el síndrome ($p=0,0004$) (Figura 4A y 4B) (Tabla 2). Ambos análisis, en su conjunto, indican que la sintomatología severa de la enfermedad se encuentra relacionada con niveles más altos de IgG anti-SARS-CoV-2.

Tabla 2: Clasificación de los pacientes en estudio según padecimiento o no de síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS).

	Total (n= 60)	ARDS (n=34)	No ARDS (n=26)
Sexo			
Masculino	32 (53,33%)	23 (67,65%)	9 (34,62%)
Femenino	28 (46,67%)	11 (32,35%)	17 (65,38%)
Edad (años)	46,42 ± 13,13 (20-74)	51,00 ± 11,66 (27-74)	40,42 ± 12,69 (20-69)

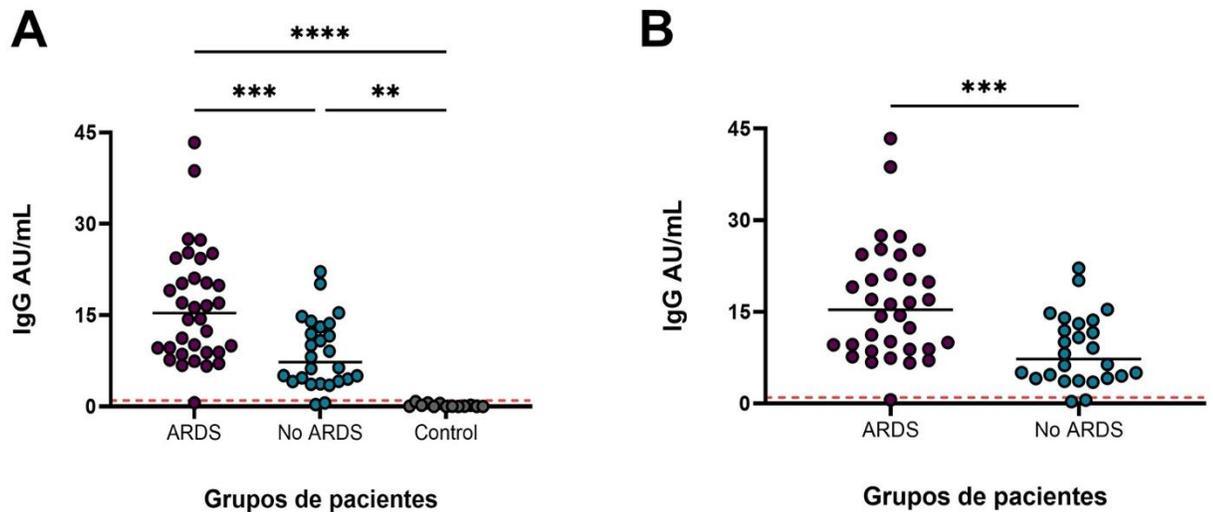


Figura 4: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.

A. Niveles de IgG según padecimiento de ARDS tras 4 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. **B.** Niveles de IgG según padecimiento de ARDS tras 4 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/mL). Para el análisis estadístico de los resultados de A se aplicó una prueba ANOVA, mientras que para B se realizó la prueba de Mann-Whitney. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Para los siguientes resultados se relacionaron los niveles de IgG con las secuelas estructurales y funcionales diagnosticadas en los pacientes 4 meses post infección (Tabla 3). Se consideraron pacientes con secuelas estructurales a aquellos que presentaron una tomografía computarizada de tórax (TC) alterada luego de ser revisada e informada por un médico de acuerdo con las anomalías observadas (*Total severity score* > 1). Mientras que los pacientes con secuelas funcionales fueron quienes exhibieron un examen DLCO (Prueba de difusión de monóxido de carbono) insuficiente ($DLCO < 80\%$). Este corresponde a una prueba funcional del aparato respiratorio en donde se evalúa la capacidad de los pulmones para transferir el oxígeno a la sangre.

Los resultados indican que aquellos pacientes con secuelas estructurales, es decir quienes poseían una TC alterada, presentaron niveles de IgG significativamente mayores en comparación con los pacientes no secuelados ($p=0,0232$) (Figura 5). Esta diferencia no se observa en pacientes que solo manifestaron secuelas funcionales (DLCO alterado), pero sí en aquellos con ambos parámetros alterados (TC y DLCO) ($p=0,0101$).

Tabla 3: Clasificación de los pacientes en estudio según secuelas pulmonares.

	Total (n= 60)	No secuelados (n=18)	TC (n=23)	DLCO (n=5)	TC + DLCO (n=14)
Sexo					
Masculino	32 (53,33%)	11 (61,11%)	14 (60,87%)	1 (20,00%)	6 (42,86%)
Femenino	28 (46,67%)	7 (38,89%)	9 (39,13%)	4 (80,00%)	8 (57,14%)
Edad (años)	46,42 ± 13,13 (20-74)	35,61± 10,27 (20-60)	48,91 ± 10,25 (33-64)	44,80 ± 10,50 (33-61)	56,79 ± 11,94 (27-74)

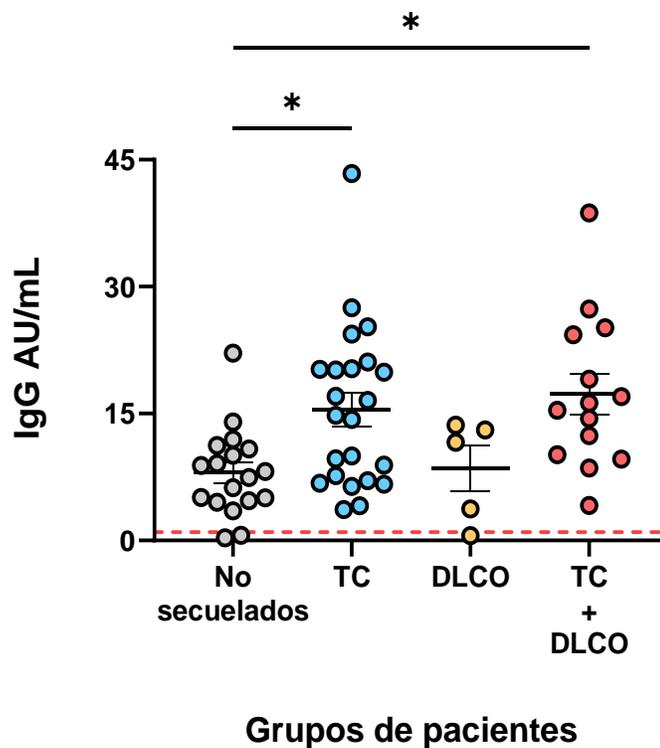


Figura 5: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección determinados mediante CLIA de captura en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelas.

La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

3.2 Análisis del porcentaje de la población de células B RBD-específicas en pacientes COVID-19 chilenos

Otro de los ensayos realizados en esta investigación fue la determinación del porcentaje de la población de células B RBD-específicas circulantes. En esta ocasión solo pudimos utilizar las muestras de 34 pacientes dentro del estudio (16 severos, 8 moderados y 10 leves) debido a la disponibilidad e integridad de la población celular criopreservada. Para llevar a cabo esta prueba, se utilizó un kit comercial distribuido por la empresa *Miltenyi Biotec (SARS-CoV-2 RBD Cell Analysis Kit; N° de catálogo 130-128-032)* capaz de reconocer a las células B RBD-específicas mediante la formación de un tetrámero-RBD, el que se forma tras el contacto de la porción RBD recombinante del SARS-CoV-2 asociada a biotina y estreptavidina unida a los fluoróforos PE o PE-Vio 770 (Figura 6). La célula B capaz de unirse a ambos tetrámeros es considerada una célula B RBD específica.

Para determinar el porcentaje de las células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 se analizaron los datos obtenidos luego de realizar la citometría de flujo mediante el software FlowJo 7.6.

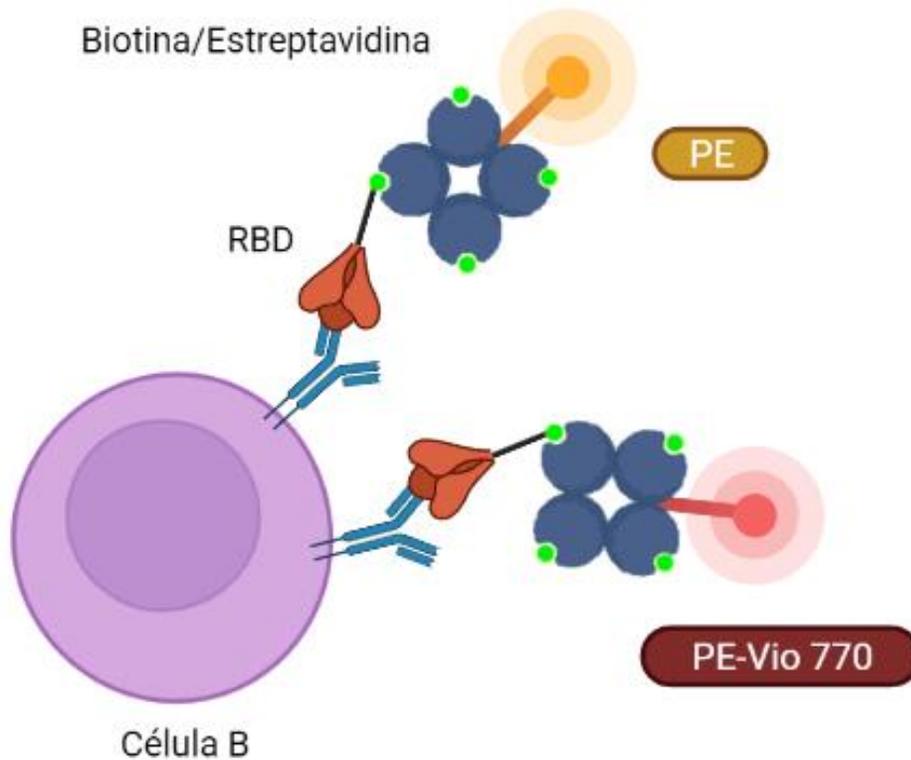


Figura 6: Los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770 reconocen a la célula B RBD específica.

Los tetrámeros de RBD se forman cuando la biotina que viene unida a la porción RBD es capaz de unirse a la estreptavidina conjugada con los fluoróforos PE (ficoeritrina) o PE-Vio 770. Si la célula es capaz de unirse a ambos tetrámeros entonces se considera una célula RBD específica anti-SARS-CoV-2. Figura realizada en *Biorender*.

Los porcentajes obtenidos para cada paciente fueron relacionados con los factores anteriormente mencionados. No se observó ninguna relación o diferencia significativa entre el porcentaje de células B RBD-específicas y los distintos grupos de pacientes (leves, moderados y severos). Incluso se observan valores similares entre los 3 grupos (Figura 7A), evidenciándose que 4 meses post infección todos los pacientes tenían una población circulante de estas células.

También, se procedió a realizar el análisis con los pacientes que padecieron o no padecieron distrés respiratorio agudo, en donde nuevamente no se encontró ninguna relación o diferencia relevante entre ambos grupos de pacientes (Figura 7B).

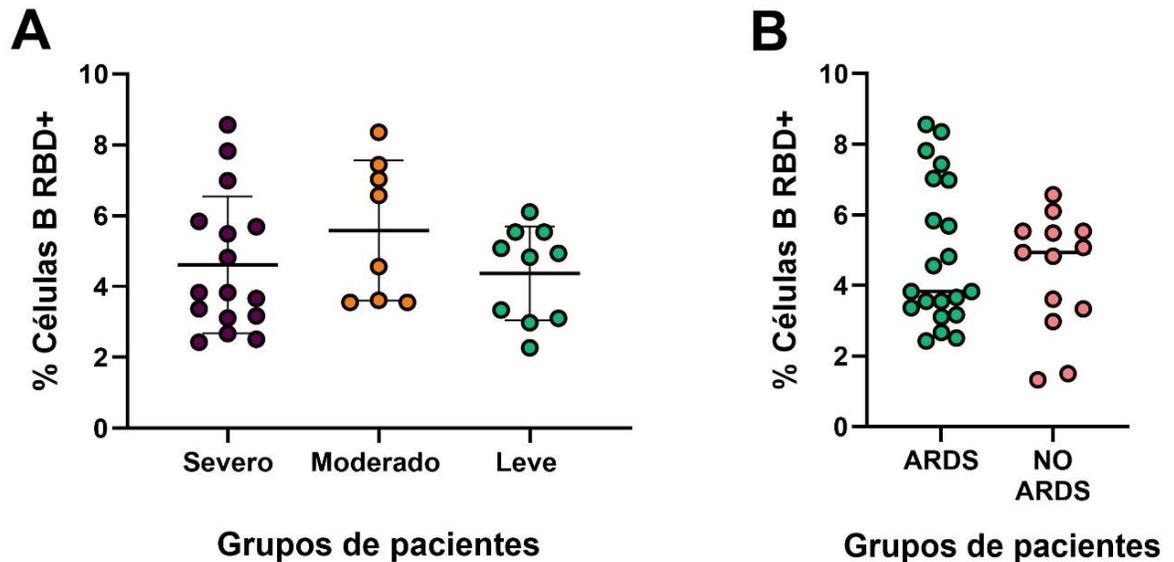


Figura 7: Porcentaje de la población de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección según severidad.

A. Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses en pacientes leves, moderados y severos. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. **B.** Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses en pacientes que padecieron o no ARDS. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba t con corrección de Welch en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Posteriormente, se hizo el análisis de la población de células B RBD-específicas anti-SARS-CoV-2 y su relación con las secuelas pulmonares (TC y DLCO) reportadas por los pacientes, donde no se observó ningún tipo de diferencia entre los grupos (Figura 8).

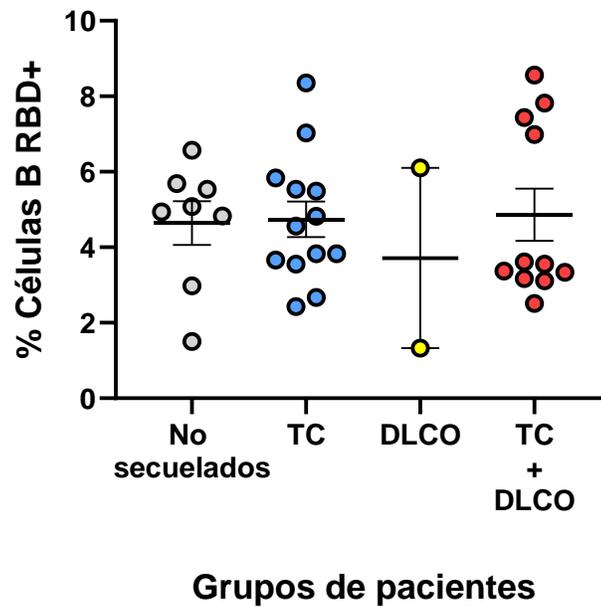


Figura 8: Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 4 meses post infección según pacientes con secuelas pulmonares y no secueledos.

Para el análisis estadístico se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

A continuación se correlacionaron los niveles de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 con el porcentaje de células B RBD específicas obtenido para todos las 34 muestras analizadas, obteniéndose una correlación nula con un valor r de Spearman igual a 0,06541 y un valor p de 0.7132 (Figura 9).

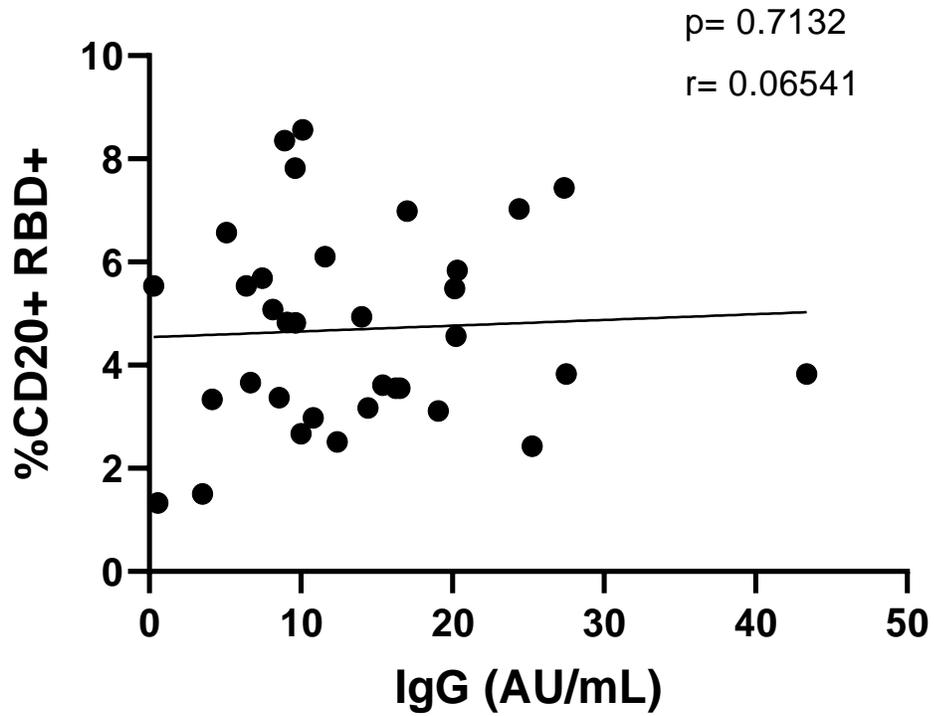


Figura 9: Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG y el porcentaje de células B RBD-específicas (CD20+RBD+) 4 meses luego de la infección.

Para el análisis estadístico se aplicó una prueba de correlación de Spearman, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias.

3.3 Estudio de los niveles circulantes de citoquinas y quimioquinas en pacientes COVID-19 chilenos

Los resultados obtenidos sobre el porcentaje de células B RBD-específicas fueron interesantes, ya que se pudo detectar que la presencia de esta población en sangre periférica es bastante diversa entre los pacientes del grupo estudiado y no es posible relacionarla con ningún parámetro considerado ni tampoco se correlaciona con los niveles de anticuerpos IgG informados. En la búsqueda de otros parámetros que tuvieran una participación importante en los estadios más severos y secueledos de la enfermedad, es que se consideraron los resultados del análisis de citoquinas y quimioquinas obtenido previamente en la tesis de pregrado para optar al título de Bioquímico de Sergio Sanhueza Novoa, titulada "Asociación de citoquinas con secuelas funcionales del pulmón en pacientes recuperados de COVID-19", la cual también se enmarca en el proyecto COVID1005. En esta investigación, las citoquinas IL-6, IL-8, IL-1b, IL-12 y TNF y las quimioquinas CXCL9, CXCL10, CCL2 y CCL5 fueron cuantificadas mediante la metodología CBA (*Cytometric Bead Array*).

Los valores obtenidos de la cuantificación de cada citoquina y quimioquina se correlacionaron con los niveles de anticuerpos IgG determinados para los pacientes en estudio. Como resultado, se obtuvo que las únicas correlaciones significativas de todo el grupo analizado fueron las obtenidas con las quimioquinas CXCL9 (Figura 10A) y CXCL10 (Figura 10B), tal como se puede evidenciar en las siguientes gráficas.

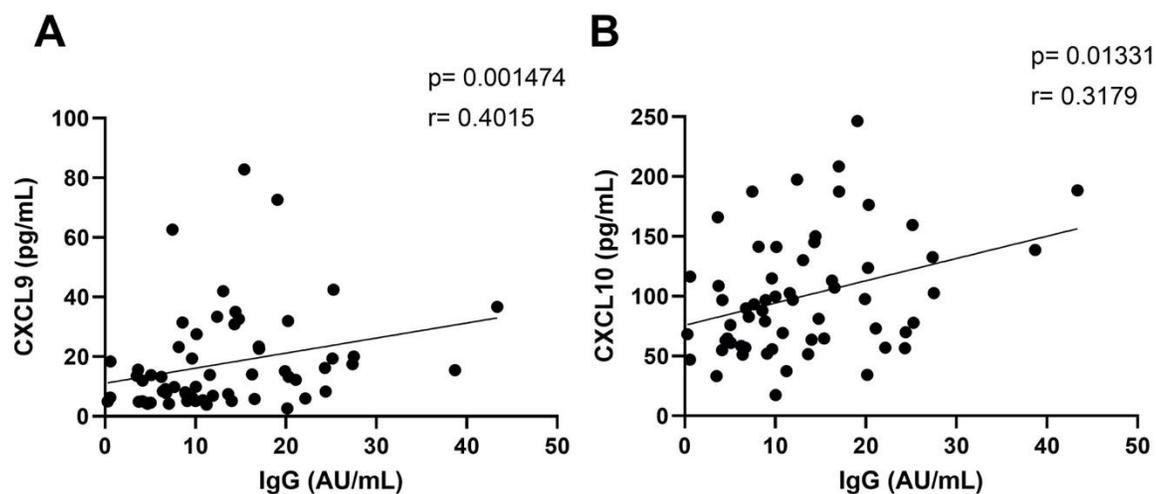


Figura 10: Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG y las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 4 meses luego de la infección.

A. Correlación entre los niveles de IgG y los valores de CXCL9. **B.** Correlación entre los niveles de IgG y los valores de CXCL10. Para ambos análisis estadísticos se aplicó una prueba de correlación de Spearman, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias.

4. Quimioquinas CXCL9 y CXCL10

Las citoquinas son pequeñas proteínas secretadas por las células que tienen un efecto específico en las interacciones y comunicaciones entre ellas. Son capaces de actuar sobre las células que las secretan (acción autocrina), sobre las células cercanas (acción paracrina) o, en algunos casos, sobre células distantes (acción endocrina). Es común que diferentes tipos de células secreten la misma citoquina o que una sola citoquina actúe en varios tipos de células diferentes. También son redundantes en su actividad, lo que significa que diferentes citoquinas pueden estimular funciones similares. A menudo se producen en cascada, ya que una citoquina estimula a sus células diana para que produzcan citoquinas adicionales, actuando de forma sinérgica o antagónica (Zhang & An, 2007).

Por otro lado, las quimioquinas constituyen un subgrupo dentro de las citoquinas y también reciben el nombre de citoquinas quimiotácticas. Corresponden a pequeñas moléculas quimioatrayentes que regulan el posicionamiento y reclutamiento celular en los tejidos, y desempeñan un papel fundamental en la embriogénesis, el desarrollo de tejidos y la respuesta inmunitaria. Las quimioquinas y sus receptores son, de hecho, mediadores esenciales de la migración dirigida de leucocitos, así como también de células cancerosas (Marcuzzi et al., 2018). También se ha descrito que cumplen un rol fundamental regulando el desarrollo y la maduración y la localización de los linfocitos, así como el desarrollo de los órganos linfoides (Griffith et al., 2014).

Las actividades biológicas que cumplen las quimioquinas están determinadas por las condiciones bajo las cuales son secretadas, sus receptores y las células que los expresan. De manera general, a estas se les atribuyen dos grandes funciones. Por un lado, existen las quimioquinas inflamatorias, las que se inducen en respuesta a estímulos inflamatorios y promueven el rápido reclutamiento de células inmunitarias en los tejidos infectados para eliminar patógenos, y por otro, se encuentran las quimioquinas homeostáticas quienes se expresan de forma constitutiva y participan en la orientación de la migración de células madres y progenitoras durante el desarrollo de órganos y la cicatrización de heridas, junto con la función inmunológica y migración celular en tejidos sanos (Ascencio, 2006). Dentro de las que cumplen acciones proinflamatorias, es donde encontramos a las quimioquinas CXCL9 y CXCL10.

