



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Respuesta inmunitaria frente a SARS CoV-2 tras  
infección natural y tras vacunación**

**Immune response to SARS CoV-2 after natural  
infection and after vaccination**

**Autora:** Cristina Alonso Fernández-Martos

**Directora:** Marcos López Hoyos

**Codirector:** Juan Irure Ventura

**Santander, junio de 2022**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. ESTRUCTURA DEL SARS-COV2 .....	3
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA COVID19 .....	5
1.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A SARS-COV2 .....	6
1.3.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA FRENTE A SARS-COV2 .....	6
1.3.2. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA FRENTE AL SARS-COV2 .....	6
1.3.3. INMUNIDAD ENTRENADA FRENTE AL SARS-COV2 .....	7
1.3.4. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE AL SARS-COV2 .....	8
1.4. DIFERENCIAS ENTRE ENFERMEDAD COVID19 LEVE Y GRAVE. FACTORES PREDISPONENTES A ENFERMEDAD GRAVE .....	8
1.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ACTUALES FRENTE A LA COVID19 .....	10
1.5.1. INMUNIDAD DE GRUPO EN COVID19: VENTAJAS DE LA VACUNACIÓN EN LA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN .....	11
1.5.2. VACUNACIÓN FRENTE A SARS-COV2 .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	13
3.1 COHORTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO .....	13
3.1.1 PACIENTES HOSPITALIZADOS COVID-19 .....	13
3.1.2 PROFESIONALES SANITARIOS VACUNADOS .....	13
3.2 ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES POBLACIONES LINFOCITARIAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19 .....	13
3.3 ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B Y T MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN AMBAS COHORTES .....	14
3.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES TIPO TOLL (TLR) EN PBMCs EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19 .....	15
3.5 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR ESPECÍFICA FRENTE A SARS-CoV-2 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN AMBAS COHORTES .....	15
3.6 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL MEDIANTE ELISA EN LA COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS .....	17
3.7 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 CIRCULANTE MEDIANTE ELISA EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19 .....	17
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	17
<b>4. RESULTADOS</b> .....	18

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS .....	18
4.1.1 COHORTE DE PACIENTES COVID-19 .....	18
4.1.2 COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS.....	19
4.2 ESTADO DEL SISTEMA INMUNITARIO DE LOS PACIENTES COVID-19 AL INGRESO .....	20
4.2.1 EVALUACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO INNATO .....	20
4.2.2 EVALUACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO ADAPTATIVO .....	21
4.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA EN LA COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS.....	24
4.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR ESPECÍFICA FRENTE A SARS-CoV- 2 EN AMBAS COHORTES.....	25
4.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A SARS-CoV-2 EN LA COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS .....	26
4.6 DESARROLLO DE UN MODELO PREDICTIVO DE GRAVEDAD EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19 .....	27
4.6.1. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE COMORBILIDADES AL INGRESO EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19 .....	28
4.6.2. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE ANTECEDENTES PERSONALES .....	28
4.6.3. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE TIPO DE TRATAMIENTO.....	29
4.6.4. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE SOBREENFECCIONES .....	29
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>36</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

En base a dos cohortes estudiadas en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, se ha realizado un análisis comparativo de los diferentes elementos de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adquirida, que se desencadenan frente a SARS-CoV-2 tras la infección natural y tras la vacunación. Para ello, se han analizado, por un lado, las principales características epidemiológicas, parámetros inmunológicos y evolución intrahospitalaria de 155 pacientes COVID-19 positivos, los cuales fueron divididos en dos grupos (leves y moderados-graves) en función de sus requerimientos de oxigenoterapia al ingreso y, por otro, se ha estudiado la respuesta inmunitaria inducida tras la vacunación con doble pauta de la vacuna BNT162b2 Pfizer-BioNTech en 52 profesionales sanitarios.

Se ha observado que los pacientes clasificados como moderados-graves eran de mayor edad y presentaban niveles de ferritina, dímero D, proteína C reactiva, troponina, IL-6, neutrófilos y linfocitos T CD8 exhaustos significativamente superiores, así como linfopenia y niveles disminuidos de linfocitos Th1 y células Treg en comparación con los pacientes con enfermedad leve, los cuales presentaban asimismo, niveles significativamente superiores de monocitos no clásicos, células linfoides innatas y células NK en sangre periférica. Además, aquellos clasificados como moderados-graves precisaban una mayor cantidad de tratamientos crónicos al ingreso y recibieron con mayor frecuencia tratamientos intrahospitalarios.

Por otro lado, en el grupo de sanitarios vacunados, se ha observado que tras la administración de la segunda dosis de la vacuna se produce un aumento de los linfocitos Th1 helper de memoria, células de memoria T helper foliculares periféricas y linfocitos B memoria con cambio de isotipo, evidenciándose además una activación del sistema inmunitario mediante una respuesta T específica anti-S.

**Palabras clave:** SARS-CoV2, respuesta inmunitaria innata, respuesta inmunitaria adquirida, COVID-19, BNT162b

## ABSTRACT

This dissertation is based on the comparative analysis of the different elements of the immune response (both innate and adaptative), triggered against SARS-CoV-2 after natural infection and after vaccination. Such analysis is based on two cohorts studied at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. To this end, the main epidemiological characteristics, immunological parameters and in-hospital evolution of 155 COVID-19 positive patients were first analysed. The patients were divided into two groups (mild and moderate-severe), according to their oxygen therapy requirements at admission. Moreover, the immune response of 52 healthcare professionals after being vaccinated with a double dose of the BNT162b2 Pfizer-BioNTech vaccine was also analysed.

On the one hand, it was observed that patients classified as moderate-severe were noted to be older and had significantly higher levels of ferritin, D-dimer, C-reactive protein, troponin, IL-6, neutrophils and depleted CD8 T lymphocytes, as well as lymphopenia and reduced levels of Th1 lymphocytes and Treg cells. Conversely, patients classified in the mild group had significantly higher levels of non-classical monocytes, innate lymphoid cells and NK cells in peripheral blood. Furthermore, those classified as moderate-severe required more chronic treatment on admission and were more often treated in-hospital.

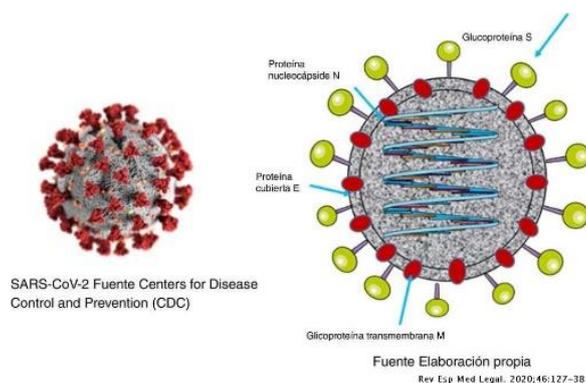
On the other hand, regarding the vaccinated group of healthcare workers, an increase in memory Th1 helper lymphocytes, peripheral follicular T helper memory cells and memory B lymphocytes with isotype change was observed after the administration of the second dose of the vaccine. There was also evidence of an activation of the immune system by means of a specific anti-S T response.

**Keywords:** SARS-CoV2, innate immune response, adaptative immune response, COVID-19, BNT162b2.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ESTRUCTURA DEL SARS-COV2

El SARS-CoV2 es un virus perteneciente a la familia *Coronaviridae*. Concretamente, se trata de un virus **RNA** de cadena única cuyo genoma codifica **cuatro proteínas estructurales**; la glucoproteína de superficie S, el antígeno de la nucleocápside N, la proteína E y la glicoproteína de transmembrana M además de 25 proteínas accesorias (NSP o *non-structural proteins*).

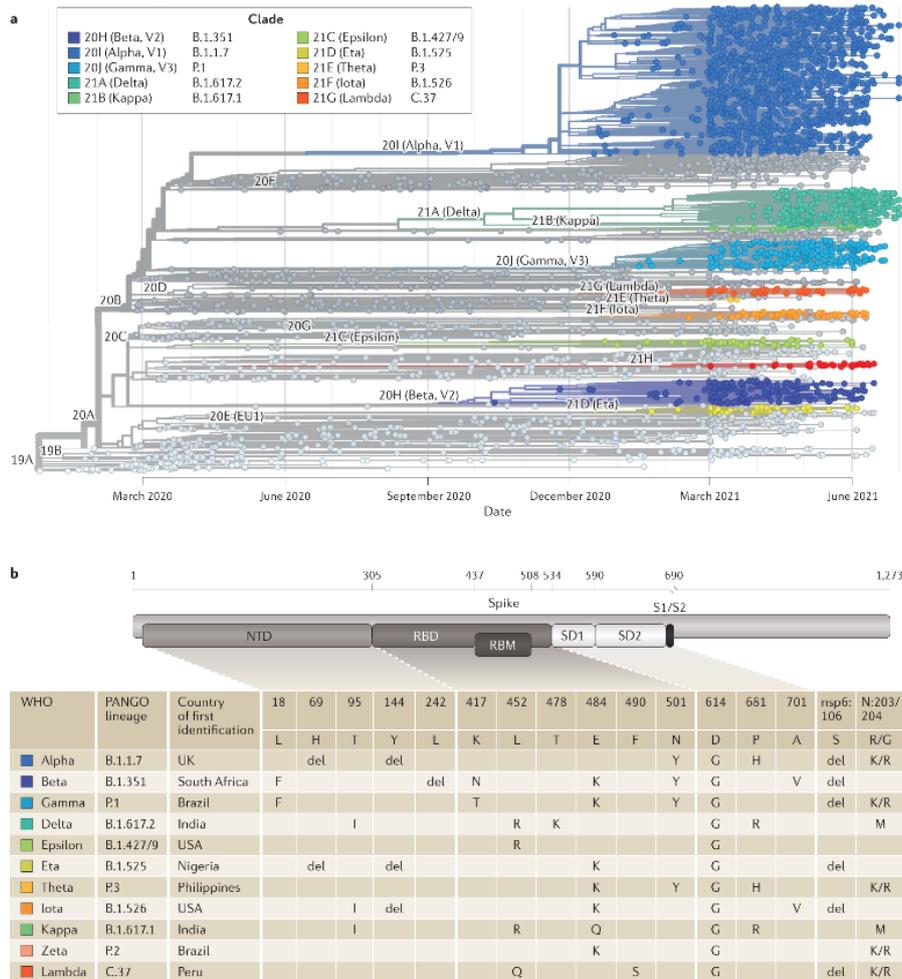


*Figura 1. Estructura molecular del SARS-CoV2 (1)*

La **proteína S** juega un papel fundamental en la adhesión a las células y la entrada a las mismas. Dicha proteína consta de un dominio de unión al receptor (RBD) el cual varía entre diferentes coronavirus y determina el tropismo tisular de cada uno. Concretamente, el del SARS-CoV2 a través del dominio RBD es capaz de unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina o ECAII expresada en multitud de células y tejidos del organismo humano. La **proteína N** es esencial para la replicación viral y para el empaquetamiento de los nuevos viriones sintetizados a partir de la maquinaria replicativa de la célula hospedadora. Así, **la respuesta inmunitaria se dirigirá principalmente frente a estas dos proteínas (2).**

El **principal mecanismo que han desarrollado las nuevas variantes para escapar a la respuesta inmunitaria** del hospedador, fundamentalmente inducido tras la vacunación frente a determinantes de la proteína S, es el **cambio de aminoácidos en el dominio RBD de la proteína S**, que han mejorado la capacidad de adhesión y que les permite escapar de los anticuerpos dirigidos hacia ellos, siendo el aminoácido **E484** la posición cuyos cambios producen más cambios de este tipo. Esto podría ser debido a que esta localización es una diana frecuente de los anticuerpos humanos. Otro cambio que se ha observado es el cambio del aminoácido N501Y en las variantes B.1.1.7 que permite no evadir la respuesta inmunitaria sino mejorar su adherencia al receptor de la ECAII (2). De esta forma, las variantes virales que contienen mutaciones en los dominios RBD que sirven como epítopos para los anticuerpos, ya sean generados a partir de infección natural o tras vacunación, pueden conseguir una evasión parcial o total de la respuesta inmunitaria.