CXCL9 (del inglés, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 9*) también conocida como monoquina inducida por interferón gamma (MIG), se encuentra en el cromosoma 4 humano. Media predominantemente la infiltración linfocítica, ya que juega un papel importante para inducir la quimiotaxis, y también es capaz de promover la diferenciación y multiplicación de leucocitos y suprimir el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Tokunaga et al., 2018).

CXCL10 (del inglés, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*) es también conocida como proteína 10 inducida por interferón- γ (IP-10), y tal como su nombre lo indica, es fuertemente inducida por IFN- γ así como por IFN- α/β y débilmente por TNF α (Qian et al., 2007). El gen que la codifica también se encuentra almacenado en

el cromosoma 4 humano y tiene como función principal la mediación de la respuesta inmune a través de la activación y el reclutamiento de leucocitos como células T, eosinófilos, monocitos y células NK, promoción de la adhesión de células T a células endoteliales, actividad antitumoral e inhibición de la angiogénesis (Dufour et al., 2002).

4.1 CXCL9 y CXCL10 se encuentran elevadas en patologías proinflamatorias

Existe amplia evidencia de que ambas quimioquinas, CXCL9 y CXCL10, se encuentran elevadas en procesos inflamatorios severos.

Por ejemplo, Zhong y colaboradores en 2021, realizaron un estudio sobre el efecto de CXCL9 y CXCL10 en la erosión ósea en pacientes con artritis reumatoide (AR). Para llevarlo a cabo, reclutaron a 105 pacientes con AR, 90 pacientes con osteoartritis (OA) y 25 controles sanos desde el Hospital Popular de la Universidad de Pekín. Se recopiló toda la información clínica de los pacientes y se midieron los niveles séricos de CXCL9 y CXCL10 tanto de pacientes como de controles sanos mediante ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Se compararon los niveles séricos de CXCL9 y CXCL10 entre diferentes grupos con los parámetros clínicos y la aparición de erosión ósea en la AR. Como resultados obtuvieron que los niveles de CXCL9 y CXCL10 fueron significativamente más altos en los pacientes con AR que en los pacientes con OA y controles sanos (todos $P < 0,01$). El análisis

de correlación de Spearman mostró que el nivel de CXCL9 en suero se correlacionó positivamente con las articulaciones inflamadas y el factor reumatoide (FR). Por otro lado, el nivel de CXCL10 en suero se correlacionó positivamente con articulaciones sensibles, proteína C reactiva, IgA, IgM, FR y anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPA). Además, los niveles séricos de CXCL9 y CXCL10 en los pacientes con AR con erosión ósea fueron extremadamente más altos que aquellos sin erosión ósea. Por lo que finalmente se concluyó que debido a que los niveles séricos de CXCL9 y CXCL10 fueron notablemente elevados en pacientes con AR y se correlacionaron con la aparición de erosión ósea, estas quimioquinas podrían estar involucradas en la patogénesis y destrucción ósea en la AR (Zhong et al., 2021).

Aparte de estar presentes en procesos inflamatorios autoinmunes, se consideran quimioquinas muy importantes en el contexto de la metástasis en cáncer. Pein y colaboradores, a partir del uso de un modelo animal lograron demostrar que las células diseminadas de cáncer de mama son capaces de promover un fenotipo inflamatorio en los fibroblastos de pulmón, induciendo la producción de CXCL9 y CXCL10 quienes impulsan la metástasis en los pulmones, la cual disminuye al interrumpir la vía de señalización asociada a estas quimioquinas (Pein et al., 2020).

Por último, cabe destacar que estas quimioquinas también se han relacionado con la COVID-19, sobre todo en su estadio más severo. Las características claves de las complicaciones pulmonares inducidas por el SARS-CoV-2 incluyen

una sobreexpresión de quimioquinas y citocinas proinflamatorias que contribuyen al fenómeno denominado "tormenta de citocinas". Callahan y colaboradores recogieron muestras de pacientes positivos para COVID-19 quienes también mostraron aumentos marcados en las transcripciones de CXCL9, CXCL10 y CXCL11, concluyendo así que la presencia de estas quimioquinas puede estar contribuyendo a la patogénesis del SARS-CoV-2 a través de la hiper-inflamación (Callahan et al., 2021).

A pesar de las patologías recientemente mencionadas, existe mucha más evidencia de la presencia de estas quimioquinas en procesos inflamatorios patológicos que sustenta los resultados expuestos. Además, en la mayoría de estas investigaciones la presencia elevada de estas quimioquinas se relaciona con un estadio grave de la enfermedad en cuestión o se asocia a mayor daño en los tejidos afectados por ésta. La siguiente tabla (Tabla 4) es un resumen de los estudios más actuales sobre el tema y sus hallazgos.

Tabla 4: Evidencia del aumento de CXCL9/10 en enfermedades inflamatorias.

Quimioquinas estudiadas	Patología	Hallazgos	Referencia
CXCL9, CXCL10	Vitiligo	El estudio de biopsias de pacientes con vitiligo en distintas fases evidenció una población de queratinocitos que secreta CXCL9/10 creando sitios inflamatorios locales activos en el vitiligo estable que podrían potenciar la persistencia de la lesión.	(Shiu et al., 2022)
CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11	Hepatitis B crónica (HBC) y carcinoma hepatocelular (CHC)	Los pacientes con HBC poseen niveles séricos de CXCL8/9/10/11 significativamente mayores que los controles sanos. También se realizó un ensayo de infección con el virus de la HB en células HepG2.215 en donde la expresión de ARNm para CXCL8/9/10/11 fue significativamente mayor tras la infección y también aumentaron los niveles secretados. Además, tras un estudio bioinformático se concluyó que la expresión de CXCL9/10/11 en tejidos con CHC fue significativamente mayor que en tejidos normales.	(Yu et al., 2022)
CCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10	Rosácea	El estudio reveló que la concentración sérica de CCL3, CXCL8/9/10 era significativamente más elevada en pacientes con rosácea que en controles sanos, en donde los valores para CXCL9/10 se correlacionaron con la gravedad de la lesión según la evaluación médica. Se utilizó un modelo de ratón similar a la rosácea en donde la expresión del ARNm de los receptores correspondientes de CCL3 (CCR1), CXCL8 (CXCR1/CXCR2), CXCL9/10 (CXCR3) aumentó significativamente en comparación al control.	(Liu et al., 2022)
CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10	Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C)	Los pacientes con MIS-C mostraron niveles plasmáticos más altos para CCL2, CXCL8/9/10 que los niños con COVID-19 sin MIS-C, relacionándose con el daño cardiovascular y multisistémico observado en este síndrome.	(Caldarale et al., 2021)

CXCL8, CXCL9, CXCL10	Sífilis	Se observó que pacientes con sífilis seroresistentes poseen niveles séricos de CXCL8/9/10 significativamente más aumentados en comparación con controles sanos.	(Dong et al., 2021)
CXCL9, CXCL10	Sarcoidosis	Se realizó un estudio longitudinal (~5 años) en pacientes con sarcoidosis donde se observó que los niveles de CXCL10 se correlacionaron negativamente con las determinaciones de los tests de capacidad vital forzada (CVF), capacidad pulmonar total (CPT) y DLCO de forma inicial y durante 2 años, mostrando, además, una correlación positiva con la gravedad de los síntomas respiratorios longitudinales mientras que CXCL9 se correlacionó positivamente con el daño sistémicos en el inicio del estudio.	(Arger et al., 2020)

5. Receptor de quimioquinas CXCR3

CXCL9 y CXCL10 poseen a CXCR3 como receptor común. CXCR3 (del inglés, *C-X-C motif chemokine receptor 3*) es un receptor de quimioquinas acoplado a proteína G que abarca 7 dominios transmembrana y también es el receptor de los factores quimiotácticos CXCL4 y CXCL11. El gen CXCR3 está ubicado en el brazo largo del cromosoma X en la región q13.27. Con respecto a las secuencias de aminoácidos, CXCR3 se clasifica en tres tipos, incluidos CXCR3-A, CXCR3-B y CXCR3-alt (Figura 11). La variante CXCR3-A es el receptor que se expresa con mayor frecuencia en la superficie de las células inmunitarias, mientras que CXCR3-B se expresa en los otros tipos de células y puede unirse a CXCL4 junto con CXCL9, CXCL10 y CXCL11, y parece estar involucrado en la angiogénesis. En el caso de CXCR3-alt, se activa solo por CXCL11 y se conoce como una variante expresivamente acortada que contiene solo cuatro hélices transmembrana. CXCR3 no solo se expresa en células inmunitarias, sino que también está presente en células residentes tales como células endoteliales, pericitos vasculares y células mesangiales. Además, se encuentra establecido que las respuestas antitumorales relacionadas con CXCR3 están mediadas por la migración de linfocitos CD4+, linfocitos T citotóxicos CD8+, células *natural killer* (NK) y células NKT (Nazari et al., 2020).

La señalización a través de CXCR3-A estimula la proliferación y migración celular, mientras que las señales CXCR3-B inhiben angiogénesis, proliferación y

migración, pero puede estimular la apoptosis. Por otro lado, la señalización a través de CXCR3-alt no está del todo clara aún (Ma et al., 2015).

En cuanto a su función en linfocitos, CXCR3 se expresa en gran medida en las células T efectoras y desempeña un papel importante en el tráfico y la función de las células T. CXCR3 se induce rápidamente en las células vírgenes después de la activación y preferentemente permanece altamente expresado en las células T CD4+ de tipo Th1 y en las células T CD8+ efectoras. Otros estudios también han sugerido que CXCR3 juega un papel en la migración de las células T en el microambiente del tejido periférico y el compartimento linfoide, facilitando la interacción de las células T con las células presentadoras de antígenos que conducen a la generación de células efectoras y de memoria (Groom & Luster, 2011). CXCR3 también se expresa altamente en linfocitos innatos, como las células NK y las células NKT, donde se cree que CXCR3 participa en la localización de estos defensores de primera línea en los sitios de infección e inflamación (Thomas et al., 2003). Además, CXCR3 se expresa en células dendríticas (CD) y en subconjuntos de células B, donde puede desempeñar un papel en la migración de estas células en el ganglio linfático inflamado (Nanki et al., 2009).

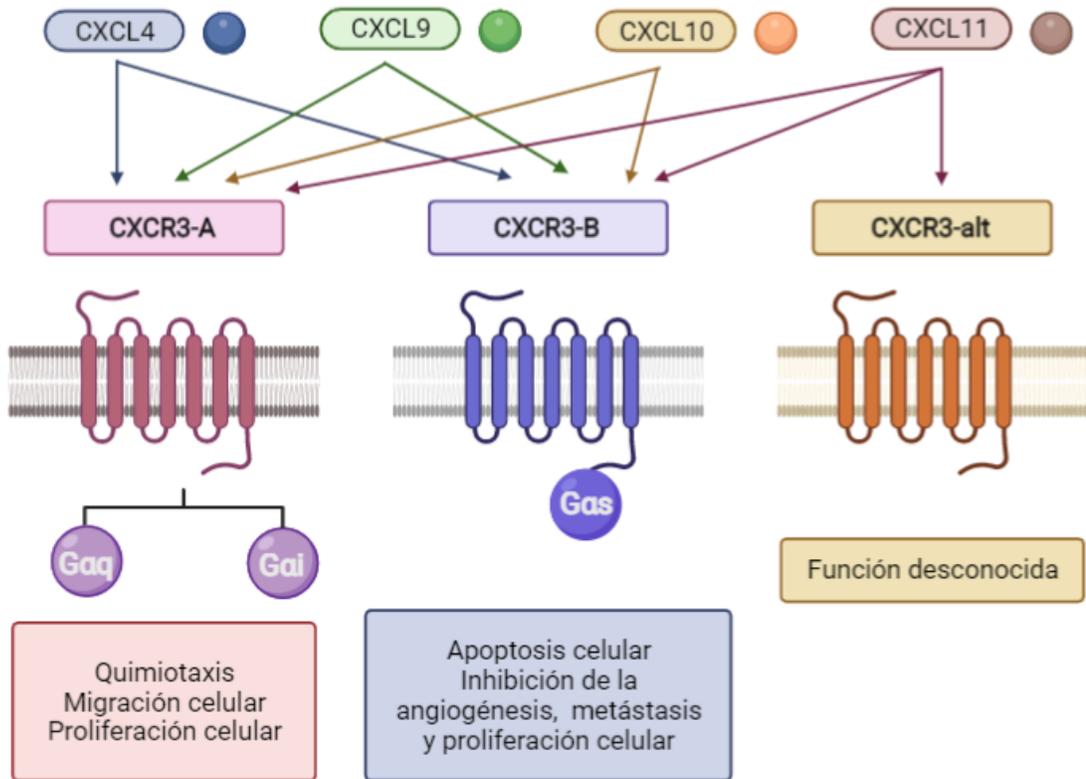


Figura 11: Subtipos de receptores CXCR3 y ligandos relacionados que dan como resultado algunas funciones.

Imagen realizada en *Biorender*. (Fuente: Nazari et al., 2020).

Por otro lado, Muehlinghaus y colaboradores, han observado que la expresión de este receptor cambia a lo largo del proceso de diferenciación de los linfocitos B. CXCR3 y CXCR4 son expresados en precursores de células plasmáticas de IgG formadas en las respuestas inmunitarias de memoria convirtiéndose en moduladores cruciales de la localización de estas células. Estos investigadores estudiaron la regulación de la expresión de estos receptores de quimioquinas durante la diferenciación de las células B de memoria humanas en células plasmáticas, demostrando que CXCR3 está ausente en las células B *naive* CD27-, pero se expresa en una fracción de las células B de memoria, preferentemente en aquellas que coexpresan IgG1. Al diferenciarse en precursores de células plasmáticas, las células B de memoria CXCR3+ mantienen la expresión de este receptor de quimiocinas. Las células B de memoria CXCR3- regulan al alza CXCR3 y migran hacia los gradientes de concentración de sus ligandos solo cuando se co-estimulan con interferón γ (IFN- γ), pero no con interleuquina 4 (IL-4), IL-1 β , IL-6, IFN- α , IFN- β o TNF- α . Estos resultados muestran que la expresión de CXCR3 en células B de memoria y precursores de células plasmáticas es inducida por IFN- γ , preferentemente proporcionado por células T *helper* humanas durante la respuesta inmunitaria. Una vez inducida en las células B de memoria, la expresión de CXCR3 sigue siendo parte de la memoria celular individual (Muehlinghaus et al., 2005).

Un estudio reciente, hace énfasis en lo necesaria que son las células T foliculares auxiliares (Thf) en el cambio de clase de los linfocitos B y en el aumento de la

expresión de CXCR3 en su membrana. Arroyo-Díaz y colaboradores estudiaron el proceso de activación y diferenciación de las células B de memoria residentes en los pulmones durante la infección por influenza en un modelo de ratón. Estas células son capaces de diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos después de la reinfección, proporcionando una mejor protección pulmonar. Los análisis cinéticos revelaron que las células B de memoria residentes específicas para la nucleoproteína (NP) de la influenza se diferenciaban preferentemente poco después de la infección y requerían ayuda de las células Thf. Durante la infección por influenza, tanto las células Thf como las B están presentes en los centros germinales de los ganglios linfáticos que drenan los pulmones. Las células B de memoria preparadas contra el virus de la influenza comienzan a aparecer en los pulmones el día 10 tras la infección y su número alcanza su punto máximo el día 30. Sin embargo, los investigadores descubrieron que, si los ratones tenían deficiencia de células Thf, o si estas eran bloqueadas por un anticuerpo, las células B de memoria residentes de pulmón no se acumulaban. Por lo tanto, se requiere la ayuda de las células Thf para las respuestas específicas de cambio de clase en la influenza. La diferenciación de las células B de memoria residentes coincidió temporalmente con la producción transitoria de IFN- γ por parte de las células Thf. Los resultados evidenciaron que se requiere IFN- γ para la expresión del factor de transcripción T-bet por parte de las células B del centro germinal, lo que promueve la diferenciación de un subconjunto de células B CXCR3+ de centro germinal que eran precursoras de

células B de memoria residentes de pulmón. La ausencia de señalización de IFN- γ o T-bet en las células B de centro germinal impidió la expresión de CXCR3 en las células precursoras obstaculizando la diferenciación de las células B de memoria CXCR3+ y, por ende, sus respuestas posteriores. Por lo tanto, se concluyó que el IFN- γ derivado de células Th1 es fundamental para la diferenciación de las células B de memoria residentes de pulmón, la inmunidad pulmonar y también para el aumento en la expresión de CXCR3 (Arroyo-Díaz et al., 2023).

6. Características fenotípicas de la diferenciación del linfocito B a células plasmáticas productoras de anticuerpos

Durante el proceso de diferenciación celular es posible distinguir en qué fase se encuentran la célula a partir de la expresión de distintos marcadores de superficie según los estadios que atraviesa (Figura 12). Los linfocitos B de transición migran desde la médula ósea hacia la circulación periférica y los órganos linfoides secundarios (Anolik et al., 2008). Estas primeras células B que reconstituyen la periferia humana son CD10+ CD38^{high} CD24^{high} (Kaminski et al., 2012). Esta primera fase del desarrollo de las células B es independiente del antígeno y conduce a que las células B tengan un receptor de células B (BCR) de membrana funcional, mientras que la segunda fase de la diferenciación de las células B, impulsada por la estimulación del antígeno, tiene lugar en los órganos linfoides periféricos y conduce a las células de memoria o células plasmáticas.

La unión del antígeno al BCR produce señales bioquímicas hacia el interior de la célula, iniciando así su proceso de activación. Por otro lado, para llevar a cabo el proceso de diferenciación de estas células, es fundamental la presencia de los linfocitos T CD4+ vírgenes quienes también se activan en los órganos linfoides (específicamente en las zonas de linfocitos T) gracias a la presentación antigénica mediada por las células dendríticas en el contexto del MHC de clase II. Así, por medio del gradiente de secreción de ciertas quimioquinas como CCL19 y CCL21 y la regulación en la expresión de receptores, es que linfocitos B y T CD4+ comienzan a acercarse (Abbas et al., 2018). El antígeno reconocido por el BCR del linfocito B es internalizado y es procesado con el fin de generar fragmentos peptídicos que serán presentados en asociación a moléculas del MHC de clase II al linfocito T CD4+. El linfocito T CD4+ reconoce el complejo MHC II-péptido en los linfocitos B, estimulando la respuesta en estas células. Además, al activarse el linfocito T CD4+ expresa el ligando para CD40 (CD40L) que se une a su receptor CD40 situado en la superficie del linfocito B, e induce la proliferación y diferenciación de éstos en focos extra foliculares y luego en los centros germinales. A su vez, los linfocitos T CD4+ secretan citoquinas que permiten la proliferación y el cambio de isotipo en los linfocitos B y mantienen los centros germinales. Tras este proceso de activación, la célula B podrá diferenciarse a una célula plasmática productora de anticuerpos o a células B de memoria, que guardan información sobre el patógeno para proporcionar inmunidad en el futuro (Figura 13) (Bishop & Hostager, 2001). Así, luego de

finalizar estas etapas, las células B de memoria se caracterizarán por presentar un fenotipo CD20+CD19+CD27+CD38- y los plasmablastos tempranos CD20-CD19+CD27++CD38++ (Jourdan et al., 2009). Las características de las células plasmáticas, como tamaño grande, poca o ninguna inmunoglobulina de superficie y la falta de proliferación, se corresponden con la expresión de la molécula de adhesión CD138 en células B CD38^{high}. Mientras que los plasmablastos circulantes pueden proporcionar el impulso transitorio observado en los niveles séricos de Ig existentes después de algún proceso de vacunación o de infección aguda, las células plasmáticas de médula ósea CD138+ de vida prolongada probablemente sean responsables de los anticuerpos séricos reactivos al antígeno de vida prolongada, porque las células B de memoria circulantes detectables al mismo tiempo no son necesarias para anticuerpos específicos de larga duración en suero (Kaminski et al., 2012).

Name	Type	Phenotype	Markers to sub-fractionate	Ascribed functions
Transitional	T1	IgD⁺CD27^{neg} CD10 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high}		Precursor to T2; IL10 production (?)
	T2	IgD⁺CD27^{neg} CD10 ⁺ CD24 ^{high/+} CD38 ^{high/+}		Precursor to T3; IL10 production (?)
	T3	IgD⁺CD27^{neg} CD10 ^{neg} CD24 ^{+/low} CD38 ^{+/low}		Precursor to mature-naïve; IL10 production (?)
Mature-naïve		IgD⁺CD27^{neg} CD10 ^{neg} CD24 ^{+/low} CD38 ^{+/low}	CD23, CD69, CD80, CD86	Precursor to GC, memory, and antibody-secreting cells
Memory	Double-negative	IgD^{neg}CD27^{neg}	CD21, CD24, CD95, CXCR3	Recall responses (and effector functions?)
	Non-switched	IgD⁺CD27⁺	CD1c, CD21, CD24	Immunoprotective self antibody (?); circulating MZ-like (?); regulatory (?)
	IgM-only	IgM ⁺ IgD^{neg}CD27⁺	CD1c, CD21, CD24	Immunoprotective self antibody (?); circulating MZ-like (?); regulatory (?)
	Switched	IgM ^{neg} IgD^{neg}CD27⁺	CD21, CD24, CD95, CXCR3	Pathogen protection; autoimmune pathology
Antibody-secreting cell	Plasmablast	IgD^{neg}CD27^{high} CD38 ^{high} CD138 ^{neg}	CD20, HLA-DR	Antibody secretion
	Plasma cell	IgD^{neg}CD27^{high} CD38 ^{high} CD138 ⁺	CD20, HLA-DR	Antibody secretion

Figura 12: Resumen de subconjuntos de células B periféricas humanas definidas por fenotipo de superficie.

Fuente: Kaminski et al., 2012.

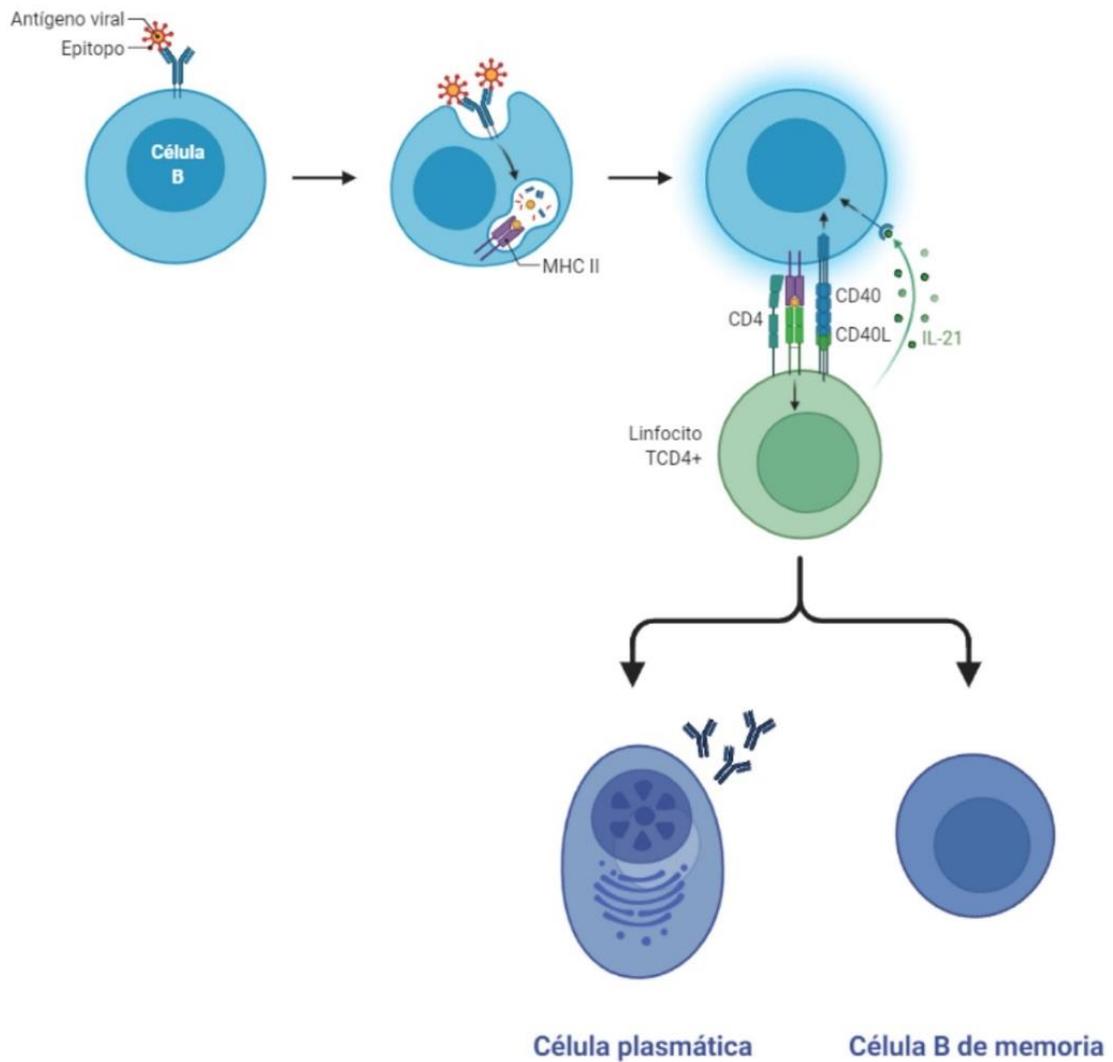


Figura 13: Proceso de diferenciación de las células B hasta células plasmáticas o B de memoria mediante la activación del linfocito T CD4+.