La Figura 2 recoge las **mutaciones** presentes en diversas variantes de interés (VOIs) y variantes preocupantes (VOCs) siendo las primeras; kappa, épsilon, eta, theta, Iota y lambda y las segundas; alfa, beta, gamma y delta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera una VOC cuando porta una serie de mutaciones que aumenta la transmisibilidad, induce una enfermedad más grave, reduce significativamente la neutralización por anticuerpos generados durante infección natural o vacunas previas, con una eficacia reducida de tratamientos o vacunas, o fallos en la detección de laboratorio.



**Figura 2.** En la figura superior se muestra un árbol filogenético basado en secuencias observadas en el mundo en el que se puede observar que tanto las VOCs como las VOIs se desarrollaron de forma independiente desde finales del año 2020. En la inferior, se recogen las mutaciones más comunes presentes en múltiples VOCs y VOIs.(3)

En ocasiones, se ha demostrado cierta protección frente a la infección de algunos virus por los anticuerpos desarrollados por una infección previa por un virus similar al igual que ocurre con el virus de la gripe. En el caso del SARS-CoV2 parece que existe **cierta protección cruzada** acompañada de una atenuación de los síntomas por parte de anticuerpos séricos preexistentes creados frente a la proteína S de coronavirus endémicos (HCoV S), en especial en los jóvenes(4). Esto resulta esperanzador, como se verá más tarde, en cuanto a la posibilidad de obtener una protección al menos parcial frente a nuevas variantes del virus.

Se cree que el **éxito de una respuesta duradera frente al SARS-CoV2 requiere la interacción de linfocitos T y B** dentro de los centros germinales del tejido linfóide para generar células plasmáticas de vida larga así como linfocitos B que cambien de clase que puedan aumentar la respuesta tras un nuevo contacto con el virus.

Existen datos de **otras infecciones por coronavirus (SARS y MERS)** que demuestran que en la mayoría de los pacientes con enfermedad leve-moderada los títulos de anticuerpos descienden relativamente rápido, siendo indetectables a los 2 ó 3 años mientras que, aquellos con enfermedad grave, presentan una respuesta humoral más duradera. En cuanto al **SARS-CoV2**, un estudio detectó linfocitos B frente al RBD de la proteína S y frente al antígeno N en pacientes

con enfermedad leve, moderada y grave que parecían incrementar desde las primeras semanas de infección **hasta aproximadamente 150 días después del comienzo de los síntomas**. Los linfocitos productores de IgM suponían la mayor parte del total en el primer mes tras el comienzo de la sintomatología e iban decayendo posteriormente, mientras que aquellas que producían IgG predominaban en etapas más tardías. Los linfocitos específicos frente a antígenos S y N parecen estar presentes al menos hasta las 8 semanas tras el comienzo de los síntomas.

## 1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA COVID19

**Entender los mecanismos fisiopatológicos de la COVID19** es de gran importancia para el **desarrollo de estrategias personalizadas** para el manejo de los pacientes.

Se ha demostrado que la COVID19 es una **entidad nueva**, con una fisiopatología que difiere de la de la gripe, el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) por otras causas y de las infecciones por otros coronavirus. El SARS-CoV2 produce una desregulación de la respuesta del hospedador desencadenando una amplia variedad de **fenómenos trombóticos, inflamatorios y trastornos parenquimatosos**. Aunque existen similitudes entre la COVID19 y el fallo respiratorio producido por otras causas, la fisiopatología de la COVID19 se caracteriza por ser una entidad centrada en el **daño endotelial** (5). La inflamación endotelial parece ser un **factor común en las manifestaciones respiratorias y no respiratorias de la COVID19**.

- Dentro de la familia *Coronaviridae* existen, por un lado, subespecies con baja patogenicidad que infectan las vías aéreas superiores causando una enfermedad respiratoria leve-moderada y, por otro, aquellas con alta patogenicidad que se asientan en las vías aéreas inferiores causando neumonías y SDRA. El SARS-Cov2 comparte rasgos de ambos tipos de subespecies: **tras infectar el tracto respiratorio superior es capaz de diseminarse hacia el inferior**. Esta característica, junto con la **capacidad de transmisión vírica durante el periodo de incubación** le otorga una ventaja evolutiva (5).
- Parece que, frente a la típica afectación alveolar, en la COVID19 **la disrupción de la barrera endotelial y epitelial alveolar** se asocia con el desarrollo de cuadros graves y SDRA. Además, la afectación multiorgánica y el desarrollo de fenómenos trombóticos apoyan estos supuestos(5).
- La **respuesta inflamatoria es atípica**; mientras que los niveles de citoquinas proinflamatorias son significativamente más elevados que en la infección por influenza, siguen siendo considerablemente más bajas que en el SDRA producido por otras causas(5).
- Existe una asociación entre la **alta carga viral** (local y sistémica) y las características y **gravedad de la desregulación de la respuesta del hospedador** que sugiere que un control pobre por parte del sistema inmunitario es uno de los factores que contribuyen al desarrollo de un cuadro grave(5).
- Se ha observado el fracaso del soporte respiratorio simple en algunos pacientes con COVID19, lo que podría explicarse por la **vasculitis pulmonar** que parece producir este virus. Así, la mala relación ventilación-perfusión es debida a un cortocircuito derecha-izquierda consecuencia de la inflamación, la hiperperfusión pulmonar y la vasoconstricción hipóxica. Esta situación podría desencadenar un círculo vicioso entre la hipoxia, el aumento del esfuerzo respiratorio y el consumo de oxígeno. Si un paciente con un cuadro grave de COVID19 es incapaz de satisfacer su demanda de oxígeno adaptando el gasto cardiaco y contenido de oxígeno, las consecuencias son graves. Esto explicaría por qué pacientes con obesidad que tienen una capacidad pulmonar

disminuida y pacientes con comorbilidades cardiovasculares tienen mayores riesgos de pronósticos desfavorables(5).

### **1.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A SARS-COV2**

#### **1.3.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA FRENTE A SARS-COV2**

La **enfermedad** por SARS-CoV2 puede dividirse en **cinco fases** empezando por un mecanismo celular de defensa frente a la infección por parte de las células epiteliales del tracto respiratorio superior a las que se une el virus por expresar éstas el receptor de la ECAII que es reconocido por el RBD de la proteína S del virus. Este control inicial de la infección es esencial para prevenir la diseminación viral hacia el pulmón. En segundo lugar, se produce una fase de respuesta inmunitaria local atípica y heterogénea de tipo interferones (IFN) tipo 1 (alfa, beta y delta). La implicación de distintos órganos, la magnitud, la sintomatología y la duración de esta fase es variable. El papel de las células NK, mastocitos, basófilos y eosinófilos es todavía desconocido (4).

Conocer el papel y el mecanismo de actuación de la respuesta innata es fundamental para poder determinar los individuos que podrían tener un mayor riesgo de desarrollar una respuesta incompleta frente al virus (como se verá más adelante que es el caso de los individuos del sexo masculino y personas mayores); para poder desarrollar escalas de riesgo basadas en hallazgos genéticos y para poder investigar el papel de otros elementos (como la inmunosenescencia, el microbioma, las comorbilidades, etc.) que podrían predecir una insuficiente defensa de primera línea. Además, encontrar parámetros medibles en fases tempranas de la enfermedad podría ser útil para predecir el resultado final de las personas infectadas, así como conocer los mecanismos que provocan el paso de una infección local a una infección sistémica podría ayudar a desarrollar terapias antivirales (4).

#### **1.3.2. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA FRENTE AL SARS-COV2**

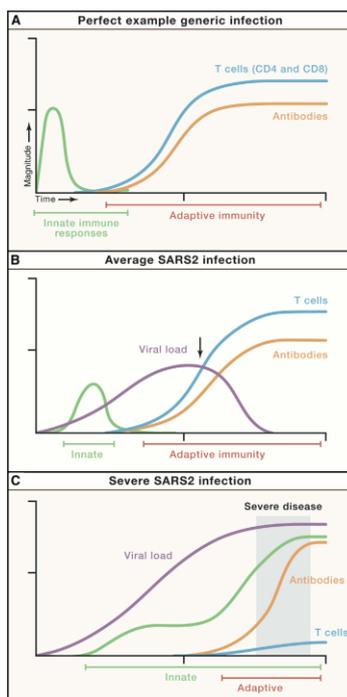
Los casos de **COVID19 graves** se han relacionado con una **incapacidad para generar respuestas de linfocitos T precoces** tras la infección natural. Es por ello por lo que la **vacunación** se plantea como una buena opción, pues ésta **sortearía el problema de velocidad de actuación de** la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por **linfocitos T** (6). La estimulación de una respuesta inmunitaria adaptativa inducida por la vacuna generaría linfocitos T que estarían ya presentes antes de la exposición al virus, dando tiempo al sistema inmunitario para responder, expandirse y madurar, siendo esto de especial importancia en ancianos como se ha comentado previamente.

**A pesar de que las vacunas disponibles parecen prevenir de la enfermedad grave, se cree que no logran impedir la infección ni la transmisión.** Es posible que la infección natural por el SARS-CoV2 logre una mayor protección en el tracto respiratorio superior que aquella lograda con cualquiera de las vacunas actuales, pues la infección ocurre primariamente en esta localización que es más propensa a conseguir memoria de tejido (6).

Sin embargo, a pesar de que la **vacuna ideal** para el COVID19 sería aquella que consiguiera obtener títulos elevados de inmunoglobulinas duraderos y que proporcionara inmunidad para prevenir la infección, así como la transmisión (anticuerpos neutralizantes), una vacuna que genere títulos de anticuerpos suficientes como para disminuir el tamaño del inóculo viral podría favorecer que los linfocitos T controlen la infección (6).

En los estudios de fase uno la vacuna de Pfizer-BioNTech (BNT162b2) consiguió niveles de anticuerpos superiores a los obtenidos en la infección natural a corto plazo en todos los grupos de edad. Además, se observó una respuesta por parte de linfocitos T CD4+, principalmente Th1, y T CD8+. Se ha demostrado un 95% de eficacia en la prevención de enfermedad grave. Con la vacuna Moderna esta cifra ha sido de 94% aunque, 90 días después de la segunda dosis, se han visto anticuerpos IgG contra RBD de la proteína S elevados(6).

Cabe destacar que hay estudios que demuestran que la **medición de la respuesta inmunitaria adaptativa en sangre periférica** parece ser un reflejo **aceptable** de aquella del pulmón y vías aéreas superiores en el contexto de infección por SARS-CoV2(6).



*Figura 3. Figura comparativa de las diferencias inmunológicas en una infección viral general (A), una infección por SARS-CoV2 leve (B) e infección por SARS-CoV2 grave (sombreado en gris el periodo de COVID19 grave)(6)*

### 1.3.3. INMUNIDAD ENTRENADA FRENTE AL SARS-COV2

Al igual que la inducción de la **inmunidad entrenada** mediante la vacunación con BCG y el empleo de  $\beta$ -glucano se ha demostrado útil en la generación de una protección heteróloga frente a otros patógenos, en el caso de la COVID19 parece haberse observado que ésta podría ser de utilidad, es especial en grupos de alto riesgo, para prevenir un resultado desfavorable de la enfermedad mediante la **reprogramación de células de la respuesta innata** para que sean capaces de reaccionar en etapas precoces de la infección frenando de esta manera la progresión hacia una sepsis. Este es uno de los mecanismos propuestos también en la mejor respuesta de los niños frente a la infección por SARS-CoV-2. Las infecciones por otros microorganismos durante la infancia inducirían esta inmunidad entrenada. El concepto de inmunidad entrenada se base en los cambios epigenéticos que se inducen en las células de la respuesta inmunitaria innata y que la harían estar entrenada para encuentros posteriores con el SARS-CoV2. Sin embargo, es importante estudiar si la inducción de inmunidad entrenada podría tener efectos deletéreos por estimular en exceso la cascada proinflamatoria mediada por citoquinas.