El BCR de las células B es capaz de reconocer el antígeno e internalizarlo para procesarlo y luego presentarlo en el contexto del MHC II al linfocito T CD4+. La interacción del CD40/CD40L e IL-21 produce la activación y proliferación de la

célula B que posteriormente es capaz de diferenciarse a una célula plasmática productora de anticuerpos o a una célula B de memoria.

Adaptado de “*Steps in B-cell Differentiation*”, por *Biorender* (2023) recuperado de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se tiene evidencia de que la producción de anticuerpos IgG en pacientes COVID-19 se encuentra aumentada significativamente y está relacionada con la severidad del cuadro clínico. Además, nuestra investigación anterior describió que la producción de anticuerpos IgG está asociada con secuelas pulmonares estructurales y que el número de células B RBD-específicas no difiere de acuerdo con la severidad ni se encuentra relacionado con los niveles de IgG. Por lo que se desconoce qué factor o factores son capaces de inducir esta exacerbación de la respuesta humoral en pacientes COVID-19 severos. Por otro lado, la data analizada arrojó correlaciones significativas entre los niveles de IgG y las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, quienes juegan un papel fundamental en procesos inflamatorios severo asociándose con daño en tejidos o sistémico en los estadios severos de un gran grupo de enfermedades, por lo que se propone que estas quimioquinas podrían estar jugando un papel importante en la exacerbación de la respuesta de anticuerpos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto que tienen las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 en la diferenciación *in vitro* de linfocitos B?

HIPÓTESIS

Las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 potencian el proceso de diferenciación *in vitro* de linfocitos B.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto *in vitro* de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 sobre la respuesta inmune humoral en linfocitos B y T *helper* provenientes de individuos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la diferenciación *in vitro* de linfocito B a célula plasmática mediante el análisis de fenotipo y la expresión del receptor CXCR3.
2. Analizar el efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la diferenciación *in vitro* de linfocitos B y la producción de anticuerpos IgG provenientes de individuos sanos.
3. Determinar el efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la expresión de CD40L durante la activación *in vitro* de linfocitos T *helper*.

METODOLOGÍA

1. Reclutamiento de participantes y aspectos ético-legales

Seis individuos sanos, es decir, que no cursaban ningún síntoma o enfermedad crónica al momento de la toma de muestra notificado por auto reporte, fueron reclutados para participar en el estudio y en los experimentos descritos a continuación. Esta invitación fue de carácter voluntario y se realizó mediante la firma de un consentimiento informado. Además, todos los métodos se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki y las buenas prácticas clínicas (ANEXO 1). Cabe recalcar que no se utilizaron ni se capturaron datos de los donantes, sino únicamente se trabajó con la muestra donada por estos.

2. Aislamiento de linfocitos B y T desde sangre periférica de donantes sanos

La toma de muestra de sangre (~50 mL) fue realizada mediante venopunción en tubos de recolección con EDTA. De estas muestras se aislaron las células mononucleares de sangre periférica de los donantes sanos mediante un gradiente de separación por densidad utilizando el reactivo Ficoll-Paque™ PLUS (*Cytiva*; N° de catálogo: 17144002) sometiendo las muestras a una centrifugación a 2000 rpm por 20 minutos, que permitió aislar el anillo de células mononucleares. Las células aisladas fueron lavadas con buffer PBS (*Gibco*; N° de catálogo: 18912-014) (del inglés, *phosphate buffered saline*) con el fin de quitar los restos

del reactivo Ficoll-Paque™ nuevamente mediante una centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos, para luego ser resuspendidas en buffer PBS.

Terminado este procedimiento, el recuento celular se realizó utilizando 10 µL de muestra y 90 µL del reactivo azul de tripán como indicador de muerte celular. Una pequeña alícuota de esta mezcla se utilizó para realizar el recuento al microscopio mediante cámara de Neubauer.

Desde las células mononucleares aisladas, se realizó la separación de linfocitos B y T utilizando la separación por MACS (*Magnetic-activated cell sorting*) que permite aislar células mediante el uso de nanopartículas magnéticas recubiertas de anticuerpos contra un antígeno de superficie particular. Entonces, tras una incubación las células que expresan este antígeno se adhieren a las nanopartículas magnéticas. La solución de las células junto con las nanopartículas se transfiere a una columna que se encuentra adherida a un fuerte campo magnético posibilitando que las células (que expresan el antígeno) unidas a las nanopartículas, permanezcan en la columna debido a la atracción magnética mientras que las células que no expresan el antígeno fluyen a través de ella. Con este método, las células se pueden separar positiva o negativamente con respecto a antígenos particulares.

En este caso, desde el total de células mononucleares obtenidas de sangre periférica se procedió a realizar, en primera instancia, la selección positiva para el antígeno CD4 (Linfocitos T CD4+). Con las células CD4- restantes, se realizó una separación negativa para linfocitos B (CD20+) mediante el uso de un cóctel

de anticuerpos contra los antígenos CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a. Ambas separaciones se llevaron a cabo mediante kits de separación, siguiendo los protocolos proporcionados por la empresa *Miltenyi Biotec* (*CD4+ T Cell Isolation Kit, human*; N° de catálogo: 130-096-533; *B cell Isolation Kit II, human*; N° de catálogo: 130-091-151).

Finalmente, la pureza de ambas poblaciones de linfocitos fue analizada por medio de citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD20 (*eBioscience*; N° de catálogo: 56-0209-42) y un anticuerpo anti-CD4 (*BioLegend*; N° de catálogo: 317450) (Figura 14).

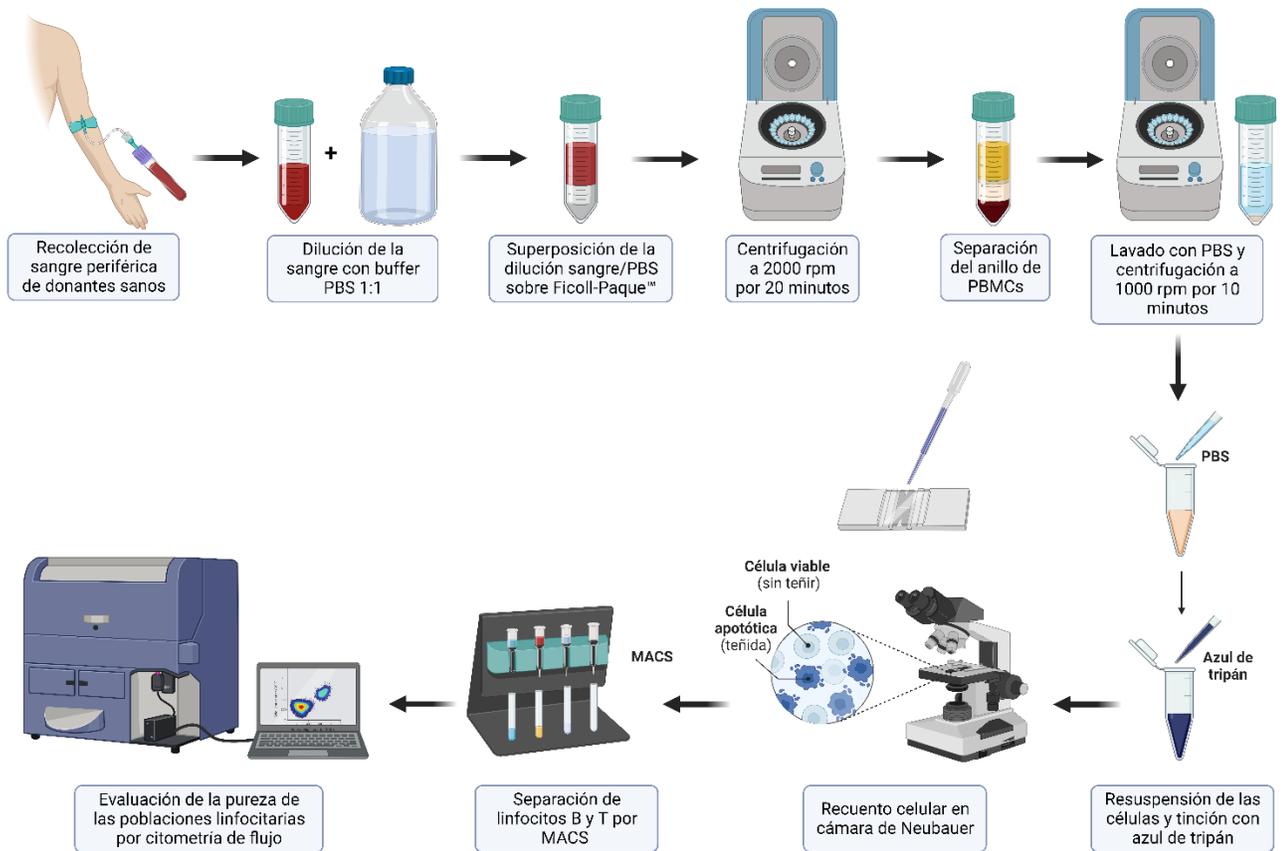


Figura 14: Esquema del procedimiento para el aislamiento de linfocitos B y T desde sangre periférica de donantes sanos.

Figura realizada en *Biorender*.

3. Cultivos celulares

3.1. Optimización del sistema de cultivo de tres fases para linfocitos B

Una vez que la población de linfocitos B CD20+ fue aislada, se inició el proceso de optimización y estandarización del cultivo celular. Los primeros ensayos se llevaron a cabo basados en el método propuesto por Huggins y colaboradores, los cuales realizaron el proceso de diferenciación y activación de linfocitos B mediante un cultivo de tres fases, que indica lo siguiente:

La fase I consiste en utilizar Oligodesoxinucleótido CpG 2006 (10 µg/mL), IL-2 (20 U/mL), IL-10 (50 ng/mL) e IL-15 (10 ng/mL) y cultivar las células por 5 días.

En la fase 2 se utiliza IL-2 (20 U/mL), IL-6 (50 ng/mL), IL-10 (50 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), e IgG de ratón anti-CD40L (1 µg/mL) y el cultivo de células en estas condiciones se mantiene por 3 días.

Finalmente, en fase 3, IL-6 (50 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), IFN-α (500 U/mL), factor de crecimiento de hepatocitos recombinante humano (hHGF) (20 ng/mL) y ácido hialurónico (100 µg/mL) se utilizan en el cultivo que se mantiene por 3 días más (Huggins et al., 2007).

Al implementar este protocolo, comenzaron a realizarse una serie de modificaciones con el fin de lograr la diferenciación del linfocito B en célula plasmática. En un comienzo, se planeaba utilizar la población de linfocitos T CD4+ como fuente de CD40L reemplazando la IgG de ratón anti-CD40L indicada en el protocolo propuesto por Huggins y colaboradores, sin embargo, esto

presentó una serie de dificultades ya que el co-cultivo de linfocitos T y B debía realizarse en un momento específico tras la activación de la primera población para que la expresión del CD40L fuese óptima. Además, la cantidad de células utilizadas también representaba una complejidad, ya que el co-cultivo se saturaba rápido debido a la coexistencia de ambas poblaciones activadas en conjunto, favoreciendo la muerte celular por falta de nutrientes. Finalmente, el co-cultivo aumentaba las variables que podrían estar afectando la activación y diferenciación del linfocito B considerando el trabajo con dos poblaciones celulares de forma simultánea y, además, variables genéticamente para cada donante. Por otro lado, otra modificación temprana al protocolo inicial fue utilizar IFN tipo I (10 ng/mL) en reemplazo de IFN- α (500 U/mL) durante la fase 3 de activación.

Tras no observar los resultados esperados, el siguiente cambio consistió en añadir en la fase 1 los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo anti-IgM de origen humano con el fin de estimular el BCR del linfocito B, ya que el protocolo inicial carecía de esta estimulación y es ampliamente reconocida la importancia que tiene esta señalización en la supervivencia y activación de los linfocitos B (Ouchida et al., 2012). Además, se decidió reemplazar el CD40L expresados por los linfocitos T CD4⁺ en co-cultivo por un CD40L recombinante humano de origen comercial durante la fase 2.

En este punto, si bien se observaba activación en los linfocitos B, aún no teníamos evidencia clara de que la diferenciación a células plasmáticas estaba funcionando y, además, la supervivencia celular era reducida al alcanzar la fase 3.

Con el fin de promover la diferenciación de los linfocitos B y aumentar la supervivencia en última fase del protocolo, se siguieron realizando cambios en el protocolo que consistieron en modificar la presencia de ciertas citoquinas durante las fases de activación y sumar algunos reactivos de importancia para la diferenciación. De esta forma, en la fase 1 se añadió IL-21, la cual se ha demostrado es indispensable para el proceso de diferenciación a células plasmáticas dependiente de células T y también para la producción de anticuerpos (Kuchen et al., 2007). También se decidió sumar el antígeno RBD recombinante como estimulador del BCR reemplazando al anti-IgM añadido anteriormente. Finalmente, en esta fase también se incorporó un Mega CD40L recombinante, reemplazando el CD40L comercial, ya que este posee una mejor estabilidad y actividad y simula mejor la agregación natural de CD40L.

En la fase 2, solo se realizó el cambio de IL-6 por IL-21 de acuerdo con el protocolo inicial, mientras que, en fase 3 se eliminó el hHGF y el ácido hialurónico y en su reemplazo se decidió sumar el factor activador de linfocitos B (BAFF) al protocolo, ya que se ha descrito que juega un papel importante en la homeostasis y supervivencia de los linfocitos B (Thompson et al., 2000).

3.2. Sistema de cultivo de tres fases para la activación y diferenciación de linfocitos B

Tras la optimización del protocolo del sistema de cultivo de tres fases, se obtuvo la metodología final que se utilizó para la obtención de los resultados de esta tesis.

Los linfocitos B CD20+ aislados de sangre periférica de donantes sanos fueron cultivados con medio RPMI-1640 (*Cytiva*; N° de catálogo: SH30255.2) suplementado con suero bovino fetal (FBS) (*Cytiva*; N° de catálogo: SH30068.03HI) al 10% e IL-2 (500 U/mL) (*Novartis Pharmaceuticals UK Limited*; N° de catálogo: PL-00101/0936) con adición de antibióticos Penicilina/Estreptomicina (*Gibco*; N° de catálogo: 10378-016) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (en U). La densidad celular utilizada fue de $1,5 \times 10^5$ células en 200 uL de medio de cultivo por pocillo. Para estudiar la efectividad del protocolo se trabajó con 2 condiciones distintas: una condición control (o no activado) en donde solo tenemos los linfocitos B CD20+ en medio de cultivo y una condición activada que corresponde a linfocitos B CD20+ activados según el protocolo optimizado. El sistema de cultivo de tres fases utilizado para esta condición se encuentra descrito en la siguiente tabla.

Tabla 5: Sistema de cultivo de tres fases utilizado para la activación y diferenciación de linfocitos B

Fase del cultivo	Reactivos utilizados	Proveedor	N° de catálogo	Duración de la fase
Fase 1		Novartis		4 días
	IL-2 (20 U/mL)	Pharmaceuticals	PL-00101/0936	
		UK Limited		
	IL-10 (50 ng/mL)	BioLegend	571004	
	IL-15 (10 ng/mL)	BioLegend	570304	
	IL-21 (50 ng/mL)	BioLegend	571202	
	CpG ODN 2006 (10 ug/mL)	tIrl-2006-1	tIrl-2006-1	
	Antígeno RBD recombinante (10 ug/mL)	BioLegend	793604	
	Mega CD40L (0.5 ug/mL)	Enzo	ALX-522-110-C010	
Fase 2		Novartis		3 días
	IL-2 (20 U/mL)	Pharmaceuticals	PL-00101/0936	
		UK Limited		
	IL-10 (50 ng/mL)	BioLegend	571004	
	IL-15 (10 ng/mL)	BioLegend	570304	
	IL-21 (50 ng/mL)	BioLegend	571202	
Fase 3		IL-15 (10 ng/mL)	BioLegend	570304
		IL-6 (50 ng/mL)	BioLegend	570804
		IFN tipo I (50 ng/mL)	R&D Systems	11020-IF
		BAFF (100 ng/mL)	BioLegend	559602

3.3. Sistema de cultivo de tres fases con adición de quimioquinas CXCL9 y CXCL10

Para evaluar el efecto de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 en el sistema de cultivo de linfocitos B, estas se añadieron a los reactivos utilizados en el cóctel de activación. Entonces, para llevar a cabo este objetivo se definieron 4 condiciones (Figura 15):

1. Control (no activado): Linfocitos B CD20+ únicamente con medio de cultivo.
2. Activado: Linfocitos B CD20+ activados según lo indicado en la tabla 5.
3. Activado con CXCL9 (BioLegend; N° de catálogo: 578102): Linfocitos B CD20+ activados según lo descrito en el protocolo optimizado más la adición de CXCL9 1 ng/mL en las fases 2 y 3.
4. Activado con CXCL10 (BioLegend; N° de catálogo: 573502): Linfocitos B CD20+ activados según lo descrito en el protocolo optimizado más la adición de CXCL10 8 ng/mL en las fases 2 y 3.

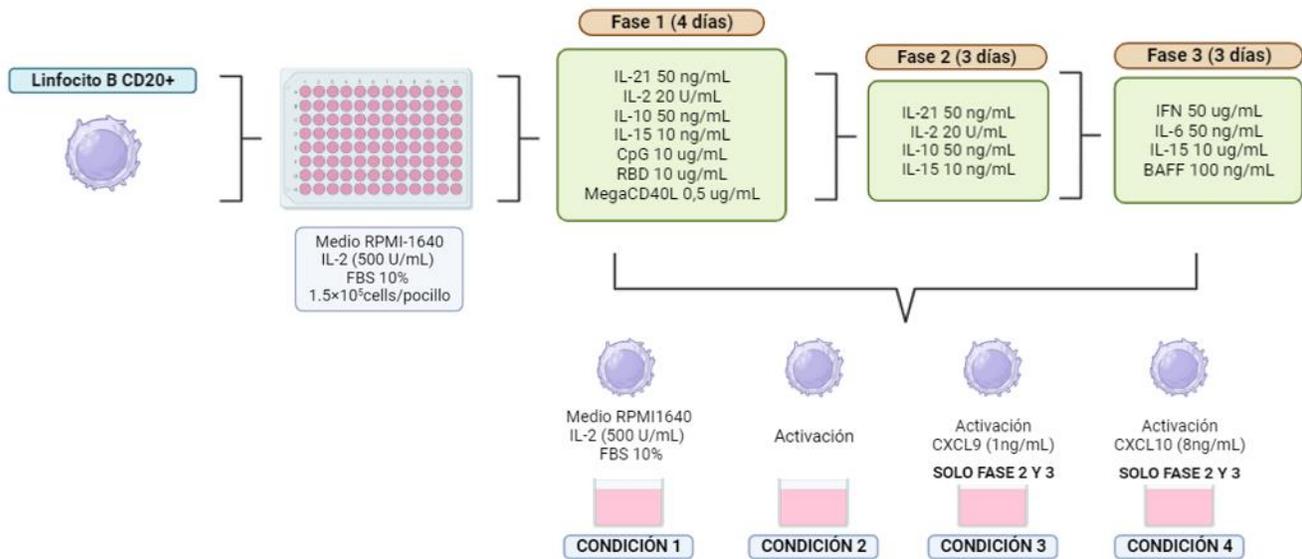


Figura 15: Esquema general del procedimiento realizado para los cultivos celulares de linfocitos B.

Figura realizada en *Biorender*.

3.4. Evaluación fenotípica del protocolo de activación y diferenciación del linfocito B

Tras finalizar cada fase, se evaluó fenotípicamente el proceso de activación y diferenciación de linfocitos B a través de citometría de flujo. Para esto, se diseñaron dos paneles de anticuerpos, uno para medir activación y otro para medir diferenciación. Además, se utilizó el marcador de viabilidad *Ghost Dye™* para discriminar entre células vivas y muertas. El efecto de la adición de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 al protocolo de cultivo fue evaluado de la misma forma. La tabla a continuación (Tabla 6) indica con detalle los anticuerpos que conforman cada panel.

Tabla 6: Anticuerpos utilizados para evaluar por citometría de flujo el protocolo de activación y diferenciación de linfocitos B.

Panel	Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor	N° de catálogo
Activación	Anti-CD86	PE	BioLegend	374206
	Anti-CD25	PECy7	BioLegend	356108
	Anti-HLA-DR	APC	BioLegend	308622
Diferenciación	Anti-CD27	APC	eBioscience	17-0279-42
	Anti-CD38	PECy7	BioLegend	303516
	Anti-CD138	FITC	BioLegend	352304
Viabilidad celular	Ghost Dye™	Alexa780	TONBO biosciences	13-0865-T100

PE: Ficoeritrina. PECy7: Ficoeritrina-canina 7. APC: Aloficocianina. FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

4. Evaluación de la expresión del receptor CXCR3

El análisis de la expresión del receptor de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 se realizó mediante el uso de un anticuerpo comercial anti-CXCR3 (*BioLegend*; N° de catálogo: 353705) capaz de reconocer la expresión de este receptor en la superficie de linfocito B mediante citometría de flujo. La medición fue llevada a cabo al finalizar cada fase del protocolo, incluyendo las condiciones con y sin quimioquinas.

5. Análisis de la producción *in vitro* de anticuerpos IgG totales

Para confirmar la obtención de células plasmáticas, se evaluó la producción de anticuerpos IgG totales desde el sobrenadante de cultivo de la fase 3.

Para esto, las células en cultivo fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue almacenado a -20°C.

Tras recolectar el sobrenadante de fase 3 de los sistemas de cultivo de todos los donantes sanos, se procedió a cuantificar los niveles de IgG por medio de un kit ELISA sándwich para IgG humana (*RayBio® Human IgG ELISA Kit*, N° de catálogo: ELH-IGG 0612230225.)