### 1.3.4. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE AL SARS-COV2

En la infección por SARS-CoV2 es posible **detectar la respuesta de los linfocitos T previa a la aparición de inmunoglobulinas**. Numerosos estudios sugieren que la **respuesta precoz de los linfocitos T productores de INF $\gamma$** , tanto tras infección natural como tras la vacunación, podrían tener un **papel importante en la protección y recuperación de la infección** por SARS-CoV2. Así, la vacunación ha conseguido altas respuestas de linfocitos T que se han asociado a una menor progresión y mejores resultados, aunque queda por demostrar la duración de dichas respuestas (7).

Por otro lado, existe una **utilidad potencial de cuantificar la respuesta** de los linfocitos T tanto en la inmunidad adquirida de forma natural tras la infección como a aquella que sigue la vacunación. En el primer caso, se podría obtener información sobre los posibles **resultados** de la infección; en el segundo, podría ser de ayuda para **programar las pautas vacunales** y medir la capacidad de la vacuna para reconocer y proteger frente a las **nuevas variantes emergentes** (7).

Existen, en el momento actual, numerosas pruebas como la **detección de citoquinas mediante citometría de flujo, IGRAS** (que es capaz de distinguir entre individuos no infectados y aquellos convalecientes) y la **inducción de activación de marcadores** que son capaces de medir dichas respuestas de linfocitos T. Esto, podría ser de gran utilidad para **monitorizar la respuesta** inmunitaria tras infección natural o vacunación e incluso hacer un **seguimiento tras un tratamiento** potencial. Sin embargo, han de tenerse en cuenta circunstancias como comorbilidades que afecten a la capacidad de medir dicha respuesta inmunitaria o inmunosupresión(7).

Para poder detectar potenciales infecciones que escapen de la protección de las vacunas que están basadas en la introducción de RNAm que codifica para la proteína S, podría emplearse la cuantificación de la respuesta de linfocitos T frente a antígenos basados en epítopos distintos de dicha glucoproteína de superficie para la cuantificación de la respuesta inmunitaria, pese a haberse demostrado que ésta es la más inmunógena (7).

Se cree que el **éxito de las vacunas** está en su capacidad para conseguir una **combinación de una respuesta humoral y celular precoz**. Los niveles de linfocitos T tras la vacunación parecen ser máximos a los 14 días, pudiendo ser detectados a títulos significativos a partir de los 7 primeros, periodo en el cual todavía no es posible observar la presencia de anticuerpos a títulos elevados. Teniendo en cuenta el papel que parecen tener dichos linfocitos T en el control de la diseminación de la infección (aplicable también a la infección natural) podría explicarse el papel clave que juega la vacunación en la contención de la misma. Sin embargo, todavía no hay datos suficientes que estimen la duración de dicho estado de protección(7).

### 1.4. DIFERENCIAS ENTRE ENFERMEDAD COVID19 LEVE Y GRAVE. FACTORES PREDISONENTES A ENFERMEDAD GRAVE

Una de las cuestiones que más urgen es la identificación de factores que podrían influenciar el pronóstico de la infección por este virus. Además de los **factores virales**, como el **tamaño del inóculo** o las **mutaciones virales**, determinadas características del hospedador como las **comorbilidades**, el **sexo**, la **edad**, el **estado del sistema inmunitario** de cada individuo, así como la **inmunobiografía**, están siendo investigados por la relación que podrían tener con la gravedad de la infección(8). Se cree que la variabilidad y la evolución genéticas virales, la diferente infectividad y la comorbilidad podrían contribuir a la infectividad y la fatalidad, pero no tanto a

la heterogeneidad observada. Por otro lado, la gravedad, las tasas de infección y las consecuencias a largo plazo sí que parecen estar relacionadas con las características del hospedador(4).

Numerosos estudios han demostrado en **personas sanas de edad avanzada** y del **sexo masculino** la presencia en condiciones normales de características inmunológicas, como elevados niveles circulantes de HGF, IL8 y MCP1 y depleción de algunos subtipos de linfocitos T, también evidenciadas en pacientes con COVID grave, que podrían explicar la susceptibilidad de estos dos grupos a la infección por SARS-COV2. De esta forma, parece que la edad y el sexo masculino podrían ser factores de riesgo para padecer COVID19 severo.

La progresión del COVID19 hacia un cuadro grave está relacionada con la depleción de numerosas células inmunitarias, como los linfocitos TCD4+ y TCD8+ naive y los NK CD56<sup>high</sup>. Según un estudio publicado en Frontiers in Immunology (8) la **edad** produce un descenso natural de estas células incluso en ausencia de infección, lo que podría contribuir a la incapacidad de este grupo de pacientes para eliminar el virus del organismo, en especial debido a la menor capacidad para producir INF $\gamma$ . Los niveles de linfocitos B *naive* se han demostrado también reducidos en la edad avanzada, lo que podría influir negativamente sobre el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa adecuada mediada por anticuerpos. La edad parece no solo influir en el **número** de células sino también en sus **funciones**. Además, se han identificado factores hasta ahora no relacionados con la inmunosenescencia como la elevación de osteoprotegerina (OPG) y descenso de TRANCE que se asocian con COVID19 grave. Por otro lado, cabe destacar que se ha demostrado una respuesta más lenta por parte de los linfocitos T CD4+ en pacientes de edad avanzada tras la infección natural, lo cual supone un hallazgo importante de cara al posible desarrollo de una respuesta inmunitaria previa a la infección por parte de las vacunas como se comentará posteriormente.

Además, el cuadro grave de esta enfermedad se caracteriza por una respuesta inflamatoria exagerada evidenciada por la **elevación de las concentraciones de mediadores proinflamatorios** como los previamente mencionados (HGF, IL8, MCP1, IL18). Se ha demostrado que los **hombres y las personas de edad avanzada** parten de unas concentraciones superiores de estas moléculas proinflamatorias.

CELL TYPE	HIGH IN SEVERE COVID-19	HEALTHY COHORTS		CELL TYPE	LOW IN SEVERE COVID-19	HEALTHY COHORTS	
		INCREASES WITH AGE	HIGHER IN MALES			DECREASES WITH AGE	HIGHER IN FEMALES
Memory Tregs	✓	✓		CD56 <sup>high</sup> NK cells	✓	✓	✓
<b>PROTEIN</b>				T cells	✓	✓	✓
IL6	✓	✓		Naive CD4 T Cells	✓	✓	✓
IL8	✓	✓	✓	Naive CD8 T Cells	✓	✓	✓
IL10	✓			Tregs	✓	✓	
IL18	✓	✓	✓	Naive Tregs	✓	✓	
MCP1	✓	✓	✓	B Cells	✓	✓	
MCP2	✓			Naive B Cells	✓	✓	
CCL3	✓			<b>PROTEIN</b>			
CCL4	✓			TRANCE	✓	✓	
CCL19	✓						
CXCL10	✓						
PDL1	✓						
HGF	✓	✓	✓				
OPG	✓	✓	✓				
ENRAGE	✓		✓				

*Figura 4. Comparación entre los factores dependientes de edad y sexo en individuos sanos versus aquellos con fenotipo de COVID19 grave(8).*

Por otro lado, cabe destacar que la respuesta inmunitaria depende en gran medida de la **inmunobiografía de cada individuo**. Esta viene determinada por la dosis, la magnitud y el tipo

de antígenos a los que cada persona ha sido expuesta a lo largo de su vida, lo que podría explicar la amplia heterogeneidad de la respuesta inmunitaria en cada paciente, especialmente en personas de edad avanzada.

En cuanto a la variación estacional, solo se ha demostrado variación de la respuesta inmunitaria en función de la edad. Así, los **pacientes jóvenes**, y no los mayores, parecen **mejorar su producción de INF $\gamma$  en verano**. Sin embargo, se precisan más estudios para demostrar el verdadero impacto de la estacionalidad en la respuesta de los individuos infectados por SARS-CoV2(8).

En conclusión, **la diferencia natural en las características inmunológicas de cada persona en cuanto a su edad y sexo parecen jugar un papel importante en la predisposición para evolucionar hacia la gravedad del cuadro producido por la infección del SARS-CoV2.**

### 1.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ACTUALES FRENTE A LA COVID19

En la actualidad, existen **tres frentes** que se cree que podrían emplearse contra la COVID19: el desarrollo de terapias antirretrovirales basadas en el conocimiento del ciclo replicativo del virus; la creación de vacunas que puedan prevenir o minimizar los efectos de la infección y el bloqueo de una respuesta inflamatoria exagerada que podría frenar el daño orgánico y sistémico excesivo:

1. Los **antivirales** se dividen en dos grupos; directos (aquellos que se dirigen contra moléculas y mecanismos virales) e indirectos (aquellos dirigidos contra proteínas celulares del hospedador). Como se ha comentado, el SARS-CoV2 se dirige contra la respuesta del INF tipo I, por lo que los fármacos que contribuyan a reforzar este mecanismo de defensa podrían ser útiles para potenciar una respuesta inmunitaria temprana, en especial, en aquellos pacientes que parten con déficits en este sistema de protección. Tal y como se ha demostrado en algunos estudios publicados(9,10), errores innatos en la producción o amplificación de TLR3 y IRF7 dependientes de interferón tipo I se han relacionado con enfermedad COVID-19 grave en pacientes jóvenes. Además, la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos neutralizantes dirigidos contra el INF tipo I principalmente e INF- $\beta$  de forma secundaria, ha demostrado estar en relación con un control mucho más ineficaz de la replicación *in vitro* del SARS-CoV2 lo cual sugeriría el desarrollo de una enfermedad más grave in vivo. También se han propuesto antivirales indirectos que podrían dirigirse contra proteasas como la TMPRSS2, presente en las células epiteliales de las vías aéreas superiores, bloqueando la entrada del virus a dichas células.
2. Los estudios en fase III de las **vacunas** que emplean RNAm parecen haber demostrado que los cambios en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa de individuos mayores se asemeja a aquella de personas jóvenes, lo cual sorteas las diferencias que se observan en dichas respuestas inmunitarias debidas a la inmunosenescencia.  
Algunos ensayos dirigidos contra moléculas proinflamatorias como IL6, IL1, INF $\gamma$ , TNF, CXCL8, GM-CSF, el receptor de GM-CSF o IL37 han demostrado frenar la cascada de citoquinas que son reclutadas en los pulmones. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de los resultados observados, no puede descartarse que el empleo de anticuerpos como **tocilizumab** (contra IL6) o anikirina (contra IL1) podría ser beneficioso solo en algunos grupos con algunas características concretas. Es por ello por lo que el bloqueo simultaneo de varias citoquinas podría sortear estas limitaciones como parece haberse visto con el empleo de baricitinib (inhibidor de JAK) que ha demostrado una reducción de los niveles de IL6, IL1 $\beta$  y TNF.

### 1.5.1. INMUNIDAD DE GRUPO EN COVID19: VENTAJAS DE LA VACUNACIÓN EN LA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN

Por otro lado, se ha estudiado el efecto que tiene la progresiva inmunización de la población frente al SARS-CoV2 en cuanto a las posibilidades de sus convivientes no inmunizados de contraer la infección, así como el desarrollo de un cuadro grave y, por tanto, la posibilidad de la aparición progresiva de “inmunidad de grupo”(11).

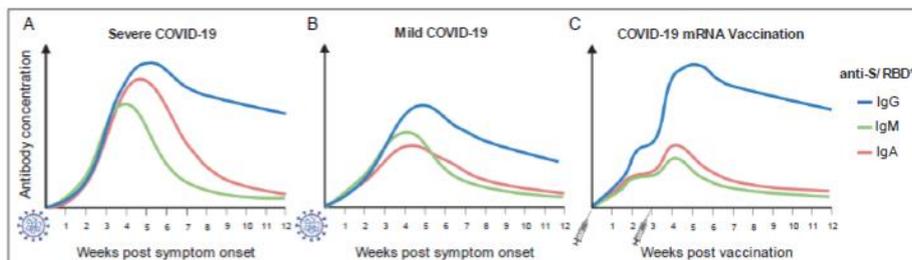
Se ha demostrado que las personas no inmunizadas tienen un riesgo de entre un 45 a un 97% menor de contraer la infección a medida que aumenta el número de personas inmunizadas en su contexto familiar(11). Este estudio ha demostrado una asociación dosis-respuesta entre el número de familiares inmunizados y el riesgo de contraer la infección en miembros de la familia no inmunizados independiente, por otro lado, del tamaño de la misma en cuanto a valores absolutos.

Estos beneficios parecen ser similares independientemente de si la inmunidad es adquirida por una infección previa, por una única dosis de vacuna o por vacunación completa(11). Estos hallazgos sugieren que la vacunación podría ser un elemento clave en la disminución de la transmisión del virus en las familias, lo cual podría tener implicaciones en el desarrollo de inmunidad de grupo y control de la pandemia.

Cabe destacar que estos hallazgos fueron, en un primer momento esperanzadores en cuanto a países subdesarrollados donde las posibilidades de vacunación con dos dosis eran menores por razones económicas. Sin embargo, por el momento solo ha podido demostrarse la similitud de resultados independientes del número de dosis en la variante alfa. Los datos posteriores sugieren que aquellas personas que han recibido una única dosis podrían tener menos protección frente a las variantes beta y delta, y sobre todo omicron, que parecen ser mucho más transmisibles(11).

### 1.5.2. VACUNACIÓN FRENTE A SARS-COV2

La infección por SARS-CoV2 desencadena una importante respuesta humoral frente a la glicoproteína de superficie S. Los pacientes con COVID19 grave desarrollan títulos significativamente superiores de anticuerpos IgM, IgG e IgA anti-S, a aquellos con enfermedad leve. Los individuos con dos dosis de vacunas RNAm que codifican para la proteína S (Pfizer-BioNTech (BNT162b2) y Moderna) desarrollan títulos de IgG comparables a los de enfermos graves, mientras que las concentraciones de IgM e IgA son inferiores. Parece que los títulos elevados de anticuerpos generados a partir de estas vacunas empiezan a decaer a partir de los 4 meses post vacunación(2).



*Figura 5. Respuesta humoral frente a SARS-CoV2 en infección por COVID19 grave (A), leve (B) y tras vacunación frente a COVID19 con vacuna basada en ARNm(2).*

Se cree que los diferentes ambientes en los que se produce la inflamación tras la infección natural, así como los distintos compartimentos anatómicos donde se inician la respuesta inmunitaria podrían explicar una respuesta humoral más reducida en el caso de la vacunación.

Por otro lado, se ha visto que individuos que ya habían sido infectados por SARS-CoV2 y recibieron una dosis de Pfizer-BioNTech (BNT162b2) consiguieron títulos de IgG similares a los de aquellos pacientes sin contacto previo con el virus que recibieron dos dosis.

Todavía no se conoce ni la duración de los títulos de anticuerpos, ni el umbral a partir del cual la inmunidad deja de ser protectora ni la gravedad de la enfermedad de aquellos individuos que, pese a haber presentado inmunidad frente al SARS-CoV2 son infectados. También es necesario seguir estudiando si habrá que hacer modificaciones en las vacunas para poder atacar epítomos de las nuevas variantes o si bastará con dosis de refuerzo con los modelos de vacuna frente al virus original.

A continuación, se presenta la [figura 7](#) en la que se recogen las principales diferencias entre las vacunas disponibles en la actualidad frente a la COVID19, aunque las disponibles actualmente en nuestro entorno son sólo las vacunas de RNAm.

Vaccine	Manufacturer	Vaccine type	Antigen	Dose	Dosage	Storage conditions	Efficacy against severe COVID-19*	Overall efficacy	Current approvals
mRNA-1273	Moderna (US)	mRNA	Full-length spike (S) protein with proline substitutions	100 µg	2 Doses 28 d apart	-25° to -15 °C; 2-8 °C for 30 d; room temperature ≤12 h	100% 14 d After second dose (95% CI, not estimable to 1.00)	92.1% 14 d After 1 dose (95% CI, 68.8%-99.1%); 94.1% 14 d after second dose (95% CI, 89.3%-96.8%)	EUA: the US, EU, Canada, and UK
BNT162b2	Pfizer-BioNTech (US)	mRNA	Full-length S protein with proline substitutions	30 µg	2 Doses 21 d apart	-80° to -60 °C; 2-8 °C for 5 d; room temperature ≤2 h	88.9% After 1 dose (95% CI, 20.1%-99.7%)	52% After 1 dose (95% CI, 29.5%-68.4%); 94.6% 7 d after second dose (95% CI, 89.9%-97.3%)	EUA: the US, EU, Canada, and UK
Ad26.CoV2.S	Janssen/Johnson & Johnson (US)	Viral vector	Recombinant, replication-incompetent human adenovirus serotype 26 vector encoding a full-length, stabilized SARS-CoV-2 S protein	5 × 10 <sup>10</sup> Viral particles	1 Dose	-20 °C; 2-8 °C for 3 mo	85% After 28 d; 100% after 49 d	72% in the US; 66% in Latin America; 57% in South Africa (at 28 d)	EUA: the US, EU, and Canada
ChAdOx1 (AZS1222)	AstraZeneca/Oxford (UK)	Viral vector	Replication-deficient chimpanzee adenoviral vector with the SARS-CoV-2 S protein	5 × 10 <sup>10</sup> Viral particles (standard dose)	2 Doses 28 d apart (intervals >12 wk studied)	2-8 °C for 6 mo	100% 21 d After first dose	64.1% After 1 dose (95% CI, 50.5%-73.9%); 70.4% 14 d after second dose (95% CI, 54.8%-80.6%)	EUA: WHO/Covax, the UK, India, and Mexico
NVX-CoV2373	Novavax, Inc (US)	Protein subunit	Recombinant full-length, prefusion S protein	5 µg of protein and 50 µg of Matrix-M adjuvant	2 Doses	2-8 °C for 6 mo	Unknown	89.3% in the UK after 2 doses (95% CI, 75.2%-95.4%); 60% in South Africa (95% CI, 19.9%-80.1%)	EUA application planned
CvnsCoV	CureVac/GlaxoSmithKline (Germany)	mRNA	Prefusion stabilized full-length S protein of the SARS-CoV-2 virus	12 µg	2 Doses 28 d apart	2-8 °C for 3 mo; room temperature for 24 h	Unknown	Phase 3 trial ongoing	
Gam-COVID-Vac (Sputnik V)	Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (Russia)	Viral vector	Full-length SARS-CoV-2 glycoprotein S carried by adenoviral vectors	10 <sup>11</sup> Viral particles per dose for each recombinant adenovirus	2 Doses (first, rAd26; second, rAd5) 21 d apart	-18 °C (Liquid form); 2-8 °C (freeze dried) for up to 6 mo	100% 21 d After first dose (95% CI, 94.4%-100%)	87.6% 14 d After first dose (95% CI, 81.1%-91.8%); 91.1% 7 d after second dose (95% CI, 83.8%-95.1%)	EUA: Russia, Belarus, Argentina, Serbia, UAE, Algeria, Palestine, and Egypt
CoronaVac	Sinovac Biotech (China)	Inactivated virus	Inactivated CNO2 strain of SARS-CoV-2 created from Vero cells	3 µg With aluminum hydroxide adjuvant	2 Doses 14 d apart	2-8 °C; Lifespan unknown	Unknown	Phase 3 data not published; reported efficacy 14 d after dose 2: 50.38% (mild) and 78% (mild to severe) in Brazil, 65% in Indonesia, and 91.25% in Turkey	EUA: China, Brazil, Columbia, Bolivia, Brazil, Chile, Uruguay, Turkey, Indonesia, and Azerbaijan
BBIBP-CorV	Sinopharm 1/2 (China)	Inactivated virus	Inactivated HB02 strain of SARS-CoV-2 created from Vero cells	4 µg With aluminum hydroxide adjuvant	2 Doses 21 d apart	2-8 °C; Lifespan unknown	Unknown	Phase 3 data not published; unpublished reports of 79% and 86% efficacy	EUA: China, UAE, Bahrain, Serbia, Peru, and Zimbabwe

Abbreviations: EUA, Emergency Use Authorization; UAE, United Arab Emirates; WHO, World Health Organization.  
\* Efficacy against severe disease, which includes COVID-19-related hospitalization, varies by age and by time after vaccination.

**Tabla 1. Principales diferencias entre las vacunas frente a SARS-CoV2 disponibles en el momento.(12)**

## 2. OBJETIVOS

Con los antecedentes disponibles al inicio del planteamiento de este trabajo, y en base a las cohortes de pacientes incluidos en los estudios objeto de análisis realizados en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (13,14), los objetivos de dichos estudios fueron:

- Análisis y cuantificación de los diferentes elementos de la respuesta inmunitaria natural frente a la infección en pacientes COVID19 positivos al ingreso.

- Estudio de la respuesta inmunitaria inducida tras la vacunación con doble pauta de la vacuna BNT162b2 Pfizer-BioNTech en profesionales sanitarios.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 COHORTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

##### 3.1.1 PACIENTES HOSPITALIZADOS COVID-19

Para la evaluación del sistema inmunitario en pacientes con diagnóstico de COVID-19, en el presente estudio se incluyeron **155 pacientes** mayores de edad ingresados en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla diagnosticados mediante RT-PCR entre abril y octubre de 2020 (14).

Los pacientes fueron clasificados en dos categorías en función de la necesidad o no de oxigenoterapia o de ingreso en cuidados intensivos, considerándose leves aquellos pacientes sin necesidad de oxigenoterapia (n=73) y moderados-graves aquellos que necesitaron oxigenoterapia, ingreso en la unidad de cuidados intensivos o que fallecieron (n=82) (14).

Se recogieron muestras de sangre al ingreso en tubos de extracción con heparina de sodio para la realización de los estudios funcionales y de citometría de flujo y en tubos sin anticoagulante para el análisis de parámetros serológicos (14).

##### 3.1.2 PROFESIONALES SANITARIOS VACUNADOS

Para el estudio de la respuesta inmunitaria que se desencadena tras la vacunación frente a SARS-CoV-2 se incluyeron **52 profesionales sanitarios** del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, sin antecedentes de infección y con resultado negativo mediante RT-PCR, que habían recibido **dos dosis de la vacuna BNT162b2 Pfizer-BioNTech** (13)

Se recogieron muestras de sangre a los 20 días tras la administración de la primera dosis de la vacuna y tras 30 días de la segunda dosis, en tubos de extracción con heparina de sodio para la realización de los estudios funcionales y de citometría de flujo y en tubos sin anticoagulante para el análisis de parámetros serológicos(13)

#### 3.2 ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES POBLACIONES LINFOCITARIAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19

La determinación de la frecuencia y del **número absoluto de células CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+/56+ y CD3+/CD16+/56+** se llevó a cabo empleando el citómetro de flujo volumétrico AQUIOS CL. (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Para ello, se utilizaron 50 microlitros de sangre, la cual fue marcada con: CD45-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD4-RD1, CD16-CD56-RD1, CD8-ECD, CD19-ECD, y CD3-ficoeritrina-cianina 5 (PC5) (Beckman Coulter). Tras la lisis, la muestra fue adquirida en el citómetro de flujo automatizado “load and go” (14).

### 3.3 ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B Y T MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN AMBAS COHORTES

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas mediante centrifugación por gradiente de Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) y se marcaron siguiendo los protocolos establecidos (13,14).

Para el estudio de las **subpoblaciones de linfocitos T** en los **pacientes COVID-19** (14) se emplearon los siguientes marcadores: anti-CD8-FITC clon B9.11 (Beckman Coulter), CD127-FITC clon R34.34, CD28-FITC clon CD28.2, CXCR3-FITC clon G025H7 (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD25-ficoeritrina (PE) clon B1.49.9 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), HLA-DR-PE clon Immu-357, CD62L-ECD clon DREG56, CD45RO-ECD clon UCHL1, CD4-ficoeritrina-cianina 5.5 (PC5.5) clon 13B8.2, CD27-ficoeritrina-cianina 7 (PC7) clon 1A4CD27, CD38-aloficocianina clon LS198-4-3, CD45RA-Alexa fluor 700 (AF700) clon 2H4LDH11 LDB9, CD3-pacific blue (PB) clon UCHT1, y CD45-Krome orange (KrO) clon J33.