Este kit es un inmunoensayo *in vitro* para la medición cuantitativa de IgG humana.

Este ensayo utiliza un anticuerpo específico para IgG humana recubierto en una placa de 96 pocillos. Los estándares y las muestras se pipetea en los pocillos y el anticuerpo inmovilizado une la IgG presente en las muestras. Los pocillos se lavan y se añade anticuerpo anti-IgG humana biotinilado. Después de eliminar

por lavado el anticuerpo biotinilado no unido, se pipetea estreptavidina conjugada con HRP (Peroxidasa de rábano) a los pocillos. Los pocillos se lavan nuevamente, se les añade una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) para la enzima y el color se desarrolla en proporción a la cantidad de IgG unida. Como último paso, se añade la solución stop capaz de cambiar el color de azul a amarillo, y la intensidad de este último se midió a 450 nm en un lector de microplacas. Para realizar la medición de las muestras se utilizó una dilución 1/50000, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Figura 16).

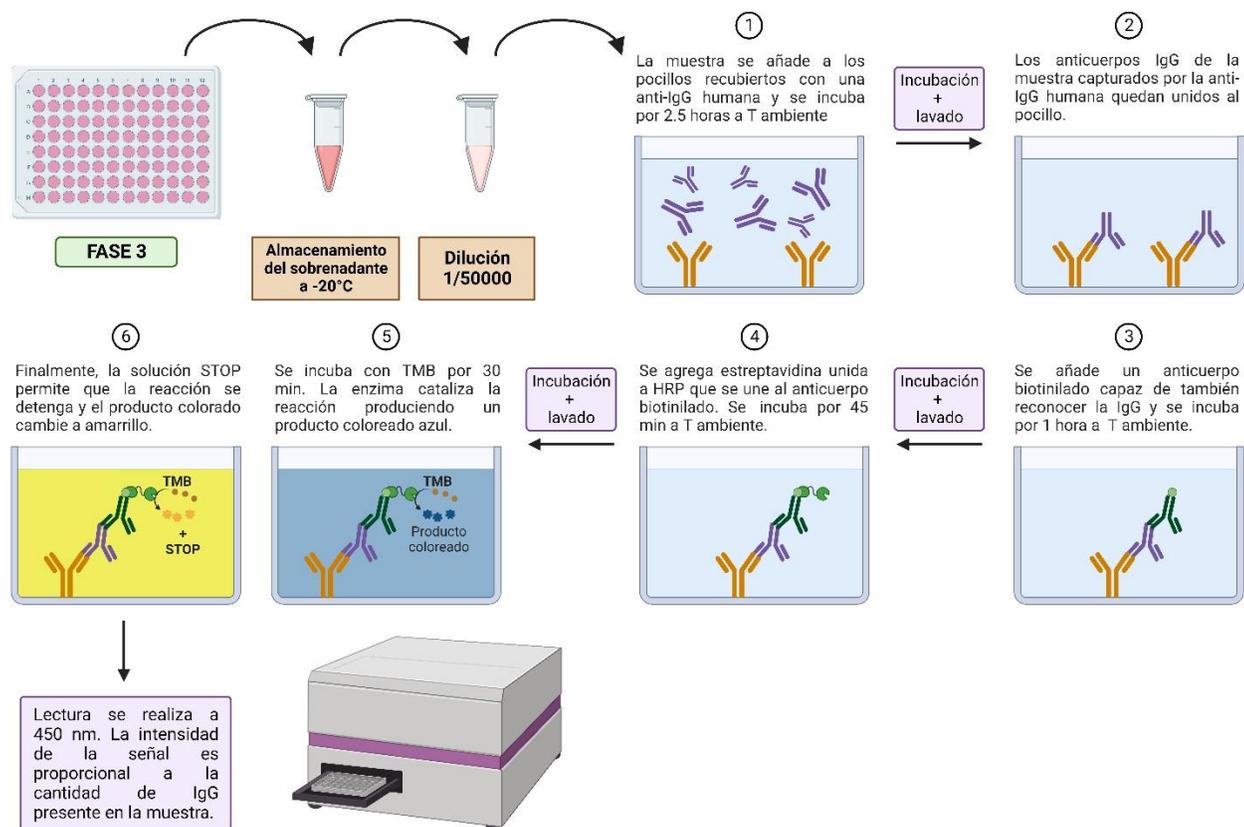


Figura 16: Esquema general de la metodología utilizada en la determinación de anticuerpos IgG totales.

Figura realizada en *Biorender*.

6. Determinación del efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la expresión de CD40L durante la activación *in vitro* de linfocitos T *helper*.

Los linfocitos T CD4+ aislados por MACS se activaron mediante beads de activación anti-CD3 y anti-CD28 (*Gibco*; N° de catálogo: 11131D). Una vez activados fueron cultivados con medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% e IL-2 (500 U/mL) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (en U). La densidad celular utilizada fue de $1,5 \times 10^5$ células en 200 μ L de medio de cultivo por pocillo. Se trabajó con tres condiciones:

1. Activado: Linfocitos T CD4+ activados con beads anti-CD3/anti-CD28.
2. CXCL9: Linfocitos T CD4+ activados con beads anti-CD3/anti-CD28 más adición de CXCL9 1 ng/mL.
3. CXCL10: Linfocitos T CD4+ activados con beads anti-CD3/anti-CD28 más adición de CXCL10 8 ng/mL.

Se definió un panel de marcaje (Tabla 7) que permitió evaluar la expresión del CD40L, CXCR3 y CD25 previa a la activación (tiempo 0) y a las 6, 12, 24 y 48 horas post activación entre las distintas condiciones recién descritas (Figura 17). La determinación del porcentaje de expresión de los marcadores utilizados se realizó por citometría de flujo.

Tabla 7: Anticuerpos utilizados para evaluar por citometría de flujo la activación de linfocitos *T helper*.

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor	N° de catálogo
Anti-CD40L	PE	BioLegend	310805
Anti-CD25	PECy7	BioLegend	356108
Anti-CXCR3	FITC	BioLegend	353704
Ghost Dye™	Alexa780	TONBO biosciences	13-0865-T100

PE: Ficoeritrina. PECy7: Ficoeritrina-canina 7. FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

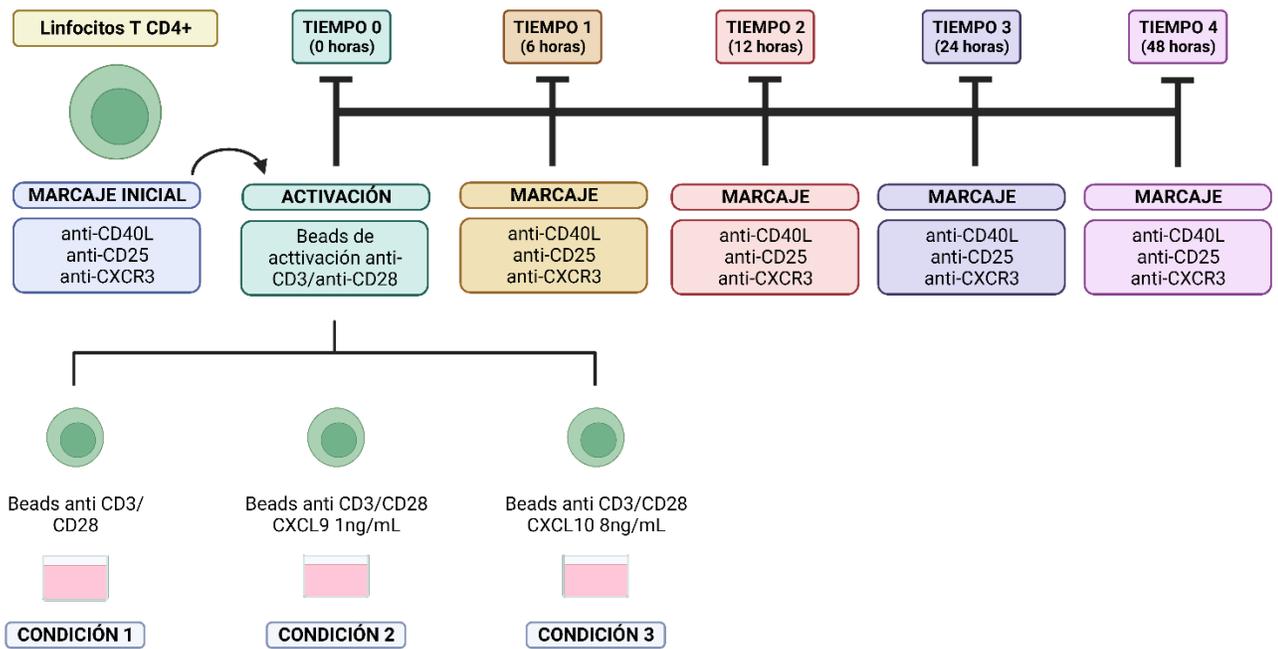


Figura 17: Esquema general de las condiciones de cultivo trabajadas con los linfocitos T CD4+ y sus respectivos marcajes.

Figura realizada en *Biorender*.

7. Análisis estadístico

El análisis de los resultados fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 9, en donde se aplicó, en primera instancia, la prueba de normalidad Shapiro-Wilk con un nivel de significancia de 0,05 a todos los conjuntos de datos obtenidos. Dependiendo si estos datos se distribuían o no normalmente, se eligieron los tests para analizar las diferencias estadísticas entre las condiciones de cultivo como se indica en la figura 18.

Cabe destacar que todos los ensayos fueron realizados bajo los protocolos correspondientes de bioseguridad y bioética, y la eliminación de los desechos y restos biológicos fueron realizados bajo lo estipulado por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Universidad de Concepción. (Anexo 2).

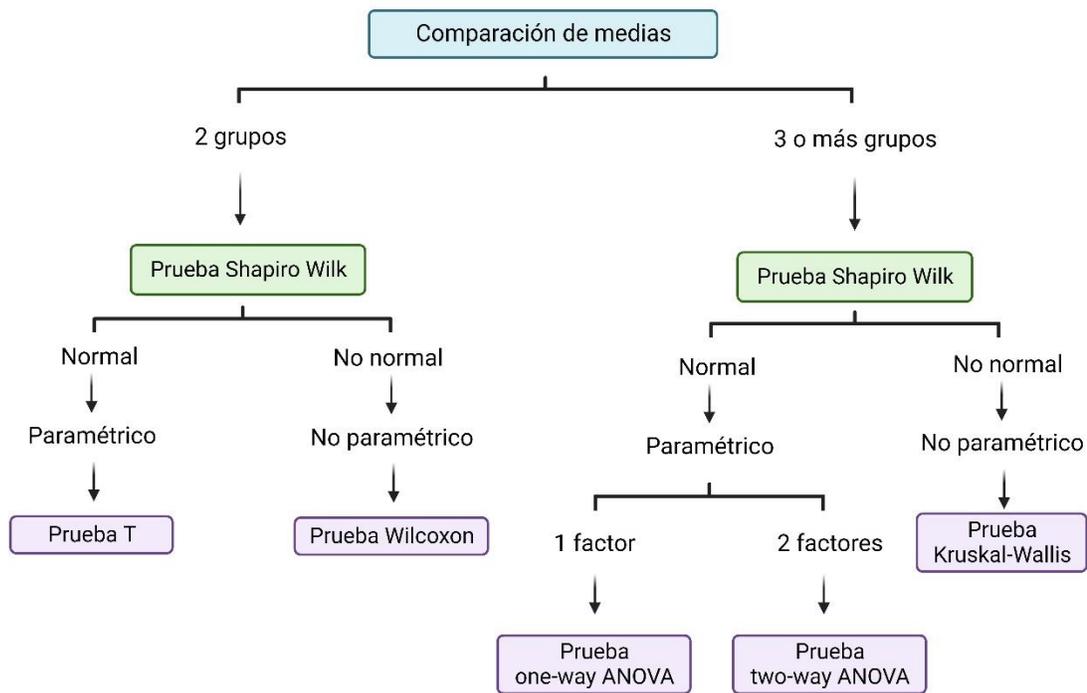


Figura 18: Esquema del manejo estadístico de los resultados.

Esquema realizado en *Biorender*.

RESULTADOS

Objetivo Específico 1: Evaluar la diferenciación *in vitro* de linfocito B a célula plasmática mediante el análisis de fenotipo y la expresión del receptor CXCR3

La evaluación del fenotipo durante la implementación del sistema de cultivo se realizó al finalizar cada una de las tres fases propuestas en el protocolo. Las fases 1 y 2 de cultivo se caracterizaron por ser fases activadoras mientras que la fase 3, por ser diferenciadora. La diferenciación de los linfocitos B mediante el fenotipo, se analizó gracias al uso de dos marcadores: la doble expresión CD38+CD27+ y la expresión de CD138. La presencia de este último marcador solo se analizó al finalizar la fase 3.

Los resultados indican que tras finalizar los 4 días de cultivo correspondientes a la fase 1, los linfocitos B activados (A) comienzan a aumentar la expresión de los marcadores CD27 y CD38 en comparación a la condición no activada (NA), como se observa en las gráficas de dot plot e histogramas de la figura 19, donde se destaca la doble expresión de estos marcadores y el comienzo de la aparición de la población linfocitos B CD27+CD38+ (Figura 19A, B, C y D). El histograma de la Figura 19E nos indica que, en la condición no activada, la expresión de CD27 es baja mientras que para la condición activada, si bien aún existe una población de linfocitos B con baja expresión de CD27 similar a la de la no activada, existe

una población que se desplaza hacia la derecha aumentando la expresión de CD27 (Figura 19E). Por su lado, la figura 19F nos muestra una distribución del marcaje CD38+ con mayor similitud entre ambas condiciones. Sin embargo, es posible notar que para la condición activada la expresión comienza a aumentar (Figura 19F).

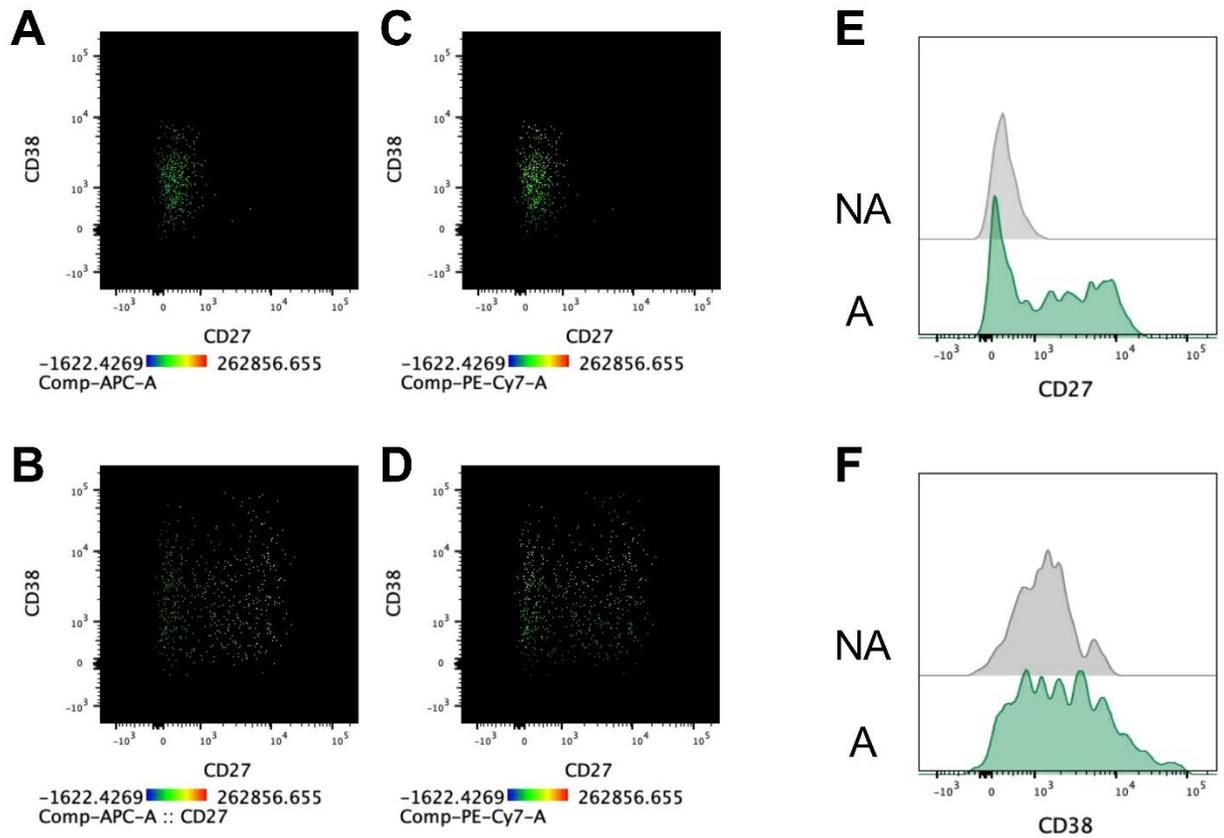


Figura 19: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados y no activados en fase 1.

A. Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD27 en linfocitos B NA en fase 1. **B.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD27 en linfocitos B A en fase 1. **C.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD38 en

linfocitos B NA en fase 1. **D.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD38 en linfocitos B A en fase 1. **E.** Histograma representativo de la expresión de CD27 en linfocitos B NA y A en fase 1. **F.** Histograma representativo de la expresión de C38 en linfocitos B NA y A en fase 1. NA: No activados. A: Activados.

Al concluir la fase 2 del protocolo, se mantiene una presencia notable de la población de linfocitos B CD27+CD38+ en comparación con la población no activada. Además, se observa un incremento en la intensidad de la expresión de CD27 en relación con CD38 (Figura 20A, B, C y D). Este hallazgo se refleja de manera consistente en el histograma de la Figura 20E, donde se aprecia un desplazamiento hacia la derecha de la población de linfocitos B con una alta expresión de CD27 en la condición activada, en contraste con la población con baja expresión que se identificó en la fase 1 (Figura 19E). Por otro lado, la expresión de CD38 se mantiene relativamente constante en ambas condiciones (Figura 20F).

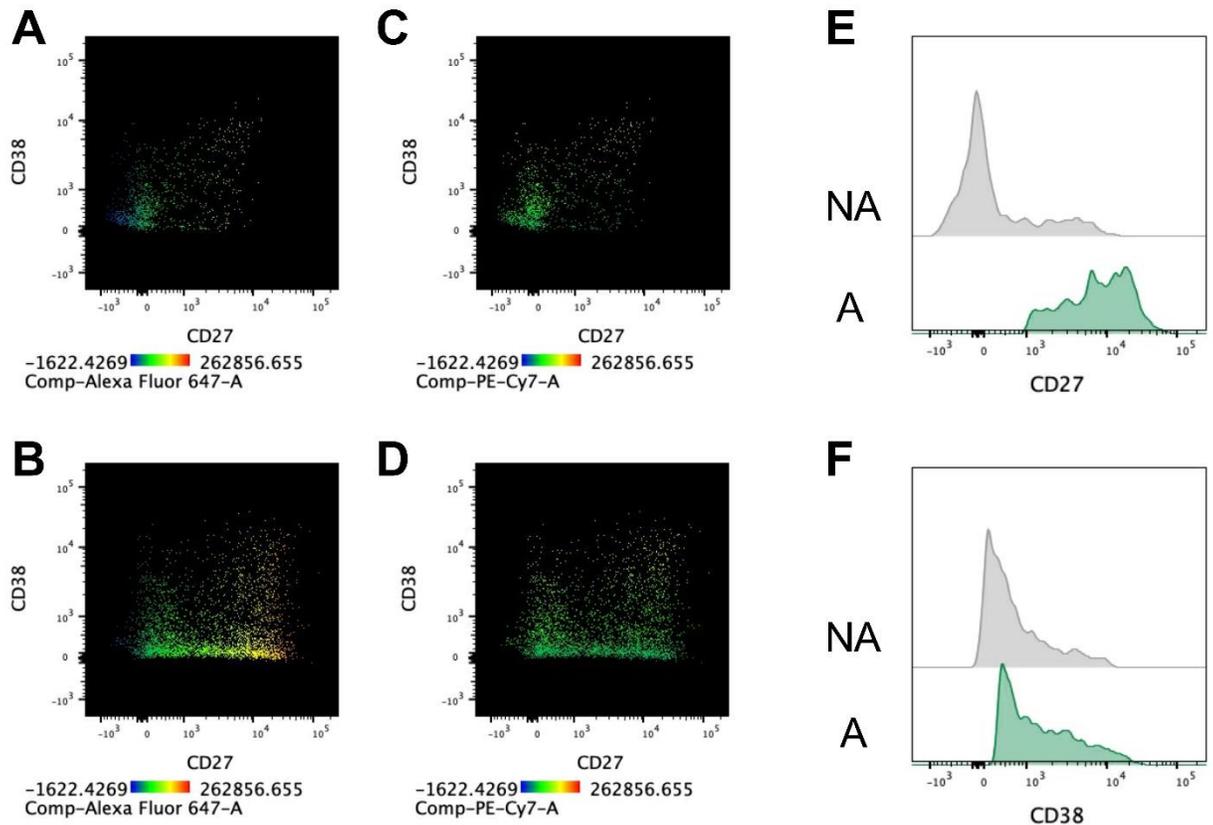


Figura 20: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados y no activados en fase 2.

A. Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD27 en linfocitos B NA en fase 2. **B.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD27 en linfocitos B A en fase 2. **C.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD38 en linfocitos B NA en fase 2. **D.** Dot plot representativo de la doble expresión

CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD38 en linfocitos B A en fase 2. **E.** Histograma representativo de la expresión de CD27 en linfocitos B NA y A en fase 2. **F.** Histograma representativo de la expresión de C38 en linfocitos B NA y A en fase 2. NA: No activados. A: Activados.

En la fase 3 del estudio, se evidencia un incremento en la expresión de ambos marcadores en comparación con las dos fases iniciales. Esta fase se distingue por presentar el cambio fenotípico más marcado, caracterizándose por su capacidad diferenciadora en relación con las fases anteriores. Las representaciones gráficas de dot plot revelan que, en esta fase del protocolo, se observa una mayor mortalidad celular en la población no activada (Figura 21A y C). Por otro lado, en la población activada, se aprecia un incremento tanto en la proliferación celular como en la intensidad de marcaje para los marcadores CD27 y CD38, respectivamente, lo que indica de manera notoria la presencia de una población de linfocitos B CD27+CD38+ (Figura 21B y D). Los histogramas proporcionan una visualización clara de que, de forma individual, la expresión de CD27 y CD38 alcanza su punto máximo en esta fase del protocolo. Además, se observa que la mayoría de los linfocitos B activados que sobreviven en la fase 3 exhiben una alta expresión de ambos marcadores (Figura 21E y F).