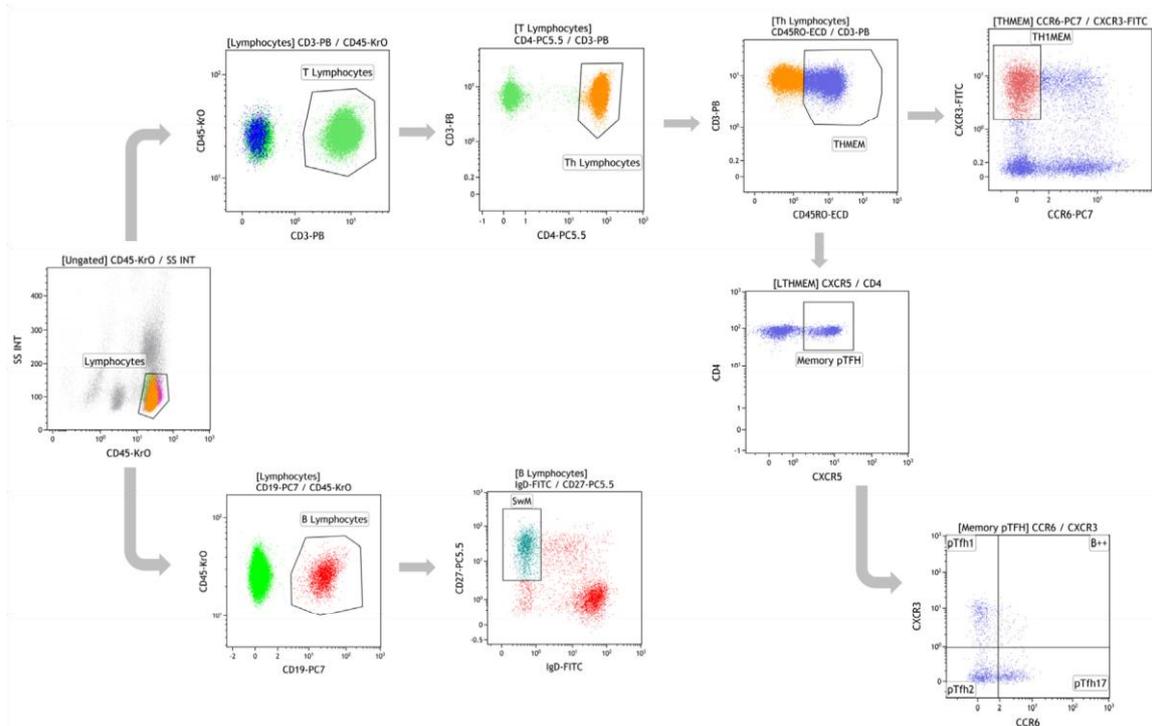
Para el estudio de las **subpoblaciones de linfocitos B** en los **pacientes COVID-19** se emplearon los siguientes marcadores: anti-IgD-FITC clon IA6-2, CD27-PC5.5 clon 1A4CD27, CD19-PC7 clon J3-119, y CD45-KrO clon J33 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) (14).

Para el estudio de las **subpoblaciones de monocitos** en los **pacientes COVID-19** se emplearon los siguientes marcadores: anti-CD14-PE clon RMO52 (Beckman Coulter), CD16-APC clon 3G8 y CD45-KrO clon J33.

Para el estudio de las **subpoblaciones de linfocitos T** en los **trabajadores sanitarios vacunados** se emplearon los siguientes marcadores: CD45-KrO clon J33, CD3-PB clon UCHT1, CD4-PC5.5 clon 13B8.2, CD45RO-ECD clon UCHL1, (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CXCR3-FITC clon G025H7, CCR6 (CD196) ficoeritrina cianina 7 (PE Cy7) clon G034E3, y CXCR5-PE clon J252D4 (BioLegend, San Diego, CA, USA)(13).

Para el estudio de las **subpoblaciones de linfocitos B** en los **trabajadores sanitarios vacunados** se emplearon los siguientes marcadores: anti-IgD-FITC clon IA6-2, CD27-PC5.5 clon 1A4CD27, CD19-PC7 clon J3-119, y CD45-KrO clon J33 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)(13).

La figura 8 muestra la estrategia de gateo empleada para la identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y B en la cohorte de trabajadores sanitarios vacunados frente a SARS-CoV-2. Los linfocitos fueron identificados teniendo en cuenta su complejidad (SSC) y mediante la expresión del marcador CD45 presente en todos los leucocitos. A continuación, se clasificó a los linfocitos B y T como CD19+ y CD3+ respectivamente. Entre los linfocitos T, los T helper (Th) se identificaron mediante la expresión de CD4. Esta subpoblación se dividió en Th de memoria (ThMEM) y T helper folicular (T<sub>FH</sub>) teniendo en cuenta la expresión CD45RO y CXCR5, respectivamente. Dentro de los ThMEM, los Th1MEM se caracterizaron por la expresión de CXCR3, y las células pT<sub>FH</sub> fueron divididas en pT<sub>FH1</sub>, pT<sub>FH2</sub> y pT<sub>FH17</sub>, en función de la expresión de CXCR5, CXCR3 y CCR6, respectivamente



*Figura 6. Estrategia de gateo de los linfocitos T y B(13)*

### 3.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES TIPO TOLL (TLR) EN PBMCS EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19

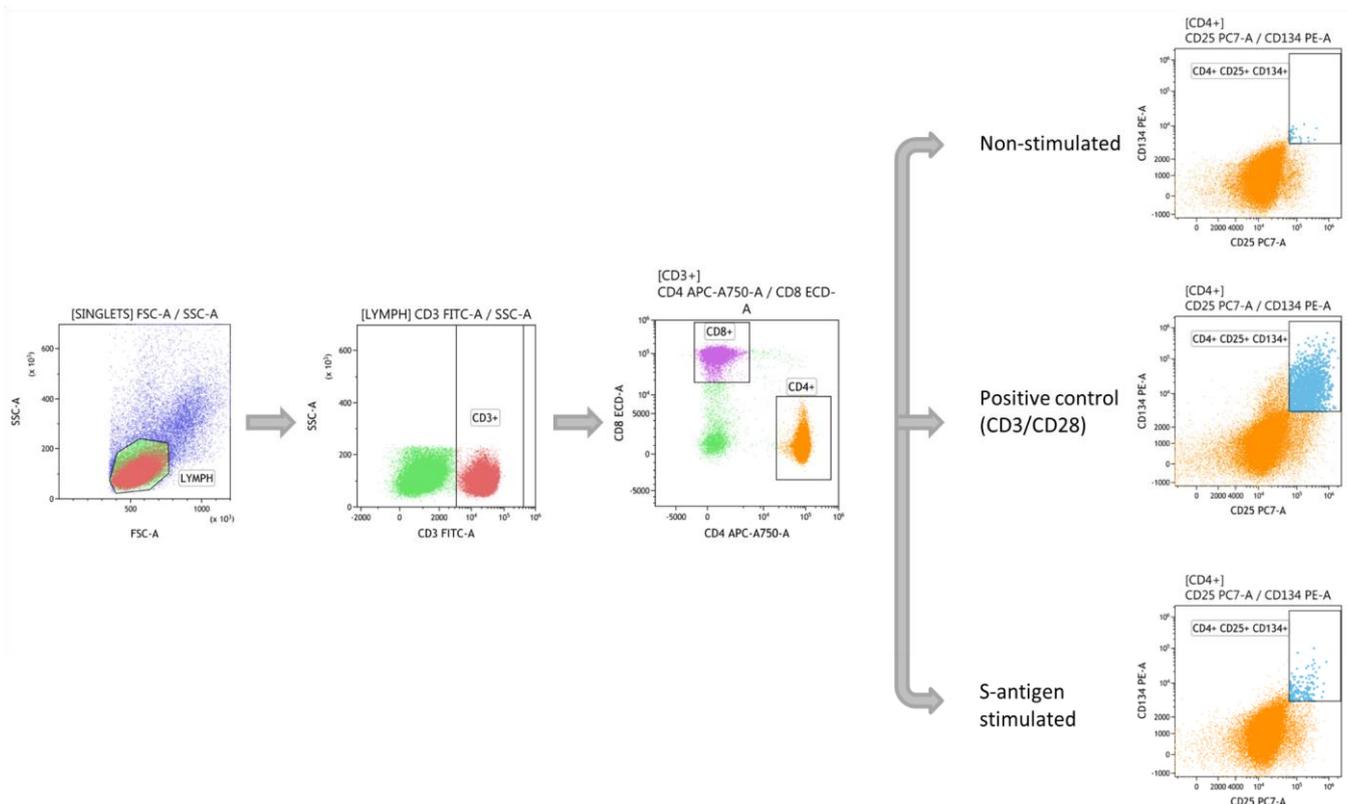
La expresión de TLR4 en la superficie celular, así como la expresión intracelular de TLR3, TLR7 y TLR8 se evaluaron en diferentes subpoblaciones de PBMC, incluyendo linfocitos T, linfocitos B y monocitos mediante citometría de flujo (15). Para ello, las PBMC se aislaron mediante centrifugación por gradiente de Ficoll Histopaque 1077 y se marcaron con CD3-PB clon UCHT1 (Beckman Coulter), CD19-PC5.5 clon J3-119 y CD14 ECD clon RMO52, con el objetivo de identificar linfocitos T, linfocitos B y monocitos. respectivamente, así como con TLR4 anti-humano conjugado con PE (eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) o con el control de isotipo IgG2a de ratón PE durante 20 min en la oscuridad. Para determinar la expresión intracelular de TLR3 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), TLR7 (Abcam, CA, EE. UU.) y TLR8, las células se permeabilizaron utilizando la solución permeabilizante FACS (BD Bioscience, San José, CA, EE. UU.) y se tiñeron con TLR anti-humano conjugado a PE o con el correspondiente control de isotipo de ratón durante 20 min en la oscuridad. Finalmente, la expresión de los diferentes TLR se evaluó mediante citometría de flujo (Navios, Beckman Coulter) (14).

### 3.5 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR ESPECÍFICA FRENTE A SARS-CoV-2 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN AMBAS COHORTES

La metodología empleada para este propósito fue validada por la Sociedad Española de Inmunología (SEI) y se basó en el estudio de la expresión de marcadores de activación celular en los linfocitos T tras la exposición a antígenos específicos de SARS-CoV-2(13,14).

Para ello, se aislaron las PBMCs mediante gradiente de Ficoll y se cultivaron a una concentración de  $10^6$  cells/mL en TexMACS medium (MiltenyiBiotec) durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  en placas de 96 pocillos con 0.1% DMSO; PepTivator SARS-CoV-2 Prot S, Prot M, y Prot N ( $1\ \mu\text{g/mL}$ ); y Dynabeads Human T activator CD3/CD28 (GibcoThermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lituania) como estímulo policlonal. Tras la incubación, las PBMCs fueron lavadas y marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD3 (FITC) clon UCHT 1 (Immunotech SAS Beckman Coulter, Marsella, Francia), anti-CD4 (APC-Vio 770) clon VIT4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Alemania), anti-CD8 (ECD) clon SFCI21Thy2D3 (Beckman Coulter, 737659, Brea, CA, USA), anti-CD134 (PE) clon 134-1 (Cytognos, Salamanca, España), y anti-CD25-PE-Cy7 clon 2A3. A continuación, las muestras marcadas con los anticuerpos fueron lavadas con  $150\ \mu\text{L}$  de PBS y centrifugadas durante 5 minutos a 1800 rpm. Finalmente, se añadieron  $2\ \mu\text{L}$  de solución de 7-Aminoactomicina D (7-AAD) (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.) y  $90\ \mu\text{L}$  de PBS, tras lo cual fueron adquiridas empleando el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter)(13,14).

La figura 7 muestra la estrategia de gateo empleada. En primer lugar, los linfocitos fueron identificados teniendo en cuenta su tamaño (FSC) y complejidad (SSC). A continuación, los linfocitos T fueron seleccionados mediante la expresión de CD3 y fueron divididos en T helper (Th) y T citotóxicos (Tc) según la expresión de CD4 y CD8, respectivamente. Finalmente, se tuvo en cuenta la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD134 en los linfocitos T CD4 para la identificación del porcentaje de células activadas.



**Figura 7. Estrategia de gateo de la respuesta específica por parte de linfocitos T frente a antígenos S del SARS-CoV2(13)**

### **3.6 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL MEDIANTE ELISA EN LA COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS**

La detección de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV2 de isotipo IgG, IgA e IgM fue llevada a cabo mediante ELISA siguiendo el protocolo publicado de IrsiCaixa (16) . Para ello, en primer lugar, las muestras de suero fueron diluidas en un tampón fosfato salino (1:100). A continuación, las placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) fueron revestidas con concentraciones de 2 µg/mL del anticuerpo de captura (MA1-21315, ThermoFisher Scientific) diluido con tampón de fosfato salino durante 18-24 horas a 4 °C. Las placas fueron lavadas y bloqueadas con tampón fosfato salino 1x + 1% de albúmina sérica bovina (BSA) durante dos horas a temperatura ambiente. Tras el lavado de las placas, se añadió la mezcla de los antígenos S2 + RBD (Sino Biologicals, Wayne, PA, USA) diluida en tampón de bloqueo a la mitad de cada placa y buffer de bloqueo a la otra mitad y fueron incubadas a 4 °C durante 18-24 horas.

Las muestras de suero fueron añadidas e incubadas durante una hora a temperatura ambiente. Después, se llevó a cabo la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos con anticuerpos anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM conjugados con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA).

Los anticuerpos unidos a los antígenos específicos fueron detectados añadiendo el correspondiente sustrato. La absorbancia fue leída a 492 nm. La señal específica asociada a cada muestra fue calculada de la siguiente manera: Densidad óptica (OD) específica = OD (+Ag) – OD (-Ag) (13).

### **3.7 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 CIRCULANTE MEDIANTE ELISA EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19**

Los niveles de IL-6 circulantes fueron determinados mediante ELISA (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. La sensibilidad de la técnica fue de 0,057 pg/mL. La variabilidad intra e inter-ensayo fueron de 4,38% y 9,6% respectivamente(14).

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los resultados fue realizado usando la versión 6.0 del software Graph Pad Prism. La distribución de las variables continuas fue evaluada mediante los test Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk y los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar o como la mediana y el rango intercuartílico (IQR) para variables continuas y en porcentajes para las variables categóricas. Se utilizó la prueba T de Student para la comparación de variables con una distribución paramétrica y las pruebas U de Mann Whitney y Kruskal Wallis para la comparación de variables con una distribución no paramétrica. Se empleó la corrección de Welch cuando fue necesario. Se consideraron resultados estadísticamente significativos aquellos con un valor  $p < 0,05$ . Con el objetivo de identificar variables asociadas con resultados clínicos graves, se empleó la regresión logística. En el análisis univariante de las potenciales variables implicadas, se calculó la Odds ratio mediante el test de Wald. En el análisis multivariante se incluyeron aquellas variables con un valor  $p < 0,25$  en el análisis univariante, siguiendo los

criterios propuestos por Hosmer y Lemeshow. Finalmente, para la selección del modelo se empleó el método de regresión paso a paso hacia atrás y para la evaluación de la capacidad predictiva del modelo, se determinó el área bajo la curva (AUC)(13,14).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

#### 4.1.1 COHORTE DE PACIENTES COVID-19

Ciento cincuenta y cinco pacientes COVID-19 positivos fueron reclutados tras su ingreso hospitalario (1 día; IQR 1-2 días). La mediana de días entre el inicio de los síntomas y la hospitalización fue de 6 días (IQR 3-9 días) (14).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a la edad media de los pacientes COVID-19 positivos, siendo ésta superior en el grupo de pacientes catalogados como moderados-graves ( $p < 0,001$ ). Asimismo, se observó un mayor número de mujeres en el grupo de pacientes leves ( $p < 0,001$ ) (14).

Teniendo en cuenta los parámetros analíticos estudiados, los niveles de proteína C reactiva (PCR), troponina, ferritina, lactato deshidrogenasa (LDH), C4 e interleucina-6 (IL-6) se encontraron estadísticamente más elevados en el grupo de pacientes moderados-graves. Por el contrario, no se observaron diferencias respecto a la concentración sérica de las inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) al ingreso entre los grupos estudiados (14).

La [Tabla 2](#) muestra los principales datos demográficos, analíticos y clínicos de la cohorte de pacientes COVID-19 en función de la gravedad.

	Leve (n=73)	Moderada-Grave (n=82)	<i>p</i>
<b>Características demográficas</b>			
Edad (años)	59 (47-77)	72 (63-79)	<0,001
Sexo (%mujeres)	43 (58,90%)	26 (31,71%)	0,001
<b>Parámetros bioquímicos</b>			
Proteína C reactiva (PCR) (mg/dL)	2,9 (0,9–6,6)	6,5 (3,0–10,7)	0,001
Ferritina (ng/mL)	203,5 (105,5–603)	535 (224–1135)	<0,001
D-dímero (ng/mL)	540 (313–992)	702 (389–1309)	NS (0,199)
Troponina (ng/mL)	5 (3–14)	11 (6–21)	0,006

<b>LDH (IU/L)</b>	227 (173–277)	274 (223–362)	<0,001
<b>Saturación de O<sub>2</sub> en la admisión (%)</b>	97 (96–98)	95 (93–97)	<0,001
<b>Recuento completo de linfocitos en sangre (%)</b>			
<b>Linfocitos (%)</b>	23,40 (16,00–32,75)	16,65 (10,80–24,90)	0,001
<b>Neutrófilos (%)</b>	64,85 (54,35–74,40)	74,00 (65,30–81,40)	<0,001
<b>Monocitos (%)</b>	8,70 (6,85–11,85)	7,05 (4,70–10,00)	0,003
<b>Recuento de linfocitos (×10<sup>3</sup>)</b>	1,20 (0,80–1,80)	0,90 (0,70–1,20)	0,001
<b>Neutrófilos (×10<sup>3</sup>)</b>	3,45 (2,30–4,90)	4,15 (2,70–5,90)	NS (0,077)
<b>Monocitos (×10<sup>3</sup>)</b>	0,53 ± 0,27	0,45 ± 0,26	0,051
<b>Factores inmunológicos séricos</b>			
<b>IgG (mg/dL)</b>	1094,91 ± 351,20	1096,39 ± 344,30	NS (0,979)
<b>IgM (mg/dL)</b>	98,18 (73,85–134,31)	82,68 (51,42–133,88)	NS (0,078)
<b>IgA (mg/dL)</b>	262,36 ± 155,21	279,47 ± 135,86	NS (0,454)
<b>C3 (mg/dL)</b>	131,50 ± 33,02	133,32 ± 30,60	NS (0,724)
<b>C4 (mg/dL)</b>	31,04 (25,26–37,02)	35,44 (27,86–40,22)	0,019
<b>IL-6 (ng/dL)</b>	26,68 (8,12–54,20)	33,88 (7,46–125,0)	0,048

*Tabla 2. Parámetros demográficos, analíticos y clínicos (14)*

#### 4.1.2 COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS

Dentro de la cohorte de trabajadores sanitarios objeto de estudio, la mediana de **edad** fue de 42.5 años (IQR 30,5-54,2 años), y 41 de los 52 profesionales (78,8%) fueron mujeres (13).

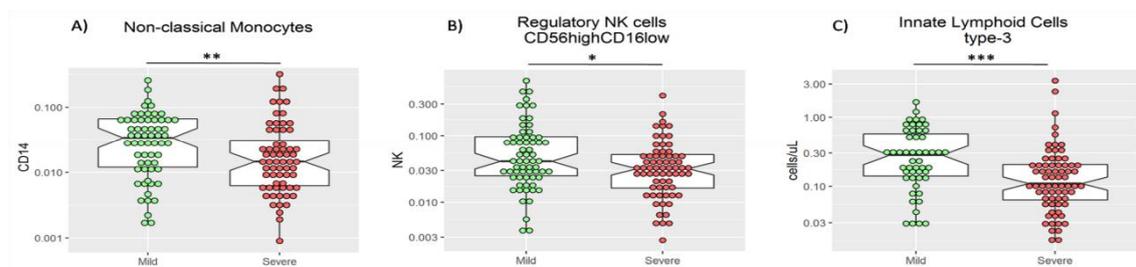
## 4.2 ESTADO DEL SISTEMA INMUNITARIO DE LOS PACIENTES COVID-19 AL INGRESO

### 4.2.1 EVALUACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO INNATO

Como en toda infección viral, el sistema inmunitario innato supone la primera línea de defensa contra el SARS-CoV-2. Por ello, se midieron sus principales componentes al ingreso en sangre periférica: neutrófilos, monocitos, células NK y células linfoides innatas (ILC) objetivándose diferencias entre los subgrupos de pacientes leves y los moderados-graves(14).

Concretamente, aquellos que tenían un fenotipo más grave, presentaron un incremento de neutrófilos y un descenso de monocitos y de linfocitos (Figura 8).

Además, se observó un incremento significativo en el porcentaje de monocitos no clásicos en el grupo de pacientes con enfermedad leve ( $p=0,01$  Figura 8, A). Asimismo, se observó un incremento significativo en la frecuencia de linfocitos NK reguladores (NK ( $CD3^-CD56^{high}CD16^{-/low}$ ) ( $p=0,016$  Figura 8, B) y en el número absoluto de ILC de tipo 3 ( $p<0,001$  Figura 8, C).



**Figura 8.** Frecuencia de monocitos no clásicos (A), células NK reguladoras (B) y recuento absoluto de células linfoides innatas tipo 3 (C) en pacientes con COVID19 leve y grave.(14)

Los receptores tipo Toll (TLR) son importantes receptores inmunitarios que participan en el reconocimiento de partículas virales y juegan un papel esencial en la inducción de la primera línea de la respuesta inmunitaria. De entre los TLR descritos en el ser humano, TLR3 y TLR7 han demostrado estar involucrados en la respuesta frente al SARS-COV2. Por ello, se determinó la expresión de TLR3, TLR7 y TLR4 (como control). Sin embargo, no se observaron diferencias en los dos subgrupos de pacientes (Tabla 3).