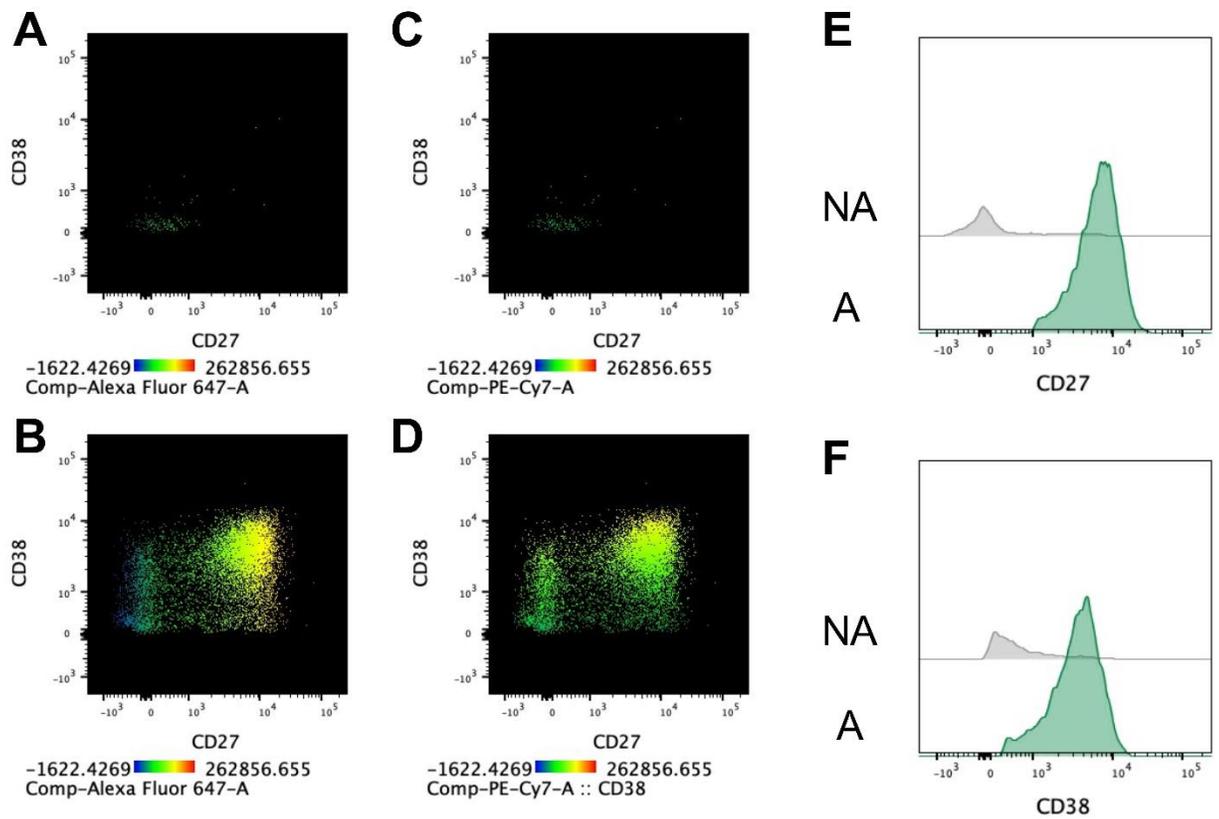


Figura 21: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados y no activados en fase 3.

A. Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD27 en linfocitos B NA en fase 3. **B.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD27 en linfocitos B A en fase 3. **C.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD38 en

linfocitos B NA en fase 3. **D.** Dot plot representativo de la doble expresión CD27+CD38+ en base a la intensidad de expresión de CD38 en linfocitos B A en fase 3. **E.** Histograma representativo de la expresión de CD27 en linfocitos B NA y A en fase 3. **F.** Histograma representativo de la expresión de C38 en linfocitos B NA y A en fase 3. NA: No activados. A: Activados.

En el caso del marcador CD138, que se evaluó exclusivamente en la fase 3 del protocolo experimental, se constató la presencia de su expresión en los linfocitos B sometidos al sistema de cultivo de tres fases. Este hallazgo sugiere la existencia de células plasmáticas, en consonancia con el fenotipo esperado al concluir el protocolo. (Figura 22A y B).

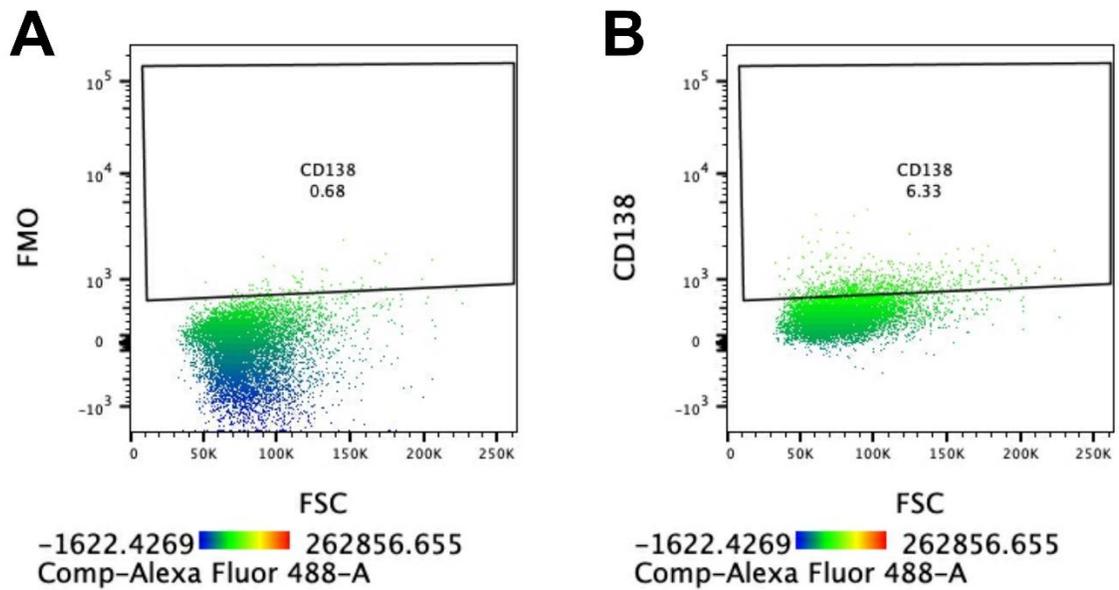


Figura 22: Dot plot representativo de la expresión de CD138 en linfocitos B activados en Fase 3.

A. Muestra FMO control utilizada para definir el umbral de detección para CD138.

B. Expresión de CD138 en linfocitos B activados al finalizar la fase 3. FMO: *Fluorescence Minus One*.

El análisis del fenotipo de diferenciación de los linfocitos B activados entre los donantes confirma la eficacia del protocolo propuesto. La coexpresión CD27+CD38+ aumenta progresivamente a lo largo de las distintas fases del cultivo (Figura 23A). Es notable destacar que el punto máximo de expresión se registra en la última fase del protocolo, manifestando un incremento significativo en comparación con la condición no activada en la fase 1 ($p=0,0011$).

Además, la fase 3 se distingue por experimentar un incremento significativo en la expresión de CD138 en comparación con la condición no activada de esa misma fase ($p=0,0500$) (Figura 23B)

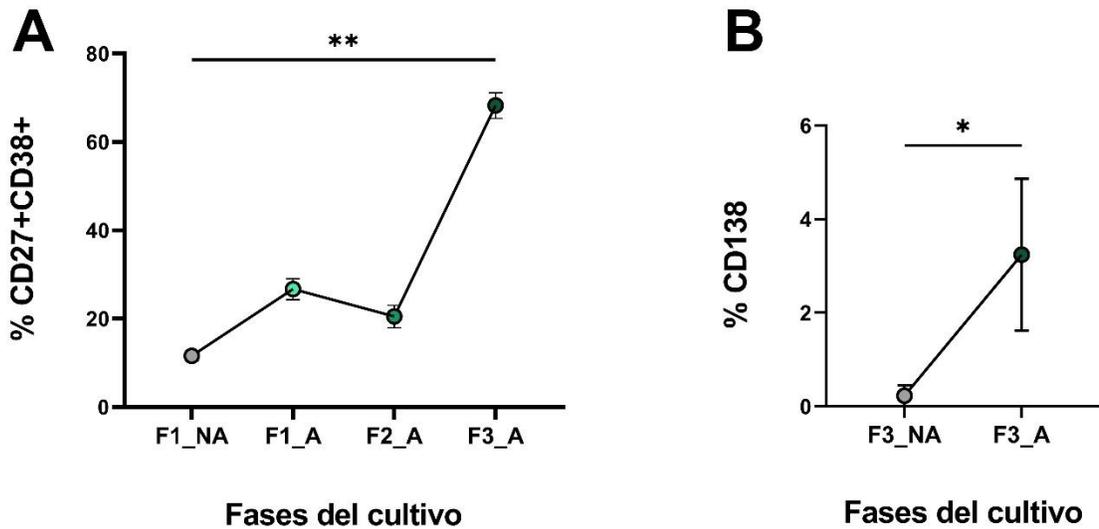


Figura 23: Porcentaje de expresión de los marcadores de diferenciación en linfocitos B durante las fases del sistema de cultivo.

A. Porcentaje de expresión CD27+CD38+ en linfocitos B NA y A durante las tres fases de cultivo. **B.** Porcentaje de expresión CD138 en linfocitos B NA y A durante fase 3. El análisis estadístico para A se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis, mientras que para B se utilizó la prueba Wilcoxon. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para cada medición se trabajó un n de 5 donantes. NA: No activados. A: Activados.

Para corroborar la presencia de células plasmáticas, conforme a la evaluación fenotípica de los linfocitos B activados, se procedió a la cuantificación de los anticuerpos IgG totales a partir del sobrenadante de cultivo de la fase 3, en comparación con el medio de cultivo empleado durante las fases del protocolo (Figura 24). La detección de anticuerpos IgG en contraste al medio de cultivo utilizado confirma la eficacia del sistema de cultivo para la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

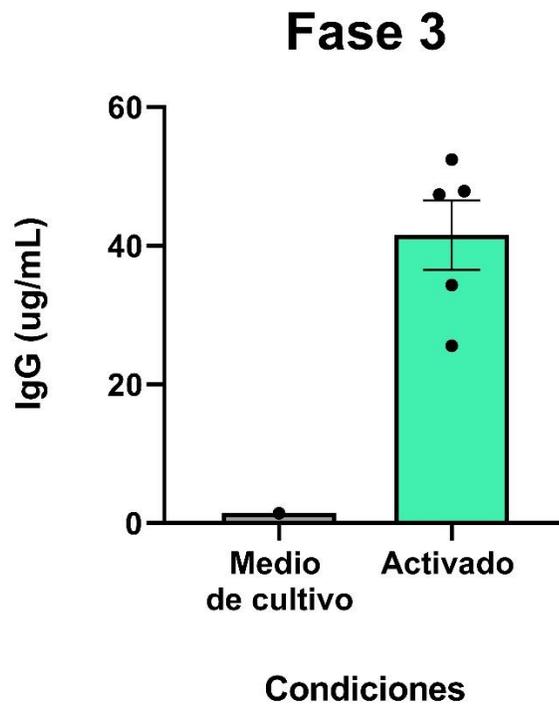


Figura 24: Niveles de anticuerpos IgG totales desde el sobrenadante de cultivo de linfocitos B activados en fase 3 en comparación con el medio de cultivo.

La determinación de los niveles de IgG se realizó mediante ELISA y se consideró un n de 5 donantes. ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

Además del análisis fenotípico para la diferenciación, se llevó a cabo una evaluación de la expresión de CD86 como marcador de activación en los linfocitos B a lo largo de las tres etapas del protocolo. Los resultados demuestran un incremento progresivo en la expresión de CD86 conforme se avanza en las fases de cultivo (Figura 25A). Se destaca que el porcentaje de expresión es significativamente superior en la fase 2 ($p=0,0344$) y en la fase 3 ($p=0,0025$) en comparación con la condición no activada (Figura 25B).

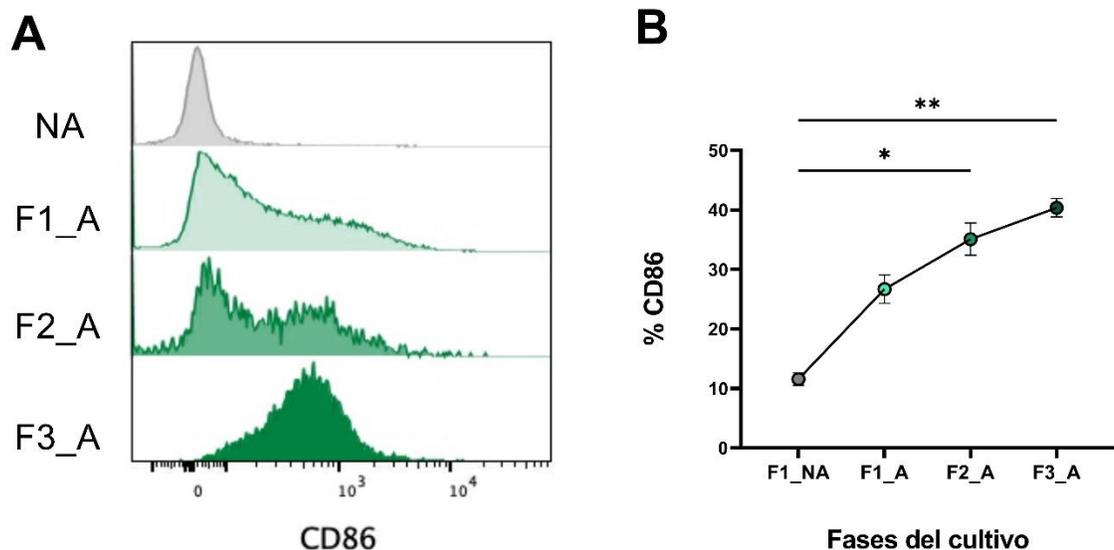


Figura 25: Expresión de CD86 en linfocitos B durante las fases del sistema de cultivo.

A. Histograma representativo de la expresión de CD86 en linfocitos B NA y A en las 3 fases del sistema de cultivo. **B.** Porcentaje de la expresión de CD86 en linfocitos B NA y A en las 3 fases del sistema de cultivo. El análisis estadístico para B se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición se trabajó con un n de 5 donantes. NA: No activados. A: Activados.

En relación con el análisis de la expresión del receptor de quimioquinas CXCL9 y CXCL10, denominado como CXCR3, se observa un patrón de comportamiento similar. La expresión de este receptor aumenta a medida que progresa el desarrollo del sistema de cultivo (Figura 26A), observándose un incremento significativo en el porcentaje de expresión desde la primera fase del cultivo ($p=0,0175$) (Figura 26B).

El porcentaje de células que expresan CXCR3 permanece elevado en las fases 2 y 3, siendo significativamente superior en ambas en comparación con la condición no activada ($p=0,0117$ y $p=0,0056$, respectivamente). Además, es relevante destacar que tras el marcado aumento experimentado por la expresión del receptor en la fase 1, esta tiende a estabilizarse en las fases 2 y 3 (Figura 26C). Por lo tanto, se ha decidido llevar a cabo el análisis del efecto de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 sobre la activación de los linfocitos B en estas dos últimas fases del cultivo.

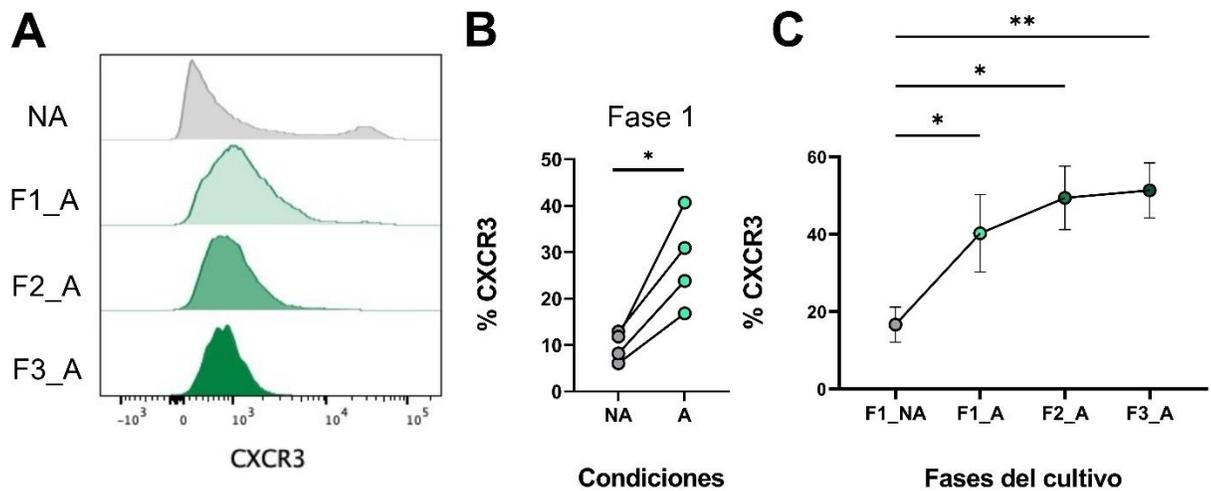


Figura 26: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en linfocitos B durante las fases del sistema de cultivo.

A. Histograma representativo de la expresión de CXCR3 en linfocitos B NA y A en las 3 fases del sistema de cultivo. **B.** Porcentaje de la expresión de CXCR3 en linfocitos B NA y A en la fase 1 del sistema de cultivo. **C.** Porcentaje de la expresión de CXCR3 en linfocitos B NA y A en las 3 fases del sistema de cultivo. El análisis estadístico para B se realizó mediante una prueba t, mientras que para C se utilizó una prueba one-way ANOVA. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 4 donantes. NA: No activados. A: Activados.

Objetivo Específico 2: Analizar el efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la diferenciación *in vitro* de linfocitos B y la producción de anticuerpos IgG provenientes de individuos sanos.

El efecto de la presencia de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 en la fase dos del protocolo se evaluó con los marcadores de estudio CD86, CD25 y HLA-DR con el fin de estudiar si estas quimioquinas influyen o no durante la activación del linfocito B. Los resultados revelan que en las condiciones activadas con CXCL9 y CXCL10, se produce un aumento en la expresión de CD86 en comparación con la condición no activada, mientras que el comportamiento con la condición activada sin adición de quimioquinas parece ser similar, ya que se observa una población de linfocitos B con baja expresión de CD86 y un aumento en la población de linfocitos B con alta expresión de CD86 (Figura 27A). Sin embargo, únicamente la presencia de CXCL9 da lugar a un incremento significativo en la expresión de este marcador en relación con la condición activada sin la adición de quimioquinas ($p=0,0012$) (Figura 27B). Este efecto no se observa con CXCL10, y en algunos casos, se registró una disminución en la expresión de este marcador en comparación con la condición activada (Figura 27C).

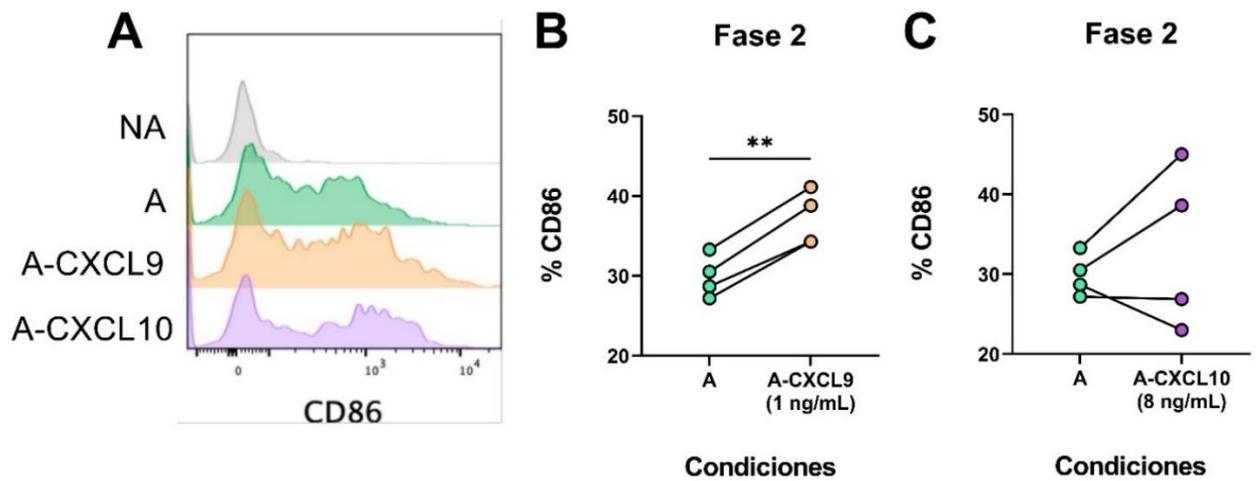


Figura 27: Expresión de CD86 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.

A. Histograma representativo de la expresión de CD86 en linfocitos B NA, A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 2. **B.** Porcentaje de la expresión de CD86 en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 2. **C.** Porcentaje de la expresión de CD86 en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 2. El análisis estadístico para B y C se realizó mediante una prueba t y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 4 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

La evaluación del marcador CD25 revela un incremento en su expresión, como resultado del protocolo de diferenciación, en las condiciones activadas y en las activadas con adición de CXCL9 o CXCL10, en comparación con la condición no activada (Figura 28A). No obstante, no se observa un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan CD25 en respuesta a la presencia de estas quimioquinas en el sistema de cultivo para la diferenciación de linfocitos B (Figura 28B y C).

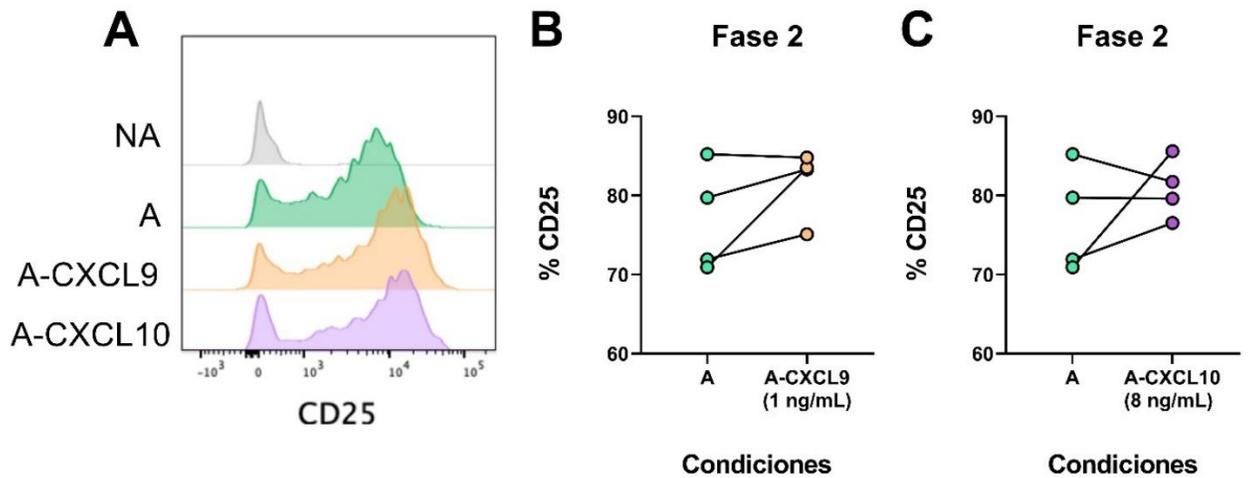


Figura 28: Expresión de CD25 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.

A. Histograma representativo de la expresión de CD25 en linfocitos B NA, A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 2. **B.** Porcentaje de la expresión de CD25 en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 2. **C.** Porcentaje de la expresión de CD25 en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 2. El análisis estadístico para B se realizó mediante una prueba Wilcoxon mientras que para C se utilizó una prueba t. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 4 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

Se observó que la intensidad de fluorescencia media (IFM) para HLA-DR se mantiene elevada, incluso en la condición no activada, probablemente debido a que su expresión constitutiva en las células presentadoras de antígenos como son los linfocitos B (Figura 29A). Sin embargo, se aprecia un aumento ligero en la IFM tras la adición de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 al medio de cultivo en comparación con la condición activada sin la presencia de quimioquinas. Sin embargo, este aumento no alcanza significancia estadística (Figura 29B y C).