	Leve (n=73)	Moderada-Grave (n=82)	p
<b>Monocitos</b>			
Clásicos (% CD14+CD16-)	70,34 (55,9–79,6)	71,1 (49,5–82,2)	NS (0,896)
Intermedios (%CD14+CD16+)	27,9 (17,4–39,9)	27,0 (15,2–42,9)	NS (0,677)
No clásicos (%CD14-CD16+)	3,4 (1,2–6,6)	1,5 (0,6–3,5)	0,010
<b>Expresión de TLR</b>			

<b>TLR3</b>	1,1 (0,8–1,7)	1,1 (0,9–1,6)	NS (0,956)
<b>TLR4</b>	2,1 (1,0–3,1)	1,7 (1,1–2,6)	NS (0,593)
<b>TLR7</b>	1,4 (1,0–2,3)	1,3 (1,0–2,1)	NS (0,631)
<b>Células NK</b>			
<b>%CD16/56</b>	13,77 (10,71–23,1)	17,25 (11,7–25,9)	NS (0,097)
<b>%NKT</b>	5,05 (3,205–10,945)	4,52 (3,76–9,25)	NS (0,746)
<b># CD16/56</b>	169 (114–277)	159 (98–230)	NS (0,205)
<b># NKT</b>	59 (32,5–130)	44 (30–71)	0,019
<b>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup></b>	4,2 (2,5–9,7)	3,2 (1,6–5,1)	0,014
<b>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup></b>	95,8 (90,3–97,5)	96,8 (94,8–98,3)	0,014
<b>ILCs</b>			
<b>ILC1 (Lin-CD127<sup>+</sup>CD117-CD294<sup>-</sup>)</b>	2,33 (1,33–4,64)	1,66 (0,94–3,88)	NS (0,198)
<b>ILC2 (Lin-CD127<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup>)</b>	0,32 (0,13–0,73)	0,25 (0,11–0,44)	NS (0,497)
<b>ILC3 (Lin-CD127<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD294<sup>-</sup>)</b>	0,28 (0,14-0,60)	0,11 (0,06-0,21)	0,00028

*Tabla 3. Comparación de los parámetros de la inmunidad innata en pacientes con COVID19 leve y grave. NS= no significativo (14)*

#### 4.2.2 EVALUACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO ADAPTATIVO

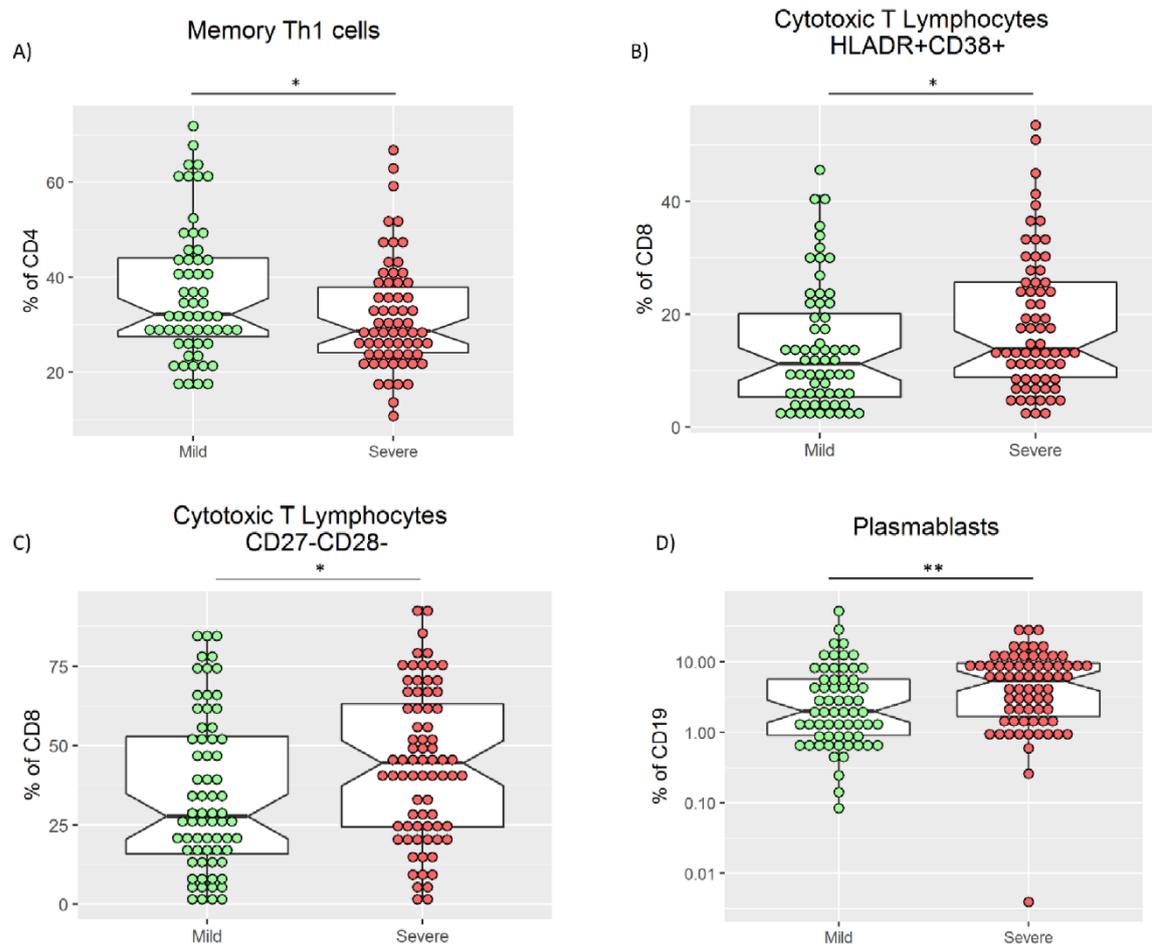
Como se ha comentado previamente, se confirmó una marcada **linfopenia** en los pacientes con COVID-19 moderado-grave. Para evitar sesgos relativos en la interpretación de los recuentos absolutos, se evaluaron los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y T. Al analizar las principales subpoblaciones de linfocitos, se observó un mayor porcentaje de **linfocitos T** en el grupo de los pacientes leves respecto al de los pacientes graves al ingreso, así como un descenso de **linfocitos B** y de las **células NK**. Sin embargo, no se observaron diferencias en los porcentajes de las **subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8**(14).

Dentro de los linfocitos T CD4, se observó un incremento de linfocitos **Th1** (CD4+CXCR3+CCR6-) y **Th1 de memoria** (CD4+CD45RO+CXCR3+CCR6-) en el grupo de pacientes leves (p = 0,057 y p = 0,030, respetivamente) (Tabla 4 y Figura 9A). Asimismo, se observó un aumento del porcentaje de **células T reguladoras** (Treg) en este grupo de pacientes respecto a los pacientes COVID-19 positivos considerados como moderados-graves (p=0,063). (Tabla 4).

Por el contrario, y de acuerdo con lo ya publicado (17), se observó un aumento de la proporción de **linfocitos T CD8+ exhaustos** CD8+CD38+HLA-DR+ (Figura 9B) y CD8+CD27-CD28- en el grupo de los pacientes graves (Tabla 4, Figura 9C). Por otro lado, la frecuencia de **linfocitos T CD8 vírgenes** (CD8+CD62L+CD45RA+ y CD8+CD27+CD28+) se vio aumentada en el grupo de

pacientes leves, así como la frecuencia de **subpoblaciones de linfocitos T CD8 efectores** (CD8+CXCR3+CCR6+) y **memoria** (CD8+CD45RO+CXCR3-CCR6+) (Tabla 4).

Además, se confirmó un aumento en la proporción de **plasmablastos** (CD19+CD20-CD27highCD38high) en el grupo de pacientes graves (Tabla 4, Figura 9D).



**Figura 9.** Frecuencia de linfocitos memoria Th1 (A), linfocitos T citotóxicos HLADR+CD38+ (B), linfocitos T citotóxicos CD27-CD28- (C), y plasmablastos (D) en pacientes leves y graves. (14)

	Leve (n=73)	Moderada-Grave (n=82)	p
<b>Subpoblaciones linfocitos T helper (CD4<sup>+</sup>)</b>			
<b>CD4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup></b>	86,7 (73,9–93,9)	87,1 (75,2–93,6)	NS (0,782)
<b>CD4<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup></b>	4,8 (3,1–8,1)	4,3 (2,5–7,2)	NS (0,695)
<b>CD4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup></b>	0,6 (0,3–1,0)	0,8 (0,3–1,2)	NS (0,724)

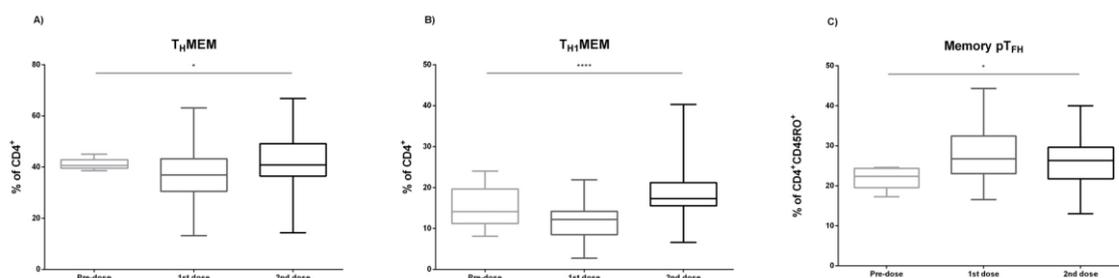
CD4 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD28 <sup>-</sup>	6,5 (1,0–16,8)	6,7 (2,0–13,6)	NS (0,927)
CD4 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup> (Th1)	23,9 (18,3–34,8)	20,1 (15,3–30,0)	0,057
CD4 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> (Th1/Th17)	12,6 (8,7–16,0)	9,6 (7,1–14,0)	0,039
CD4 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR6 <sup>+</sup> (Th17)	12,3 ± 5,0	12,4 ± 5,2	NS (0,907)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (Th de memoria)	62,8 (50,4–71,9)	58,1 (40,2–72,0)	NS (0,064)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> (Naïve)	19,7 (12,7–29,3)	18,5 (9,9–31,3)	NS (0,290)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (TCM)	46,4 ± 13,9	48,3 ± 15,8	NS (0,234)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> (TEM)	24,5 (17,8–38,5)	21,3(11,5–42,8)	NS (0,252)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> (TEMRA)	1,4 (0,5–3,8)	1,3 (0,6–3,9)	NS (0,957)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup> ( Th1 de memoria)	32,2 (26,9–44,4)	28,7 (24,0–38,0)	NS (0,030)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> (Th1/Th17 de memoria)	19,4 (16,1–25,2)	23,2 (17,5–26,0)	NS (0,137)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR6 <sup>+</sup> (Th17 de memoria)	21,1 ± 8,7	18,5 ± 7,9	NS (0,098)
CD4 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR6 <sup>-</sup> CD294 <sup>+</sup> (Th2)	1,0 (0,7–1,7)	0,8 (0,4–1,3)	NS (0,830)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> (Tfh)	0,2 (0,1–0,4)	0,3 (0,1–0,5)	NS (0,153)
CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> (Tregs)	6,4 (5,5–7,5)	5,7 (4,3–7,2)	NS (0,063)
<b>Subpoblaciones linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)</b>			
CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	57,1 (31,4–71,1)	37,6 (21,5–53,2)	0,004
CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD28 <sup>+</sup>	2,1 (1,2–3,7)	2,2 (1,1–3,7)	NS (0,580)
CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	10,2 (7,4–16,2)	12,0 (6,5–19,0)	NS (0,219)
CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD28 <sup>-</sup>	27,7 (15,8–53,1)	44,5 (24,4–63,2)	0,019
CD8 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> (Tc1/Tc17)	4,9 (3,2–9,5)	3,0 (1,8–4,6)	0,0003
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (Tc de memoria)	42,9 (34,9–57,7)	42,2 (35,2–57,6)	NS (0,749)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> (Naïve)	25,9 (14,8–40,8)	19,2 (10,3–28,8)	0,026
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (TCM)	15,0 (10,0–19,2)	14,1 (8,8–21,7)	NS (0,942)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> (TEM)	30,9 (23,9–38,7)	31,6 (22,6–44,6)	NS (0,780)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> (TEMRA)	21,0 (11,8–34,4)	26,1 (14,3–38,1)	NS (0,125)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> (Tc1/Tc17 de memoria)	2,5 (1,4–6,6)	2,8 (1,2–5,1)	0,0002

<b>CD8<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup></b>	11,2 (5,3–20,5)	13,8 (8,8–25,6)	0,028
<b>Linfocitos B</b>			
<b>Linfocitos B naïve (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>)</b>	65,3 (47,8–75,5)	63,8 (48,3–75,0)	NS (0,656)
<b>B no switched (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>)</b>	15,4 (9, -23,4)	11,5 (8,3–21,5)	NS (0,196)
<b>B switched (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>)</b>	1,9 (8,5–24,1)	17,0 (9,8–25,5)	NS (0,478)
<b>Plasmablastos (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>low</sup>CD27<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup>)</b>	1,9 (0,8–5,8)	5,3 (1,6–9,7)	0,002