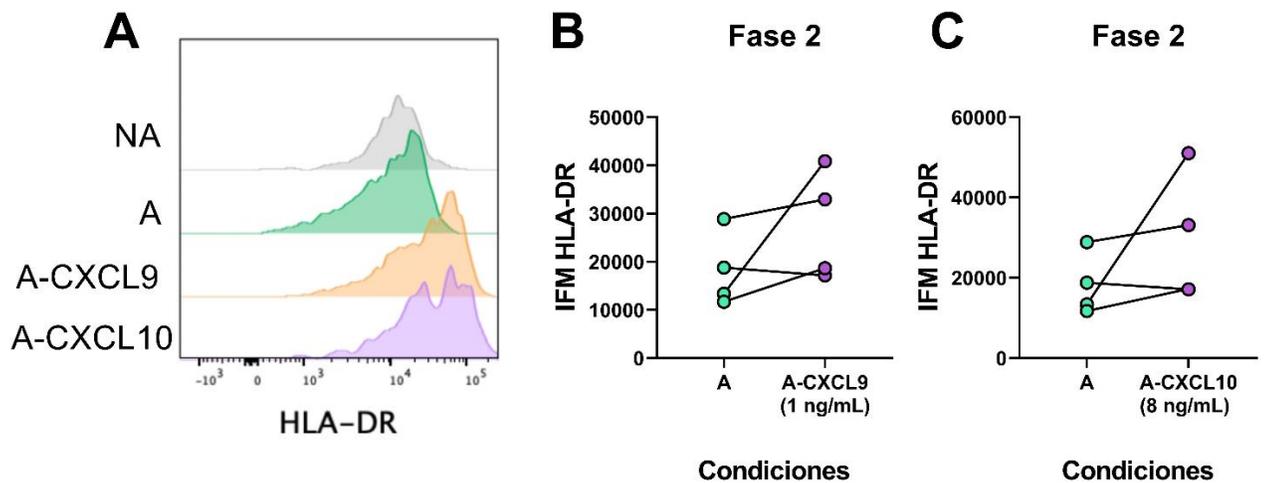


Figura 29: Expresión de HLA-DR en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.

A. Histograma representativo de la expresión de HLA-DR en linfocitos B NA, A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 2. **B.** IFM de HLA-DR en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 2. **C.** IFM de HLA-DR en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 2. El análisis estadístico para B y C se realizó mediante una prueba t y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 4 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10. IFM: Intensidad de Fluorescencia Media.

En la fase 3 del protocolo, con la incorporación de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, se llevó a cabo la evaluación de los marcadores de superficie CD27+CD38+ y CD138 con el propósito de investigar el efecto fenotípico de éstas en la diferenciación de los linfocitos B.

Los resultados obtenidos señalan que la población de linfocitos B CD27+CD38+ se encuentra presente en las tres condiciones de activación, representando al menos la mitad de la población de linfocitos que continúan viables al concluir el sistema de cultivo (Figura 30A).

Adicionalmente, el análisis estadístico de estos resultados revela que la adición de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 al cóctel de activación conlleva un incremento significativo en la coexpresión CD27+CD38+ en las células B ($p=0,0058$ y $p=0,0334$, respectivamente). (Figura 30B y C).

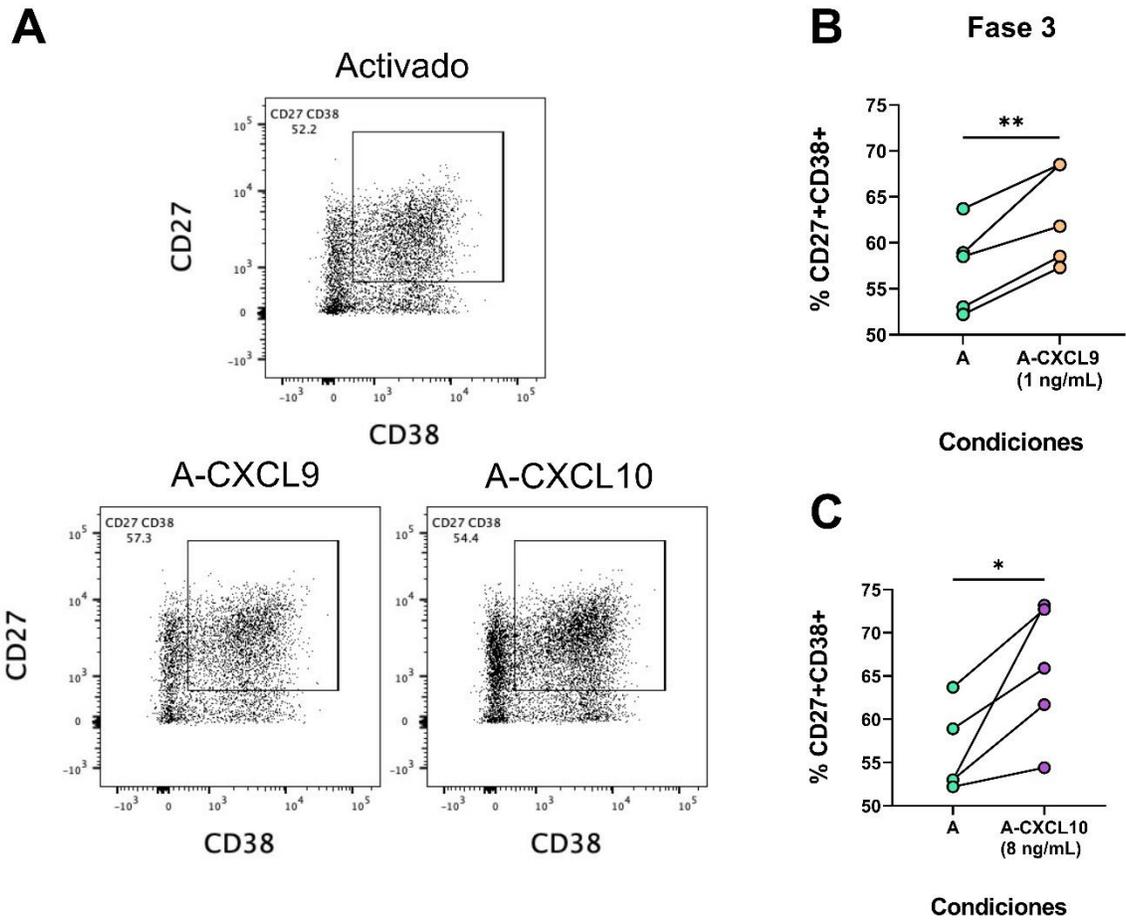


Figura 30: Expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 3.

A. Dot plot representativo de la expresión de CD27+CD38+ en linfocitos B A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 3. **B.** Porcentaje de CD27+CD38+ en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 3. **C.** Porcentaje de CD27+CD38+ en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 3. El análisis estadístico para B y C se realizó mediante una prueba t y se consideró significativo un valor

$p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 5 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

La expresión del marcador CD138 se identificó en las tres condiciones de análisis (Figura 31A). No obstante, es notable que, bajo la influencia de las quimioquinas, se produce un fortalecimiento en su expresión en los linfocitos B, manifestándose un incremento estadísticamente significativo tanto en el caso de CXCL9 ($p=0,0139$) como en el de CXCL10 ($p=0,0162$), en comparación con la condición activada sin la presencia de quimioquinas (Figura 31B y C).

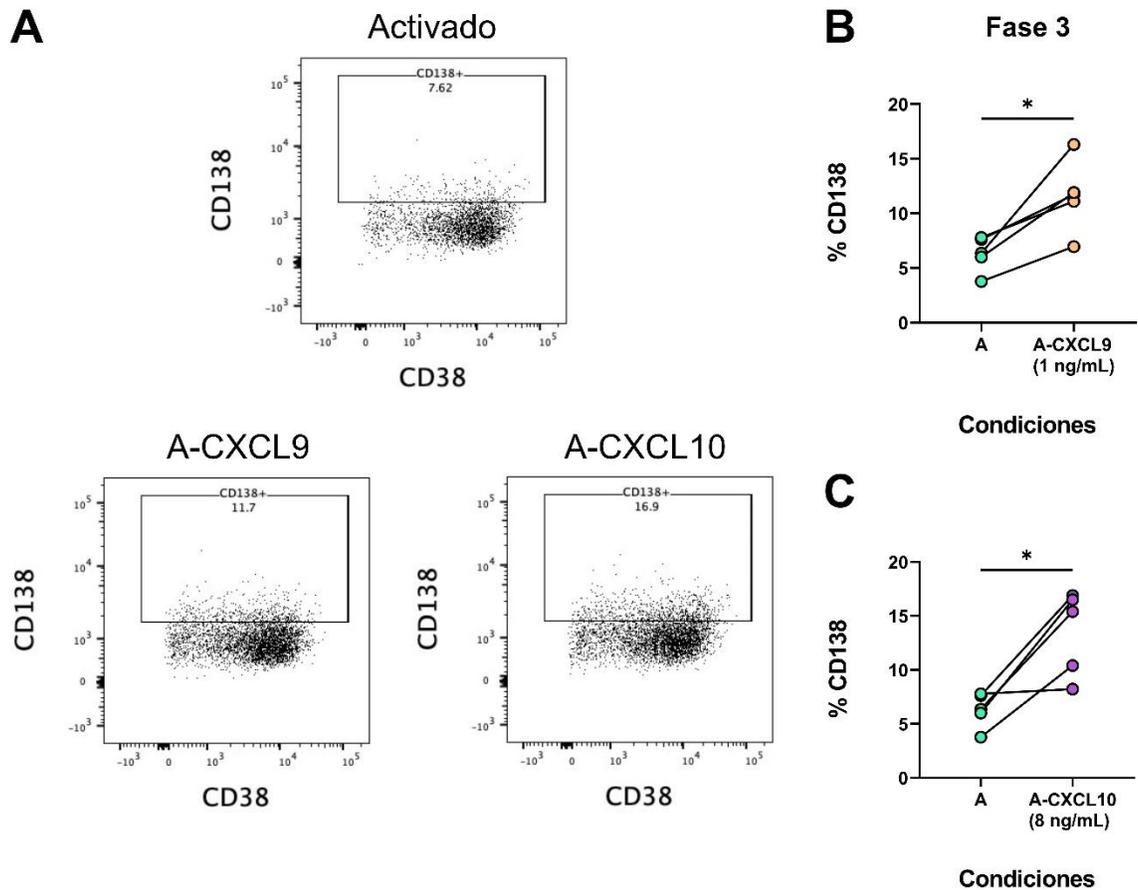


Figura 31: Expresión de CD138 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 3.

A. Dot plot representativo de la expresión de CD138 en linfocitos B A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 3. **B.** Porcentaje de CD138 en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 3. **C.** Porcentaje de CD138 en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 3. El análisis estadístico para B y C se realizó mediante una prueba t y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la

medición de B y C se trabajó con un n de 5 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

La evaluación de la expresión del receptor CXCR3 también se llevó a cabo en las fases 2 y 3 del protocolo con la incorporación de quimioquinas. Los resultados confirman que, tal como se evidenció previamente, la presencia del receptor experimenta un aumento en las células sometidas al sistema de cultivo en comparación con la condición no activada (Figura 32A). Sin embargo, no se aprecia un incremento significativo en su expresión como resultado de la adición de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 (Figura 32B y C).

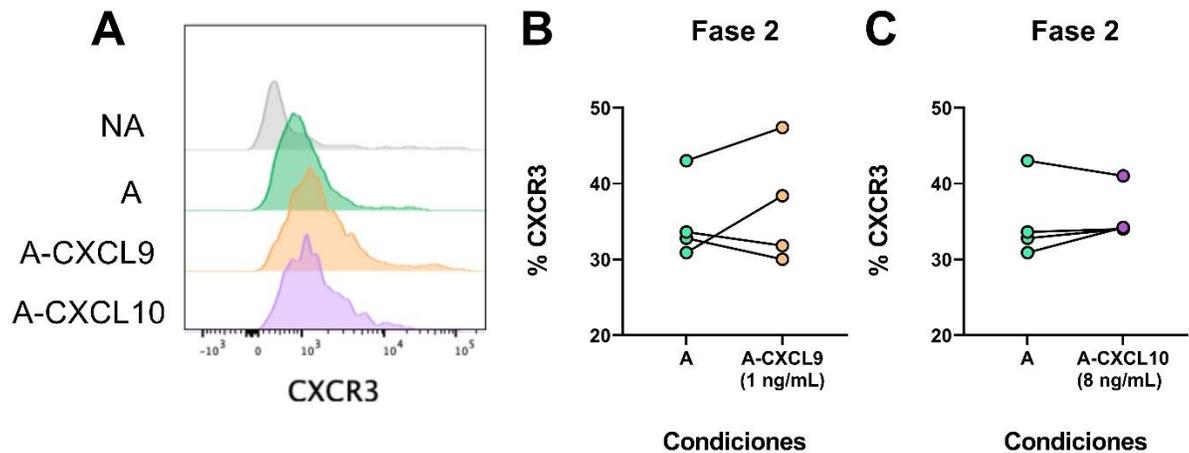


Figura 32: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 2.

A. Histograma representativo de la expresión de CXCR3 en linfocitos B NA, A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 2. **B.** Porcentaje de la expresión de CXCR3 en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 2. **C.** Porcentaje de la expresión de CXCR3 en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 2. El análisis estadístico para B se realizó mediante una prueba t mientras que para C se utilizó una prueba Wilcoxon. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 4 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

De manera similar a lo observado en la fase 2, en la fase 3 se constata un incremento en la expresión del receptor CXCR3 en la superficie de los linfocitos B en las condiciones activadas, tanto en presencia como en ausencia de quimioquinas (Figura 33A). No obstante, se evidencia que la incorporación de CXCL9 o CXCL10 no incide de manera significativa en la expresión del receptor (Figura 33B y C). De hecho, los resultados en esta fase final sugieren que el porcentaje de linfocitos que expresan CXCR3 tiende a disminuir en presencia de CXCL10.

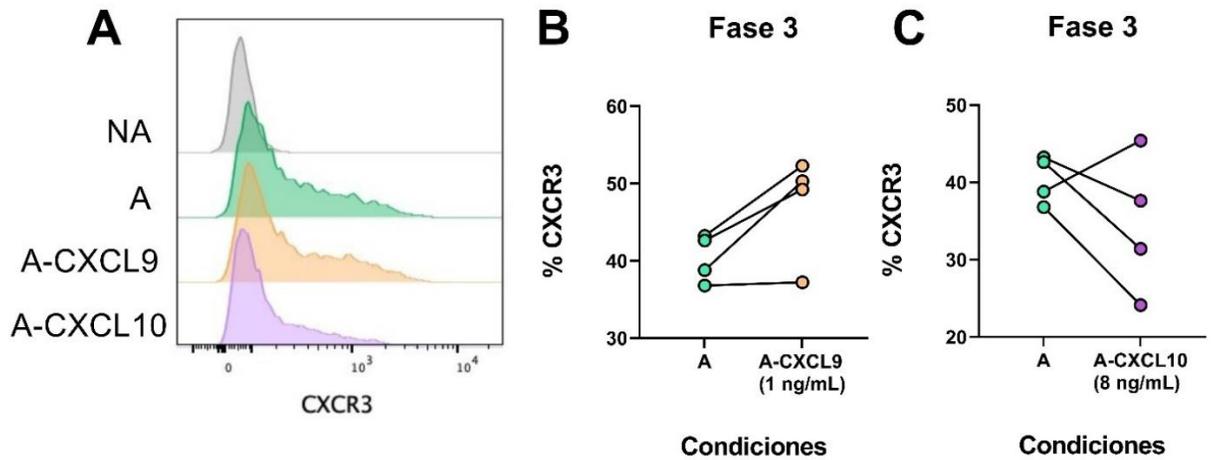


Figura 33: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en linfocitos B activados con y sin adición de CXCL9 o CXCL10 en fase 3.

A. Histograma representativo de la expresión de CXCR3 en linfocitos B NA, A sin adición de quimioquinas y A con CXCL9 o CXCL10 en fase 3. **B.** Porcentaje de la expresión de CXCR3 en linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 3. **C.** Porcentaje de la expresión de CXCR3 en linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 3. El análisis estadístico para B y C se realizó mediante una prueba t y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 4 donantes. NA: No activados. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

La última actividad de este objetivo comprendió la cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG totales en las condiciones de activación con adición de quimioquinas. Los resultados obtenidos señalan que ambas quimioquinas influyen positivamente en la producción de anticuerpos IgG, manifestándose niveles significativamente superiores en las condiciones que incorporan CXCL9 ($p=0,0029$) o CXCL10 ($p=0,0191$) en comparación con la condición activada en ausencia de quimioquinas (Figura 34A y B).

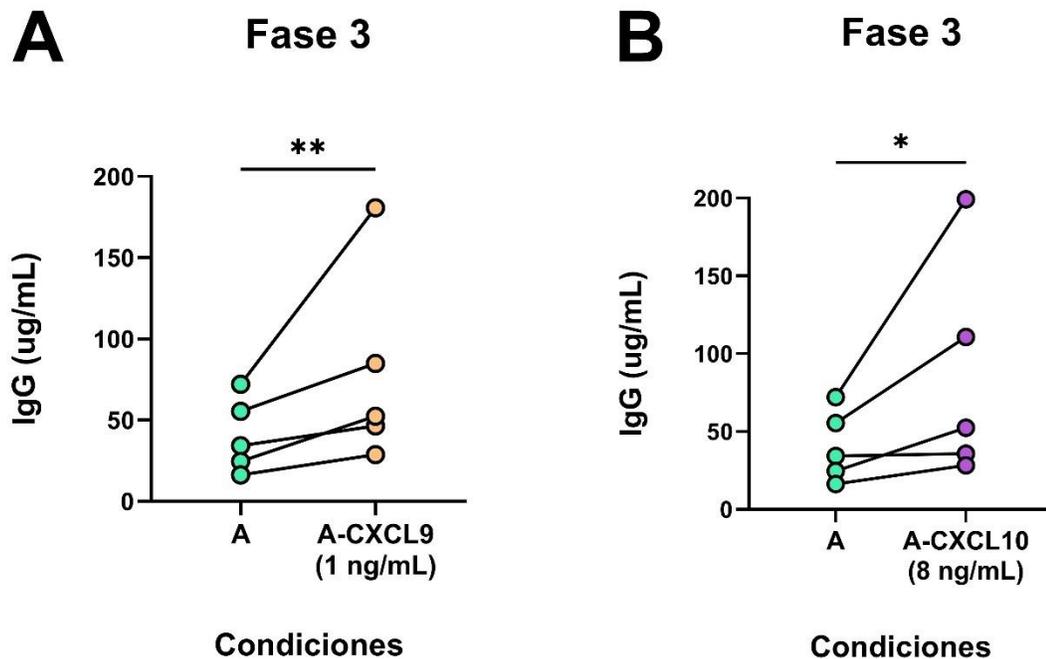


Figura 34: Niveles de anticuerpos IgG desde el sobrenadante de cultivo de linfocitos B activados en fase 3 con o sin adición de CXCL9 o CXCL10.

A. Niveles de anticuerpos IgG totales medidos por ELISA en sobrenadante de linfocitos B A y A con CXCL9 en fase 3. **B.** Niveles de anticuerpos IgG totales medidos por ELISA en sobrenadante de linfocitos B A y A con CXCL10 en fase 3. El análisis estadístico para B y C se realizó mediante una prueba t y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de B y C se trabajó con un n de 5 donantes. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10. ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Objetivo Específico 3: Determinar el efecto de CXCL9 y CXCL10 sobre la expresión de CD40L durante la activación *in vitro* de linfocitos T helper.

Los linfocitos T CD4+ fueron activados en presencia de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10. Además de medir la expresión de CD40L, se evaluó CD25 como un indicador de activación, así como el receptor de ambas quimioquinas, CXCR3.

El análisis reveló que el %CD25 muestra un patrón similar en las condiciones de activación y en las condiciones activadas con la adición de quimioquinas. Se observa un incremento en su expresión hasta alcanzar un peak a las 12 horas posteriores a la activación, a partir del cual comienza a descender su expresión hasta las 48 horas post activación donde se realizó la última determinación (Figura 35A).

El %CXCR3 presenta una dinámica de expresión parecida entre las condiciones, mostrando un peak de expresión a las 12 horas posteriores a la activación, seguido de una disminución después de ese período (Figura 35B). Además, es importante destacar que ambos marcadores, CD25 y CXCR3, presenta expresión basal en los linfocitos T CD4+ previa a la activación.

Por otro lado, la expresión de CD40L muestra un comportamiento diferente. El %CD40L es inicialmente bajo en todas las condiciones analizadas antes de la activación, pero comienza a aumentar rápidamente tras la activación (Figura 35C). Los linfocitos T activados en ausencia de quimioquinas alcanzan su peak de expresión para CD40L a las 12 horas posteriores a la activación, para luego

disminuir hasta niveles basales. En contraste, los linfocitos T activados en presencia de CXCL9 también experimentan un peak de expresión a las 12 horas posteriores a la activación, pero el %CD40L es significativamente mayor en comparación con la condición activada sin quimioquinas ($p=0,0039$). Por último, la activación en presencia de CXCL10 parece acelerar el tiempo necesario para alcanzar la máxima expresión de CD40L en los linfocitos T, ya que el peak se registra a las 6 horas posteriores a la activación, seguido también de una disminución a niveles basales, como se observó en las condiciones anteriores.

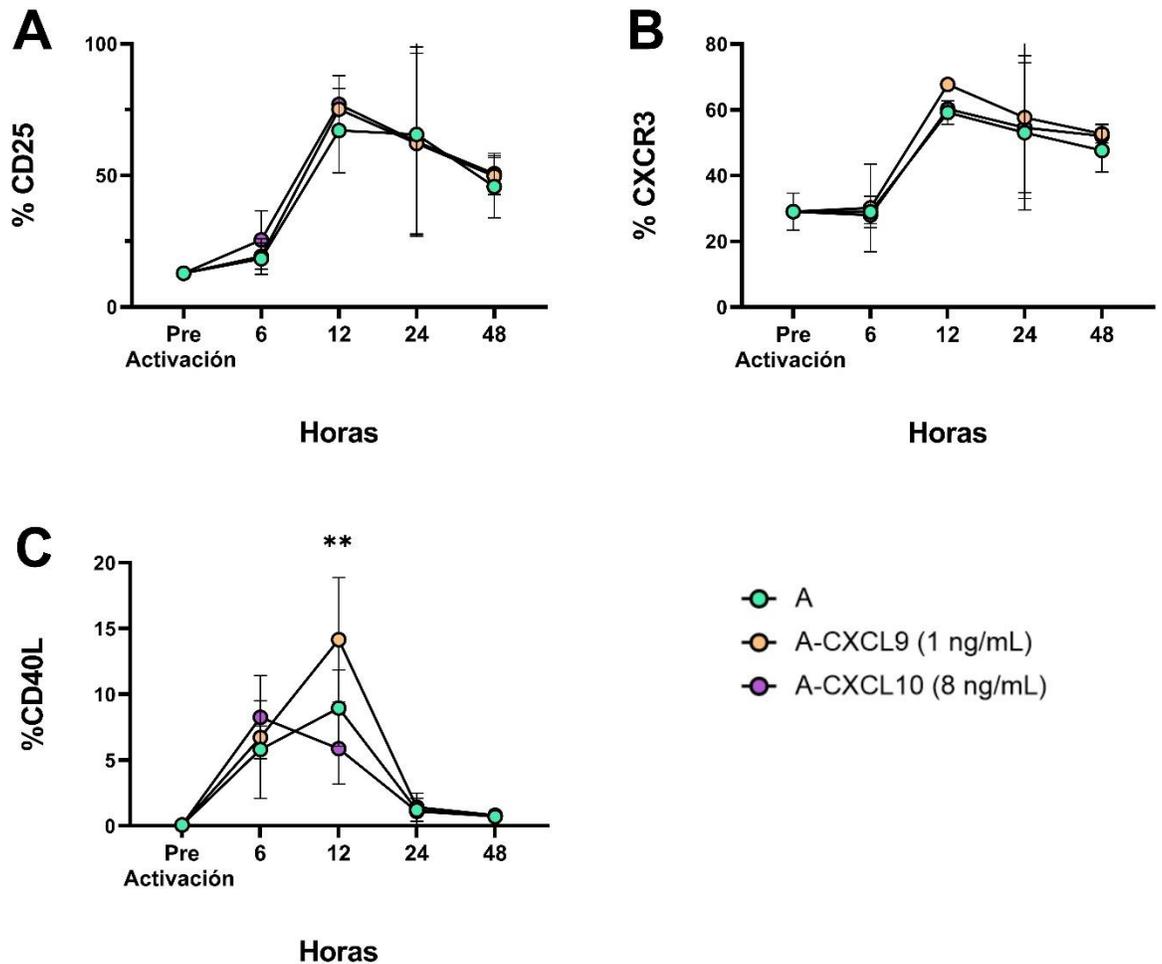


Figura 35: Expresión de CD25, CXCR3 y CD40L en linfocitos T CD4+ activados con o sin adición de CXCL9 o CXCL10.

A. Porcentaje de expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ activados con o sin adición de CXCL9 o CXCL10 previo a la activación y a las 6, 12, 24 y 48 horas post activación. **B.** Porcentaje de expresión de CXCR3 en linfocitos T CD4+ activados con o sin adición de CXCL9 o CXCL10 previo a la activación y a las 6,

12, 24 y 48 horas post activación. **C.** Porcentaje de expresión de CD40L en linfocitos T CD4+ activados con o sin adición de CXCL9 o CXCL10 previo a la activación y a las 6, 12, 24 y 48 horas post activación. El análisis estadístico para A, B y C se realizó mediante una two-way ANOVA y se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para la medición de se trabajó con un n de 3 donantes. A: Activados. A-CXCL9: Activados en presencia de CXCL9. A-CXCL10: Activados en presencia de CXCL10.

DISCUSIÓN

Las investigaciones realizadas en relación con las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 y sus implicancias en fenómenos inflamatorios, se centran, principalmente, en los niveles que éstas presentan en circulación y su relación con un peor pronóstico o estadio de las enfermedades en las que se encuentran con abundancia (Tabla 4). Sin embargo, poco se conoce de los posibles mecanismos que éstas estarían empleando para influir en la desregulación inmune que se observa en fenómenos pro-inflamatorios, destacando la importancia del alcance de los resultados recién mostrados.

En el marco de esta investigación, hemos explorado la diferenciación *in vitro* de los linfocitos B hacia células plasmáticas, con un enfoque en el progreso del fenotipo a lo largo de un sistema de cultivo de tres fases. Este análisis se llevó a cabo con el propósito de comprender mejor los mecanismos de activación y diferenciación de los linfocitos B, así como su potencial implicación en la respuesta inmunológica. Nuestro estudio se origina en un contexto en el que la comprensión de la diferenciación de linfocitos B y su relación con marcadores de activación es crucial, especialmente en enfermedades donde la respuesta inmunológica juega un papel fundamental, como en el contexto del SARS-CoV-2. Dentro de este marco, nuestros resultados han proporcionado información valiosa que respalda la eficacia de nuestro protocolo experimental y su influencia en los procesos de activación y diferenciación de los linfocitos B. A continuación,

discutiremos en detalle los hallazgos claves de nuestra investigación y su relevancia en el contexto de la respuesta inmunológica y las posibles aplicaciones clínicas.

La etapa inicial de esta investigación se centró en la implementación de un protocolo de cultivo de tres fases para inducir la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Inicialmente, se adoptó el protocolo propuesto por Huggins y colaboradores, el cual implicaba tres fases distintas con combinaciones específicas de citoquinas y otros factores activadores (Huggins et al., 2007).

En un esfuerzo por mejorar este protocolo, se realizaron una serie de modificaciones basadas en la literatura científica y la observación experimental. El primer cambio significativo fue la incorporación de fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo anti-IgM humano en la fase 1 del cultivo con el propósito de añadir un estimulador del BCR, del que se carecía en el protocolo inicial y constituye una señalización crucial para la supervivencia y activación de los linfocitos B (Ouchida et al., 2012). Sin embargo, esta estimulación se decidió hacer finalmente con un antígeno, en este caso RBD recombinante. Esta decisión fue importante para mejorar el protocolo, ya que se ha demostrado que los antígenos pueden estimular de forma más efectiva el BCR que los anticuerpos contra IgM. El segundo no es capaz de generar señalización celular en su forma monomérica (Fracción Fab anti-IgM monovalente) teniendo que constituir de forma mínima su estructura dimérica para generar respuesta. Sin embargo, se ha observado que, si bien la activación del BCR aumenta con la valencia del antígeno, un antígeno

monomérico puede provocar fácilmente la fosforilación de tirosina, la movilización de calcio y la internalización de BCR a diferencia del anticuerpo (Kim et al., 2006). Además, se reemplazó el co-cultivo de linfocitos T CD4+ como fuente de CD40L propuesto inicialmente por un MegaCD40L comercial. El CD40L es un modulador clave en la diferenciación de células B en células plasmáticas y se ha usado a lo largo de las investigaciones para la producción de anticuerpos *in vitro*, ya que desencadena la proliferación celular, la expansión, la diferenciación y el cambio de isotipo en células B (Elgueta et al., 2009). Este ajuste permitió evitar la complejidad de trabajar con dos poblaciones celulares de manera simultánea y reducir las variables que podrían afectar el proceso. Asimismo, el MegaCD40L confiere bastante ventajas sobre el CD40L comercial tradicional, ya que presenta una mayor estabilidad y actividad, sin la necesidad de utilizar algún potenciador de la actividad de CD40L para mejorar su eficacia.

Finalmente, se sumaron citoquinas esenciales para la diferenciación, como IL-21, que incluso se ha destacado como la más influyente para la activación y diferenciación de las células B humanas, y el factor activador de linfocitos B (BAFF), conocido por su papel en la homeostasis y supervivencia de los linfocitos B. Además, Karnell y colaboradores en su revisión hacen hincapié en una serie de investigaciones que han demostrado que IL-21 y BAFF pueden trabajar en conjunto para promover y quizás mantener la inmunidad humoral en humanos (Karnell & Ettinger, 2012).

En resumen, la optimización del protocolo de cultivo de tres fases se basó en una serie de modificaciones destinadas a mejorar la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas. Estas modificaciones se basaron en la investigación científica previa y la observación experimental, y se centraron en la regulación de señales de supervivencia y activación, así como en la incorporación de citoquinas clave para el proceso de diferenciación. La efectividad de estos ajustes se evaluó a lo largo del objetivo 1.

Nuestros primeros resultados, apuntan hacia el progreso fenotípico en la expresión de CD27CD38 y CD138 como marcadores de diferenciación de los linfocitos B durante las tres fases del sistema de cultivo utilizado. La identificación de la población de linfocitos CD27^{hi}CD38^{hi} por medio de citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada en el campo, estableciéndose como marcaje esencial para el reconocimiento de plasmoblastos (Rouers et al., 2021), los que, a su vez, se conocen por diferenciarse a células plasmáticas secretoras de anticuerpos asociadas con una respuesta inmune de células B antígeno-específica (Pattanapanyasat et al., 2018). Nuestros hallazgos de acuerdo a esta población indican que, por un lado, las tres fases del protocolo inducen un aumento en la expresión de estos marcadores en comparación a la condición no activada que no fue sometida a la implementación del protocolo. Sin embargo, podemos ver que en fase 3 se presenta un alza en la expresión de CD27+CD38+ importante lo que la convierte en una fase crucial para la diferenciación de la célula (Figura 23A), adquiriendo el adjetivo de diferenciadora en nuestro protocolo.

El marcador CD138, por su lado, se ha utilizado en un extenso número de estudios para la caracterización de células plasmáticas, lo que lo ha validado como marcaje específico para esta población celular (O'Connell et al., 2004; Tian et al., 2023). Ya que la fase 3 se caracterizó como una fase diferenciadora por excelencia en nuestro protocolo, fue que este se midió exclusivamente al finalizar el sistema de cultivo, donde observamos que la expresión para CD138 aumenta significativamente entre la condición activada y no activada en fase 3 (Figura 23B). Si bien, el porcentaje de expresión promedio es bajo para este marcaje en comparación con la detección de CD27CD38, no lo hace menos relevante, ya que junto con CD38, no se expresa en células B circulantes (Suimon et al., 2020). Para corroborar la existencia de células plasmáticas, se evaluó, además, la producción de anticuerpos IgG totales a partir del sobrenadante de la fase 3 del sistema de cultivo. Esto se realizó mediante un ensayo ELISA específico para detectar IgG humana, y se comparó con el medio de cultivo utilizado en todo el protocolo experimental (Figura 24). La detección de anticuerpos IgG únicamente en la condición activada confirmó la eficacia de nuestro sistema de cultivo para lograr la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos y la ausencia de IgG en el medio de cultivo, confirmó que no existen interferencias en los reactivos utilizados que pudiesen indicar falsos positivos para la detección de IgG.

Dejando de lado el análisis fenotípico de la diferenciación en linfocitos B, se evaluó la expresión de CD86 durante las tres fases del protocolo como marcador

de activación. La expresión de CD86 en células presentadoras de antígenos profesionales, como el linfocito B, es de gran importancia para establecer la coestimulación de los linfocitos T a través de CD28, lo que podría influir en la activación de las células T u ofrecer ayuda de las células T a las células B en este aspecto. Específicamente, en cuanto a lo que respecta a los linfocitos B, se ha sugerido que la expresión de CD86 aumenta en los plasmoblastos, siendo importante para la producción de anticuerpos, y en los linfocitos B de memoria, en comparación con los linfocitos B vírgenes donde la expresión de CD86 se considera baja o indetectable (Axelsson et al., 2020).

Nuestros hallazgos comprueban que la expresión de CD86 en los linfocitos B expuestos al cóctel de activación aumenta sustancialmente a medida que se avanza en las fases del protocolo, observándose diferencias significativas en las últimas dos del protocolo en relación con los linfocitos B no activados (Figura 25B). Este resultado, sumado a los anteriores, apoya nuevamente la eficacia del protocolo utilizado.

Finalmente, en la última actividad para el objetivo 1 se midió la expresión del receptor para las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, CXCR3, en linfocitos B no activados y activados durante las 3 fases de cultivo (Figura 26). Si bien, las células presentan una expresión basal del receptor, ésta aumenta significativamente en la fase inicial del protocolo (Figura 26B), siendo susceptible al cóctel de activación. Si bien esta expresión continúa aumentando en las dos fases posteriores, se puede observar que comienza a estabilizarse, llegando a

una máxima expresión (Figura 26C). La literatura sobre la expresión de CXCR3 en linfocitos B es controversial y contradictoria. Por un lado, algunos autores señalan a este receptor como un marcador de células B malignas debido a su notable presencia en pacientes con trastornos linfoproliferativos crónicos, como la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma no Hodgkin (LNH), en relación con células B en circulación de sujetos sanos (Jones et al., 2000; Trentin et al., 1999). Sin embargo, otros investigadores han encontrado que CXCR3 también se expresa en células B normales, y que su expresión no está necesariamente asociada con la malignidad. Por ejemplo, Henneken y colaboradores, analizaron los niveles de expresión de distintos receptores de quimioquinas, entre los que se encuentra CXCR3, en pacientes con AR y Lupus Eritematoso Sistémico (LES) en comparación con donantes sanos. Sus resultados muestran que todos los linfocitos B, independiente de su procedencia, expresaban niveles similares para CXCR3. Tras la diferenciación, el nivel de expresión de CXCR3 pareció regularse positivamente porque la frecuencia de los linfocitos B CXCR3^{hi} aumentó desde linfocitos B vírgenes hasta los de memoria (Henneken et al., 2005). Muehlinghaus y colaboradores, observaron también que la expresión de este receptor cambia a lo largo del proceso de diferenciación de los linfocitos B. Demostraron que CXCR3 está ausente en las células B *naive* CD27⁻, pero se expresa en una fracción de las células B de memoria. Al diferenciarse en precursoras de células plasmáticas, las células B de memoria CXCR3⁺ mantienen la expresión de este receptor (Muehlinghaus et al., 2005), lo que se condice con nuestros hallazgos.

En síntesis, el primer objetivo nos muestra que el proceso de optimización del protocolo de tres fases resultó en un método eficaz y robusto para la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas *in vitro*, lo que se refleja en los resultados recientemente discutidos. Esto permitió dar paso al segundo objetivo y proporcionarnos una base confiable para evaluar el efecto de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 en el proceso de diferenciación y activación de los linfocitos B *in vitro*.

Los hallazgos del segundo objetivo inician con la evaluación de la expresión de marcadores de activación como CD86, CD25 y HLA-DR en respuesta a la presencia de CXCL9 y CXCL10 durante la fase 2 del protocolo de cultivo. Fueron observados en esta fase, ya que, según lo observado anteriormente, se reconoce la segunda parte del sistema de cultivo por tener una naturaleza activadora.

Se observó que la adición de CXCL9 y CXCL10 en la fase 2 del protocolo tuvo un impacto en la expresión de CD86 (Figura 27). La condición con CXCL9 mostró un aumento significativo en la expresión de CD86 en comparación con la condición activada sin quimioquinas, mientras que CXCL10 no logró el mismo efecto, lo que sugiere que CXCL9 puede potenciar la activación de linfocitos B.

Por otro lado, la evaluación de CD25 reveló un incremento en su expresión en todas las condiciones de activación, incluyendo aquellas activadas con CXCL9 y CXCL10, como se representa en la Figura 28. No obstante, es importante destacar que no se observó un aumento significativo en la expresión de CD25 en

respuesta a la presencia de estas quimioquinas. Un patrón de comportamiento similar se observó en el marcador HLA-DR. Si bien la expresión de ambos marcadores tiende a aumentar o, al menos, a mantenerse elevada en las condiciones que incorporaron quimioquinas, no se alcanzó una significancia estadística, como se ilustra en la Figura 29. Estos resultados indican la posibilidad de que las quimioquinas podrían ejercer algún efecto positivo en la expresión de CD25 y HLA-DR en los linfocitos B. Sin embargo, es relevante señalar que los resultados actuales no se encuentran respaldados estadísticamente, lo que sugiere que podría ser necesario un mayor refinamiento de las técnicas de análisis o una evaluación más detallada para corroborar estos efectos potenciales. Recientemente, abordamos la importancia de CD86 como marcador de activación en linfocitos B. CD25, por su parte, constituye la subunidad alfa del receptor de IL-2, la cual se ha destacado por ser una citoquina crucial para la expansión y supervivencia de linfocitos en general, destacándose por impulsar la diferenciación de células B activadas hacia células plasmáticas independientemente de sus funciones de proliferación y supervivencia (Le Gallou et al., 2012). Brisslert y colaboradores, realizaron una caracterización fenotípica y funcional de las células B CD25+ humanas. Tras el análisis por citometría de flujo, observaron que las células B CD25+ eran significativamente más grandes y granuladas que las células B que no expresaban CD25. Además, las células B CD25 +, expresaron niveles significativamente más altos de inmunoglobulinas (Igs) de superficie, pero carecían de la capacidad de secretar Igs en comparación

con las células B CD25⁻ y se desempeñaron significativamente mejor como células presentadoras de antígenos caracterizándose por altos niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD80. Sin embargo, no queda claro si representan un subgrupo de células B o más bien constituyen un estadio dentro de la activación y diferenciación del linfocito B (Brisslert et al., 2006).

Por otro lado, HLA-DR, que corresponde al antígeno leucocitario humano isotipo DR, es un antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Las proteínas del MHC de clase II expresadas por las células B son esenciales para su interacción con las células T y la posterior aparición de células productoras de anticuerpos de corta y larga vida (Akkaya et al., 2020). También se ha señalado que el HLA-DR en los linfocitos B no solo es relevante en el contexto de la presentación de péptidos antigénicos a las células T, sino que su estimulación también regula positivamente la producción de IgM (Tabata et al., 2000), por lo que su expresión podría ser relevante en el inicio de la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas.

Sobre el análisis fenotípico de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, se examinó la coexpresión de los marcadores de superficie CD27CD38, así como la expresión de CD138 (Figura 30 y 31) Los resultados indicaron que la adición de CXCL9 y CXCL10 aumentó significativamente la población de linfocitos B CD27^{hi}CD38^{hi} y fortaleció la expresión de CD138, hallazgos que respaldan la idea de que estas quimioquinas potencian la

diferenciación de los linfocitos B, lo que es fundamental para una respuesta inmune efectiva.

La evaluación de CXCR3, el receptor de las quimioquinas, reveló que su presencia aumenta en las células sometidas al sistema de cultivo en comparación con la condición no activada tanto en fase 2 como en fase 3 (Figura 32 y 33). Sin embargo, no se observó un incremento significativo en su expresión como resultado de la adición de CXCL9 y CXCL10, lo que sugiere los niveles de CXCR3 no se ven afectados de manera significativa por estas quimioquinas, en donde incluso se puede observar que para algunos donantes la expresión disminuye en la activación en presencia de CXCL10 en fase 2 y 3.

Por último, se midieron los niveles de anticuerpos IgG totales en las condiciones de activación con adición de quimioquinas. Los resultados indican que tanto CXCL9 como CXCL10 influyeron positivamente en la producción de anticuerpos IgG, manifestando niveles significativamente superiores en estas condiciones en comparación con la condición activada en ausencia de quimioquinas. Esto respalda la idea de que CXCL9 y CXCL10 tienen un efecto positivo en la producción de anticuerpos IgG y se suma a los hallazgos fenotípicos que dan respuesta a este objetivo.

Para el propósito de esta investigación, no se encontraron estudios que evalúen de forma directa la expresión de marcadores de activación y/o diferenciación en linfocitos B ni relaciones con los niveles de IgG, bajo los efectos de CXCL9 y CXCL10. Sin embargo, ambas quimioquinas se han destacado en literatura por

relacionarse con enfermedades pro-inflamatorias y sus estadios más severos (Tabla 4), proponiéndose incluso como predictores de la supervivencia en cáncer de ovario avanzado (Bronger et al., 2016). Las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 se destacan por estar elevadas en enfermedades donde la desregulación inmune es crucial y en donde la producción exacerbada de anticuerpos contribuye al desarrollo de la patogenia, como en COVID-19. Si bien, no hay estudios directos que avalen estos resultados, proponemos este aumento significativo en la producción de IgG como parte de los fenómenos inmunes que se podrían estar alterando por los elevados niveles de las quimioquinas.

En cuanto a CXCR3, se ha descrito que las células plasmáticas requieren la expresión de CXCR4 y CXCR3 en su superficie para llegar a la médula ósea por quimiotaxis. Marques y colaboradores, tras realizar su investigación en un modelo de ratón, demostraron que el receptor CXCR3 desempeña un papel crucial en la acumulación de células productoras de antígenos en el parénquima del sistema nervioso central durante la encefalomiелitis inducida por coronavirus neurotrópico. Los resultados sugieren que antes de su acumulación en el sistema nervioso central (SNC), estas células que expresan CXCR3 se expanden en los ganglios linfáticos drenantes, lo que sugiere que son reclutadas gracias a la expresión sostenida de ligandos de CXCR3 durante la persistencia viral. Se observó que la ausencia de CXCR3 en ratones infectados redujo en más del 80% el número total de células productoras de anticuerpo como también las específicas para el virus en el SNC (Marques et al., 2011). Esta evidencia, sugiere

que la presencia de este receptor en las células B activadas y diferenciadas es esencial para que estas puedan realizar las acciones de protección para las cuales están destinadas. Sin embargo, no sitúa su expresión dentro de los marcadores importantes para su activación y diferenciación. Esto se condice con nuestros resultados, ya que si bien se observa cómo este receptor aumenta tras la activación, su expresión no se encuentra ligada al avance en el sistema de cultivo con o sin adición de quimioquinas.

En el último objetivo, se analizó cómo la presencia de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 influye en la expresión de CD40L durante la activación de linfocitos T CD4+. Además de medir la expresión de CD40L, se evaluó CD25 y CXCR3.

Los resultados revelaron que el porcentaje de células expresando CD25 mostró un patrón similar en todas las condiciones de activación, aumentando su expresión hasta alcanzar un peak a las 12 horas posteriores a la activación antes de comenzar a descender, independiente de la ausencia o presencia de las quimioquinas CXCL9 o CXCL10 (Figura 35A)

El porcentaje de células que expresan CXCR3 también mostró una dinámica de expresión similar entre las condiciones, con un máximo de expresión a las 12 horas posteriores a la activación, para luego disminuir (Figura 35B). Es importante destacar que CD25 y CXCR3 presentaban una expresión basal en los linfocitos T CD4+ antes de la activación, lo que indica que se expresan en células T CD4+ circulantes.

Por su lado, el porcentaje de células que expresan CD40L fue inicialmente bajo en todas las condiciones antes de la activación. Tras la activación, comenzó a aumentar rápidamente en todos los grupos. Sin embargo, se observó que la presencia de CXCL9 condujo a un aumento significativo en la expresión de CD40L en comparación con la condición activada sin quimioquinas. Esto se reflejó en un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresaban CD40L a las 12 horas posteriores a la activación en presencia de CXCL9. Por otro lado, la activación en presencia de CXCL10 pareció acelerar el tiempo necesario para alcanzar la máxima expresión de CD40L en los linfocitos T, con un peak que se registró a las 6 horas posteriores a la activación.

En linfocitos T, CD25 es un componente importante en la proliferación y la muerte celular inducida por activación, así como en las acciones de los linfocitos T reguladores (Treg) y efectores (Teff). Su expresión en linfocitos T CD4+ tiene principal relación con un fenotipo regulador, mientras que en linfocitos Teff (CD4+CD25-), se ha observado que CD25 se regula positivamente tras la activación, pero luego su expresión disminuye, ya que se libera en el medio de cultivo como CD25 soluble (Brusko et al., 2009), lo que podría estar relacionado con el alza y luego disminución de expresión en nuestro resultado.

A diferencia de lo ocurrido con los linfocitos B, CXCR3 ha sido ampliamente estudiado en linfocitos T. Se ha descrito que se encuentra expresado altamente en los linfocitos T efectores, desempeñando un papel importante en el tráfico y su función. CXCR3 se induce rápidamente tras la activación y preferentemente

permanece altamente expresado en células T CD4+ Th1. Estudios más recientes sugieren que CXCR3 desempeña un papel en la migración de los linfocitos T en el microambiente del tejido periférico y el compartimento linfoide, facilitando la interacción de estos con las células presentadoras de antígenos que conducen a la generación de células efectoras y de memoria (Groom & Luster, 2011), lo que se condice con el análisis de nuestros resultados.

Por último, ya hemos destacado previamente la importancia de la señalización del CD40L para la diferenciación de células B y el cambio de isotipo durante la producción de anticuerpos. Sin embargo, Marsman y colaboradores sugieren que esta interacción entre las poblaciones de linfocitos T CD4+ y B, es mucho más compleja y dinámica. Los resultados de su investigación muestran que el momento en el que se realice esta comunicación es crucial, ya que la naturaleza transitoria de la señalización de CD40/CD40L es, de hecho, necesaria para una diferenciación eficiente de linfocitos B vírgenes en células plasmáticas (Marsman et al., 2022). Lo que indica la importancia de la dinámica de su expresión luego de la activación.

Estos resultados sugieren que tanto CXCL9 como CXCL10 tienen un impacto en la expresión de CD40L durante la activación de linfocitos T CD4+, lo que podría tener implicaciones importantes en la interacción entre linfocitos T y células B en el contexto de respuestas inmunitarias. El aumento de CD40L en presencia de CXCL9 podría indicar una mayor capacidad de activación de las células T *helper*, lo que podría influir en la respuesta inmunitaria en condiciones inflamatorias o

infecciosas. Por otro lado, la aceleración de la expresión de CD40L en presencia de CXCL10 podría indicar una respuesta más rápida de los linfocitos T *helper* en ciertos contextos. Estos hallazgos proporcionan información valiosa sobre cómo estas quimioquinas pueden modular la activación de los linfocitos T CD4+ y, por consiguiente, la respuesta inmunitaria.

Para finalizar, a pesar de los resultados obtenidos, no podemos dejar de lado comentar las limitaciones de este estudio. Como limitación principal, se encuentra el número limitado de donantes reclutados para realizar los ensayos y la variabilidad genética de cada uno de ellos para evaluar los fenómenos recientemente descritos. Por otro lado, las concentraciones de las quimioquinas y los reactivos usados en el sistema de cultivo *in vitro*, si bien intenta recrear lo que ocurre en el microambiente de centro germinal, no podemos saber con exactitud qué tan cercano o lejano se encuentra de la realidad.

CONCLUSIÓN

En conclusión, esta investigación proporciona un análisis de los efectos de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 en la activación y diferenciación de los linfocitos B y T, así como en la producción de anticuerpos IgG. A través de un protocolo de cultivo de tres fases optimizado, se demostró que este es altamente eficaz para inducir la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas *in vitro*, convirtiéndolo en una herramienta valiosa para comprender mejor los mecanismos que envuelven la activación y diferenciación de los linfocitos B y, por lo tanto, es fundamental para investigaciones relacionadas con respuestas inmunológicas en enfermedades como el SARS-CoV-2.

Los resultados muestran que la adición de CXCL9 y CXCL10 en las fases 2 y 3 del protocolo tiene un impacto significativo en la expresión de marcadores de activación de linfocitos B, como CD86, y por sobre todo, un efecto directo sobre el fenotipo de diferenciación donde se observa un aumento en la población de linfocitos B CD27^{hi}CD38^{hi} y una mayor expresión de CD138 en respuesta a CXCL9 y CXCL10, que junto con el alza en los niveles de IgG, respaldan la idea de que estas quimioquinas influyen positivamente en la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

En linfocitos T CD4+, la presencia de CXCL9 también tuvo efectos notablemente positivos en la expresión de CD40L, lo que podría influir en la interacción entre linfocitos T y células B y, en consecuencia, en el desarrollo de la respuesta inmunitaria.

A pesar de las limitaciones de los métodos empleados, esta investigación arroja luz sobre cómo las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 pueden desempeñar un papel importante en la modulación de la activación y diferenciación de los linfocitos B y T, así como en la producción de anticuerpos IgG, lo que tiene implicaciones potenciales en la respuesta inmunitaria en diversas condiciones, particularmente en contextos inflamatorios e infecciosos. Además, cabe mencionar, que es una de las primeras investigaciones que aborda la relación directa que podría existir entre estas quimioquinas proinflamatorias y sus posibles efectos en la respuesta inmune humoral, sobre todo en un ambiente desregulado. Estos resultados abren nuevas vías de investigación en el campo de la inmunología y pueden tener aplicaciones clínicas significativas en el futuro. A modo de proyección, aún queda dilucidar qué mecanismos y vías de activación estarían utilizando estas quimioquinas para inducir favorecer la diferenciación de linfocitos B y la producción de anticuerpos IgG.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtmann, A., Pillai, S. (2018). Activación del linfocito B y producción de anticuerpos. *Inmunología celular y molecular* (9.^a ed., Vol. 1, pp. 251–274). Elsevier.
- Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), 229-238.
- Anolik, J. H., Ravikumar, R., Barnard, J., Owen, T., Almudevar, A., Milner, E. C., Miller, C. H., Dutcher, P. O., Hadley, J. A., & Sanz, I. (2008). Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks. *The Journal of Immunology*, 180(2), 688-692. -
- Arger, N. K., Ho, M. E., Allen, I. E., Benn, B. S., Woodruff, P. G., & Koth, L. L. (2020). CXCL9 and CXCL10 are differentially associated with systemic organ involvement and pulmonary disease severity in sarcoidosis. *Respir Med*, 161, 105822.
- Arroyo-Díaz, N. M., Bachus, H., Papillion, A., Randall, T. D., Akther, J., Rosenberg, A. F., León, B., & Ballesteros-Tato, A. (2023). Interferon- γ production by Tfh cells is required for CXCR3+ pre-memory B cell differentiation and subsequent lung-resident memory B cell responses. *Immunity*.
- Ascencio, P. L. (2006). Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación. *Revista Médica Vallejana/Vallejian Medical Journal*, 3(2), 133-139.
- Axelsson, S., Magnuson, A., Lange, A., Alshamari, A., Hörnquist, E. H., & Hultgren, O. (2020). A combination of the activation marker CD86 and the immune checkpoint marker B and T lymphocyte attenuator (BTLA) indicates a putative permissive activation state of B cell subtypes in healthy blood donors independent of age and sex. *BMC immunology*, 21(1), 1-9.
- Bishop, G. A., & Hostager, B. S. (2001). B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 13(3), 278-285.
- Brisslert, M., Bokarewa, M., Larsson, P., Wing, K., Collins, L. V., & Tarkowski, A. (2006). Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. *Immunology*, 117(4), 548-557.
- Bronger, H., Singer, J., Windmüller, C., Reuning, U., Zech, D., Delbridge, C., Dorn, J., Kiechle, M., Schmalfeldt, B., & Schmitt, M. (2016). CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *British journal of cancer*, 115(5), 553-563.

- Brusko, T. M., Wasserfall, C. H., Hulme, M. A., Cabrera, R., Schatz, D., & Atkinson, M. A. (2009). Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. *PLoS One*, 4(11), e7980.
- Caldarale, F., Giacomelli, M., Garrafa, E., Tamassia, N., Morreale, A., Poli, P., Timpano, S., Baresi, G., Zunica, F., Cattalini, M., Moratto, D., Chiarini, M., Cannizzo, E. S., Marchetti, G., Cassatella, M. A., Taddio, A., Tommasini, A., & Badolato, R. (2021). Plasmacytoid Dendritic Cells Depletion and Elevation of IFN-gamma Dependent Chemokines CXCL9 and CXCL10 in Children With Multisystem Inflammatory Syndrome. *Front Immunol*, 12, 654587. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.654587>
- Callahan, V., Hawks, S., Crawford, M. A., Lehman, C. W., Morrison, H. A., Ivester, H. M., Akhrymuk, I., Boghdeh, N., Flor, R., Finkielstein, C. V., Allen, I. C., Weger-Lucarelli, J., Duggal, N., Hughes, M. A., & Kehn-Hall, K. (2021). The Pro-Inflammatory Chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 Are Upregulated Following SARS-CoV-2 Infection in an AKT-Dependent Manner. *Viruses*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/v13061062>
- Chambers, J. P., Yu, J., Valdes, J. J., & Arulanandam, B. P. (2020). SARS-CoV-2, early entry events. *Journal of Pathogens*, 2020.
- Che, X.-y., Qiu, L.-w., Pan, Y.-x., Wen, K., Hao, W., Zhang, L.-y., Wang, Y.-d., Liao, Z.-y., Hua, X., & Cheng, V. C. (2004). Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2629-2635. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427886/pdf/2089-03.pdf>
- Dong, X., Zhang, J., Yang, F., Liu, J., Peng, Y., & Ge, Y. (2021). CXCL8, CXCL9, and CXCL10 serum levels increase in syphilitic patients with seroresistance. *J Clin Lab Anal*, 35(11), e24016. <https://doi.org/10.1002/jcla.24016>
- Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., & Luster, A. D. (2002). IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*, 168(7), 3195-3204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3195>
- Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews*, 229(1), 152-172.
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32, 659-702.
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Experimental cell research*, 317(5), 620-631.
- Henneken, M., Dörner, T., Burmester, G.-R., & Berek, C. (2005). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from

- patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 7, 1-13.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., & Nitsche, A. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2), 271-280. e278. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/pdf/main.pdf>
- Huggins, J., Pellegrin, T., Felgar, R. E., Wei, C., Brown, M., Zheng, B., Milner, E. C., Bernstein, S. H., Sanz, I., & Zand, M. S. (2007). CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27⁻ naive human B cells. *Blood*, 109(4), 1611-1619.
- Jones, D., Benjamin, R. J., Shahsafaei, A., & Dorfman, D. M. (2000). The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(2), 627-632.
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D., & Klein, B. (2009). An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(25), 5173-5181.
- Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F., & Sanz, I. (2012). Advances in human B cell phenotypic profiling. *Frontiers in immunology*, 3, 302.
- Karnell, J. L., & Ettinger, R. (2012). The interplay of IL-21 and BAFF in the formation and maintenance of human B cell memory. *Frontiers in immunology*, 3, 2.
- Kim, Y.-M., Pan, J. Y.-J., Korbel, G. A., Peperzak, V., Boes, M., & Ploegh, H. L. (2006). Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3327-3332.
- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E., & Ettinger, R. (2007). Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4⁺ T cell-B cell collaboration. *The Journal of Immunology*, 179(9), 5886-5896.
- Le Gallou, S., Caron, G., Delaloy, C., Rossille, D., Tarte, K., & Fest, T. (2012). IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *The Journal of Immunology*, 189(1), 161-173.
- Liu, T., Li, J., Deng, Z., Chen, M., Sha, K., Xiao, W., Xie, H., & Zhao, Z. (2022). Increased serum levels of CCL3, CXCL8, CXCL9, and CXCL10 in rosacea patients and their correlation with disease severity. *J Dermatol*, 49(5), 525-533. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.16329>
- Ma, B., Khazali, A., & Wells, A. (2015). CXCR3 in carcinoma progression. *Histol Histopathol*, 30(7), 781-792. <https://doi.org/10.14670/HH-11-594>

- Maniu, I., Maniu, G. C., Antonescu, E., Duica, L., Grigore, N., & Totan, M. (2023). SARS-CoV-2 Antibody Responses in Pediatric Patients: A Bibliometric Analysis. *Biomedicines*, *11*(5), 1455.
- Marcuzzi, E., Angioni, R., Molon, B., & Cali, B. (2018). Chemokines and chemokine receptors: orchestrating tumor metastasization. *International journal of molecular sciences*, *20*(1), 96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337330/pdf/ijms-20-00096.pdf>
- Marques, C. P., Kapil, P., Hinton, D. R., Hindinger, C., Nutt, S. L., Ransohoff, R. M., Phares, T. W., Stohlman, S. A., & Bergmann, C. C. (2011). CXCR3-dependent plasma blast migration to the central nervous system during viral encephalomyelitis. *Journal of virology*, *85*(13), 6136-6147.
- Marsman, C., Verstegen, N. J., Streutker, M., Jorritsma, T., Boon, L., Ten Brinke, A., & van Ham, S. M. (2022). Termination of CD40L co-stimulation promotes human B cell differentiation into antibody-secreting cells. *European journal of immunology*, *52*(10), 1662-1675.
- Muehlinghaus, G., Cigliano, L., Huehn, S., Peddinghaus, A., Leyendeckers, H., Hauser, A. E., Hiepe, F., Radbruch, A., Arce, S., & Manz, R. A. (2005). Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood*, *105*(10), 3965-3971.
- Nanki, T., Takada, K., Komano, Y., Morio, T., Kanegane, H., Nakajima, A., Lipsky, P. E., & Miyasaka, N. (2009). Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, *11*, 1-11.
- Nazari, A., Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Abbasifard, M., Taghipour, Z., Falahati-Pour, S. K., & Khorramdelazad, H. (2020). Effective Treatments for Bladder Cancer Affecting CXCL9/CXCL10/CXCL11/CXCR3 Axis: A Review. *Oman Med J*, *35*(2), e103. <https://doi.org/10.5001/omj.2020.21>
- O'Connell, F. P., Pinkus, J. L., & Pinkus, G. S. (2004). CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker: immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *American journal of clinical pathology*, *121*(2), 254-263.
- Ouchida, R., Mori, H., Hase, K., Takatsu, H., Kurosaki, T., Tokuhisa, T., Ohno, H., & Wang, J.-Y. (2012). Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), E2699-E2706.
- Pattanapanyasat, K., Khowawisetsut, L., Chuansumrit, A., Chokephaibulkit, K., Tangnaratchakit, K., Apiwattanakul, N., Techasaensiri, C., Thitilertdecha, P., Sae-Ung, T., & Onlamoon, N. (2018). B cell subset alteration and the expression of tissue homing molecules in dengue infected patients. *Journal of biomedical science*, *25*(1), 1-11.
- Pein, M., Insua-Rodriguez, J., Hongu, T., Riedel, A., Meier, J., Wiedmann, L., Decker, K., Essers, M. A. G., Sinn, H. P., Spaich, S., Sutterlin, M.,

- Schneeweiss, A., Trumpp, A., & Oskarsson, T. (2020). Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. *Nat Commun*, 11(1), 1494. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15188-x>
- Qian, C., An, H., Yu, Y., Liu, S., & Cao, X. (2007). TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. *Blood*, 109(8), 3308-3315. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040337>
- Qin, R., He, L., Yang, Z., Jia, N., Chen, R., Xie, J., Fu, W., Chen, H., Lin, X., & Huang, R. (2023). Identification of parameters representative of immune dysfunction in patients with severe and fatal COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 64(1), 33-65.
- Rouers, A., Appanna, R., Chevrier, M., Lum, J., Lau, M. C., Tan, L., Loy, T., Tay, A., Sethi, R., & Sathiakumar, D. (2021). CD27^{hi}CD38^{hi} plasmablasts are activated B cells of mixed origin with distinct function. *IScience*, 24(5).
- Shiu, J., Zhang, L., Lentsch, G., Flesher, J. L., Jin, S., Polleys, C., Jo, S. J., Mizzone, C., Mobasher, P., Kwan, J., Rius-Diaz, F., Tromberg, B. J., Georgakoudi, I., Nie, Q., Balu, M., & Ganesan, A. K. (2022). Multimodal analyses of vitiligo skin identify tissue characteristics of stable disease. *JCI Insight*, 7(13). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.154585>
- Siracusano, G., Pastori, C., & Lopalco, L. (2020). Humoral immune responses in COVID-19 patients: a window on the state of the art. *Frontiers in immunology*, 11, 1049. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7242756/pdf/fimmu-11-01049.pdf>
- Suimon, Y., Kase, S., Miura, I., Ishijima, K., & Ishida, S. (2020). Alteration of cell surface markers CD38 and CD138 in lymphoproliferative disorders in the ocular adnexa. *Anticancer Research*, 40(4), 2019-2023.
- Sun, B., Feng, Y., Mo, X., Zheng, P., Wang, Q., Li, P., Peng, P., Liu, X., Chen, Z., & Huang, H. (2020). Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 940-948.
- Tabata, H., Matsuoka, T., Endo, F., Nishimura, Y., & Matsushita, S. (2000). Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 34998-35005.
- Tan, W., Lu, Y., Zhang, J., Wang, J., Dan, Y., Tan, Z., He, X., Qian, C., Sun, Q., & Hu, Q. (2020). Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *MedRxiv*, 2020.2003.2024.20042382.
- Team, E. (2020). The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19)—China, 2020. *China CDC weekly*, 2(8), 113.

- Thomas, S. Y., Hou, R., Boyson, J. E., Means, T. K., Hess, C., Olson, D. P., Strominger, J. L., Brenner, M. B., Gumperz, J. E., & Wilson, S. B. (2003). CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *The Journal of Immunology*, *171*(5), 2571-2580.
- Thompson, J. S., Schneider, P., Kalled, S. L., Wang, L., Lefevre, E. A., Cachero, T. G., MacKay, F., Bixler, S. A., Zafari, M., & Liu, Z.-Y. (2000). BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *The Journal of experimental medicine*, *192*(1), 129-136.
- Tian, X., Goemaere, N. N., van der Meeren, L., Yang, J., Kapsenberg, J. M., Lashley, L. E., Eikmans, M., & van der Hoorn, M.-L. P. (2023). Inflammatory placental lesions are specifically observed in healthy oocyte donation pregnancies with extreme fetal-maternal incompatibility. *Placenta*.
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., & Lenz, H. J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, *63*, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>
- Trentin, L., Agostini, C., Facco, M., Piazza, F., Perin, A., Siviero, M., Gurrieri, C., Galvan, S., Adami, F., & Zambello, R. (1999). The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *The Journal of clinical investigation*, *104*(1), 115-121.
- Vera Carrasco, O. (2021). Síndrome de distrés respiratorio agudo y COVID-19. *Revista Médica La Paz*, *27*(1), 60-69.
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veerler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *cell*, *181*(2), 281-292. e286. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102599/pdf/main.pdf>
- Yu, X., Chen, Y., Cui, L., Yang, K., Wang, X., Lei, L., Zhang, Y., Kong, X., Lao, W., Li, Z., Liu, Y., Li, Y., Bi, C., Wu, C., & Zhai, A. (2022). CXCL8, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 as biomarkers of liver injury caused by chronic hepatitis B. *Front Microbiol*, *13*, 1052917. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1052917>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, *45*(2), 27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785020/pdf/nihms151009.pdf>
- Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., & Li, J. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clinical infectious diseases*, *71*(16), 2027-2034. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7184337/pdf/ciaa344.pdf>

Zhong, H., Xu, L. L., Bai, M. X., & Su, Y. (2021). [Effect of chemokines CXCL9 and CXCL10 on bone erosion in patients with rheumatoid arthritis]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 53(6), 1026-1031.
<https://doi.org/10.19723/j.issn.1671-167X.2021.06.003>

ANEXOS

1. Sobre el consentimiento informado entregado a cada paciente

Este documento se deberá ajustar a lo indicado por los artículos 8°, 10°, 14° y 15° de la Ley N°20.584 con sus exigencias y excepciones y el derecho de las personas a decidir informadamente.



Universidad de Concepción

Concepción, Noviembre de 2017.

CERTIFICADO

El Comité de Ética de la Universidad de Concepción ha revisado el **PROYECTO PAI N° 79170073** adjudicado en el **CONCURSO NACIONAL INSERCIÓN DE CAPITAL HUMANO AVANZADO EN LA ACADEMIA CONVOCATORIA AÑO 2017 - PROGRAMA DE ATRACCIÓN E INSERCIÓN - CONICYT**, titulado **"FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y LA DOCENCIA EN ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES EN INMUNOLOGÍA CLÍNICA"**, postulado por la Universidad de Concepción, teniendo a la **DRA. ESTEFANÍA NOVA LAMPERTI**, Doctora a insertar, como Investigadora Responsable, patrocinada por el **DR. CLAUDIO AGUAYO TAPIA**, Docente del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia, y ha comprobado que cumple con las normas y procedimientos éticos, bioéticos y de bioseguridad establecidos nacional e internacionalmente para estudios que involucran personas y manipulación de material biológico.

El presente proyecto de Inserción en la Academia, tiene como objetivo fortalecer la Docencia y el área de investigación en inmunología celular y molecular en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, teniendo como principal línea de investigación, el estudio de los mecanismos inmunológicos relacionados al uso de la Vitamina D en la respuesta anti-inflamatoria de linfocitos T CD4+ en un contexto fisiológico y fisiopatológico dirigido a entender respuestas inmunes exacerbadas en pacientes con psoriasis. Los objetivos específicos de desarrollo de la propuesta, en su ámbito científico, proponen ejecutar esta inserción profundizando en el estudio de la respuesta inmunológica mediada por la Vitamina D con énfasis en enfermedades autoinmunes-cutáneas como la psoriasis. Asimismo, propone incorporar masa crítica competente en el área de Inmunología Celular y Molecular con el fin de apoyar el desarrollo de proyectos de investigación y programas de Postgrado así como, fomentar y consolidar el grupo de investigación multidisciplinario que incorpora investigadores de ciencias básica y clínica en el área de la Inmunología.





Universidad de Concepción

Para desarrollar el estudio, prevé el reclutamiento de pacientes diagnosticados con psoriasis que se atienden en el Hospital Guillermo Grant Benavente, y de individuos sanos, considerando a los inscritos en el Programa de Examen de Medicina Preventiva del Adulto (EMPA) del Servicio de Salud de Concepción, en CESFAM de Concepción. Posterior a ello, se procederá con la intervención, que consiste en tomar muestras de sangre por punción venosa en tubos con (50mL) o sin EDTA (10mL) en el Laboratorio Clínico del Hospital o en el Laboratorio Clínico del CESFAM. de Concepción. Éstas serán transportadas al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, todo según normas de Bioseguridad y Protocolos de transporte de muestras biológicas que rigen en la Universidad de Concepción por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL). Todo está rigurosa y detalladamente descrito en "Métodos y tecnologías a utilizar".

Durante los 03 (tres) años de ejecución de este proyecto de Inserción, se espera contar con al menos 60 pacientes, individuos mayores de 18 años de edad, sin otras patologías diagnosticadas (de un universo potencial de 130 pacientes diagnosticados con la enfermedad, psoriasis) considerando una deserción del 25%, para finalmente tener una muestra efectiva de 45 pacientes y 45 individuos sanos para esta investigación, con un error máximo del 5% y un 95% de confianza.

Todos los procedimientos para la manipulación de productos biológicos y químicos, así como los procedimientos que requieren manipulación de materiales riesgosos dentro de nuestra Institución como Unidad ejecutora, serán realizados bajo condiciones de bioseguridad que están garantizadas por la supervisada y rigurosa aplicación de los protocolos de trabajo estandarizados y de uso rutinario en los laboratorios del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, que cuenta con personal debidamente capacitado y la infraestructura necesaria para cada tipo de actividad contemplada en este estudio.

Los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto serán retirados y dispuestos por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL) de la Universidad de Concepción, todo de acuerdo a las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT de 2008 y las propias emanadas por la Unidad ejecutora.

La ejecución de esta propuesta de investigación asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los sujetos participantes en la investigación, garantizando la libertad, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, conforme modelo de documento escrito de Consentimiento Informado, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Considerando que el proyecto **PAI N° 79170073** observa los derechos asegurados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos, los derechos y principios de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, las Normas Éticas de la Organización Panamericana de la Salud para Investigaciones con Sujetos





Universidad de Concepción

Humanos, la Constitución de la República de Chile, la Ley N° 20.120 “Sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma y prohíbe la clonación humana”, la Ley N° 20.584 que “Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud”, la Ley N° 19.628 “SOBRE PROTECCION DE LA VIDA PRIVADA”, así como también sigue las Sugerencias para Escribir un Consentimiento Informado en Estudios con Personas, del Comité Asesor de Bioética FONDECYT/CONICYT, y por lo tanto cumple con las normativas nacionales e internacionales vigentes y con los principios éticos que deben imperar en la investigación que involucra seres humanos, no presentando elementos que puedan transgredir las normas éticas y los principios bioéticos rectores en nuestra Institución Universitaria y las adoptadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.


DR. JOSÉ BECERRA ALLENDE
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



2. Sobre la correcta eliminación de los residuos generados

Los desechos biológicos y químicos generados en este estudio fueron correctamente eliminados según lo estipulado por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Universidad de Concepción en su instructivo: “Clasificación y Manejo de Residuos Peligrosos”.

Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que NO están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que NO han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como “Cortopunzante inerte”, hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.