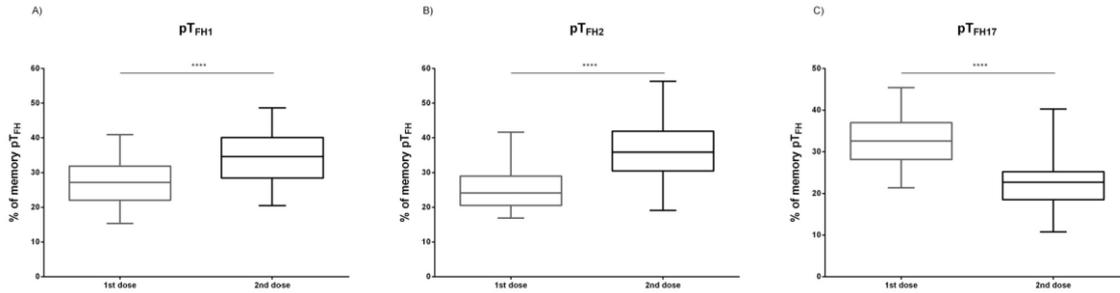
*Tabla 4. Comparación de las frecuencias de subpoblaciones de linfocitos T y B entre pacientes leves y graves. (14)*

### 4.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA EN LA COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS

En la cohorte del personal sanitario vacunado, la evaluación de los resultados de la respuesta inmunitaria post-vacunación se basó en la medición de la producción de **anticuerpos específicos** frente a SARS-CoV2. No obstante, con el objetivo de conseguir una correcta maduración de los linfocitos B en los centros germinales, es necesaria una activación previa de los linfocitos T específicos. El **número total de linfocitos Th** tras la primera y segunda dosis fue similar. Sin embargo, se observó un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de **linfocitos Th memoria** (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>) tras la segunda dosis ( $p=0,008$ ). De ellos, la mayoría eran presentaban un fenotipo **Th1** (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) y su proporción también se vio incrementada tras la administración de la segunda dosis de la vacuna ( $p<0,0001$ ). Además, también se observó un aumento significativo de los **linfocitos T helper foliculares** presentes en sangre periférica (pT<sub>FH</sub>) (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>) tras la vacunación ( $p=0,032$ ), los cuales son los que participan en los procesos de cambio de clase y maduración de la afinidad de los linfocitos B. Considerando las diferentes subpoblaciones de pT<sub>FH</sub> se detectó un incremento estadísticamente significativo de **pT<sub>FH1</sub> y pT<sub>FH2</sub>** entre la primera y segunda dosis de la vacuna ( $p<0,0001$ ). Por el contrario, se observó un descenso de la subpoblación pT<sub>FH17</sub> tras la primera dosis ( $p<0,0001$ ) (13).



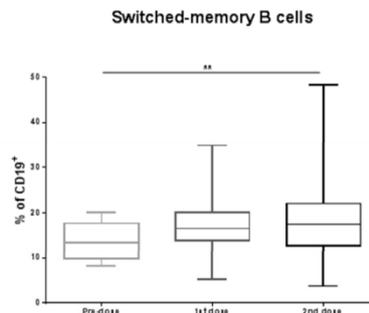
*Figura 10. Evaluación de la respuesta T específica frente a SARS-CoV2 (13)*



**Figura 11.** Evaluación de la subpoblación de linfocitos T de memoria foliculares en sangre periférica (13)

En lo que respecta a la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por linfocitos B, se evaluó, en primer lugar, el **porcentaje de linfocitos B** (CD19+) en sangre periférica, no encontrándose diferencias significativas tras la primera y segunda dosis de la vacuna (13).

A continuación, se estudió la maduración de los linfocitos B en función de la expresión de CD27 e IgD en su superficie. De este modo, se identificó un aumento de los **linfocitos B memoria con cambio de isotipo** tras la administración de la segunda dosis de la vacuna ( $p=0,0054$ ), (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>), los cuales son considerados un estadio más diferenciado de la maduración de dichos linfocitos(13).



**Figura 12.** Evaluación de la respuesta específica de linfocitos B frente a SARS-CoV2 (13)

#### 4.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR ESPECÍFICA FRENTE A SARS-CoV-2 EN AMBAS COHORTES

La respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos T fue determinada tanto en los pacientes COVID-19 positivos como en la cohorte de trabajadores sanitarios vacunados frente a SARS-CoV-2, teniendo en cuenta la expresión de marcadores de activación celular (CD25 y CD134) tras la estimulación de PBMCs durante 24 horas con diferentes antígenos virales (fosfoproteína de la nucleocápside “N”, glucoproteína de membrana “M” y glucoproteína de superficie “S”) (13,14).

En la cohorte de pacientes COVID-19 positivos(13,14), el índice de estimulación global frente a cualquiera de las glicoproteínas fue similar en ambos grupos (leve y moderado-severo).

En la cohorte de trabajadores sanitarios vacunados(13), el 56,6% de los sujetos tuvieron una respuesta específica positiva frente al pool de péptidos S tras la primera dosis y el 90% tras la

segunda dosis, siendo el índice de estimulación de 3,3 (1,99-4,41) después de la primera dosis y de 5,0 (3,89-7,22) después de la segunda dosis de la vacuna ( $p < 0,0001$ ). Se consideró un índice de 3,0 como punto de corte para considerar un resultado como positivo(18). Por otro lado, y tal y como se esperaba, no se detectaron respuestas frente a los antígenos N ni M tras ninguna de las dosis, puesto que no existían dichos antígenos en la vacuna administrada.

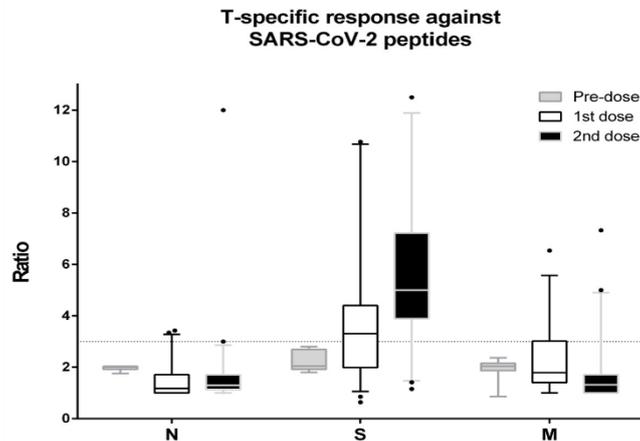


Figura 13. El ratio de células específicas CD4+CD25+CD134+ tras la estimulación con péptido N, S y M del SARS-CoV2 (13)

#### 4.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A SARS-CoV-2 EN LA COHORTE DE TRABAJADORES SANITARIOS VACUNADOS

Tras estudiar las subpoblaciones de linfocitos B, se determinó la producción de anticuerpos específicos (IgG, IgA e IgM) frente a SARS-CoV-2 tras la administración de la vacuna BNT162b2 mediante ELISA. De este modo, se detectaron anticuerpos de isotipo IgG en el 94,34% de los sujetos, IgA en el 18,67% e IgM en el 24,53% tras la primera dosis. Tras la segunda dosis, todos los voluntarios desarrollaron anticuerpos de isotipo IgG y el 41,51% desarrolló anticuerpos IgA y el 37,74% IgM(13).

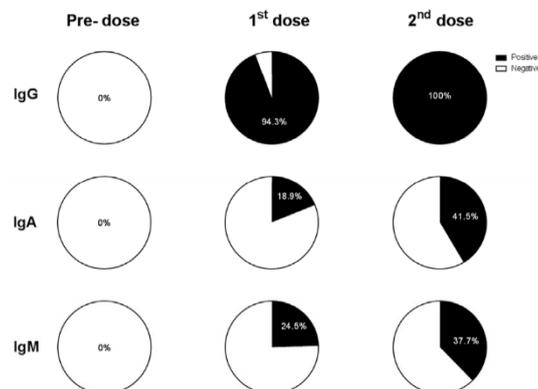


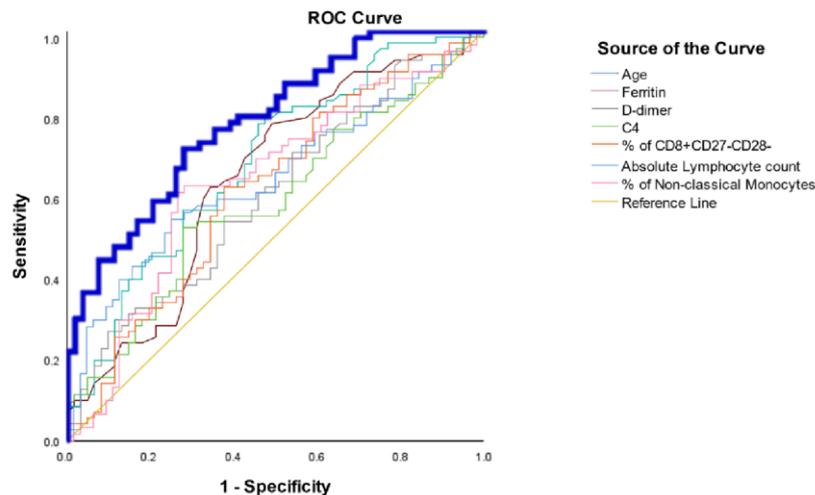
Figura 14. Frecuencia de anticuerpos específicos IgG, IgA e IgM frente a SARS-CoV-2 preinmunización, tras la primera y la segunda dosis de vacunación respectivamente (13)

#### 4.6 DESARROLLO DE UN MODELO PREDICTIVO DE GRAVEDAD EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19

Teniendo en cuenta todos los parámetros inmunológicos evaluados al ingreso en los 155 pacientes con diagnóstico de COVID-19, aquellos que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos objeto de estudio fueron seleccionados con el fin de determinar de manera independiente su papel en el pronóstico de los pacientes(14). La [Tabla 5](#) muestra los resultados del análisis univariante y multivariante. Los parámetros que finalmente fueron incluidos en el modelo predictivo fueron: edad, ferritina, dímero D, número absoluto de linfocitos, C4, porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> y porcentaje de monocitos no clásicos. El área bajo la curva (AUC) fue de 78,2% con una sensibilidad de 71,4 y una especificidad de 72,2 ([Figura 15](#)).

Parámetros	Univariante			Multivariante		
	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%
<b>Edad</b>	<0,01	1,033	1,013–1,053	0,015	1,038	1,007–1,069
<b>Ferritina</b>	<0,001	1,001	1,001–1,002	0,021	1,001	1,001–1,002
<b>D-dímero</b>	0,226	1,000	1,000–1,000	0,01	1,000	1,000–1,001
<b>Número absoluto de linfocitos</b>	0,002	0,999	0,999–1,000	0,023	0,999	0,998–1,000
<b>C4</b>	0,016	1,041	1,007–1,075	0,110	1,036	0,992–1,082
<b>% de CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup></b>	0,023	1,017	1,002–1,031	0,701	1,004	0,985–1,023
<b>% de monocitos no clásicos</b>	0,288	0,18	0,000–29,826	0,908	1,712	0,000–0,000149

*Tabla 5. Análisis univariante y multivariante de los parámetros incluidos en el modelo de regresión logística (14)*



*Figura 15. Curva ROC del modelo de regresión logística para la predicción de resultados moderados-graves en la COVID19 (14)*

#### 4.6.1. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE COMORBILIDADES AL INGRESO EN LA COHORTE DE PACIENTES COVID-19

Al ingreso, se estudió la posible influencia de comorbilidades (hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo II, patología cardíaca, patologías respiratorias y obesidad) en el resultado clínico de los pacientes de ambos grupos (leve y moderado-severo) siendo los resultados los que se muestran en la Tabla 6.

COMORBILIDADES	Leve (n=73)	Moderada-Severa (n=82)	p
Hipertensión	30 (41,10%)	43 (52,44%)	NS (0,158)
Diabetes tipo II	11 (15,07%)	17 (20,73%)	NS (0,360)
Patología cardíaca	12 (16,44%)	20 (24,39%)	NS (0,222)
Patología respiratoria	6 (8,22%)	8 (9,76%)	NS (0,739)
Obesidad	12 (16,44%)	11 (13,41%)	NS (0,597)

Tabla

*Resultados clínicos en función de las comorbilidades al ingreso (14)*

6.

#### 4.6.2. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE ANTECEDENTES PERSONALES

##### 4.6.2.1. ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Entre los antecedentes personales de los pacientes ingresados por COVID-19, se observó que el **20,65%** de ellos presentaba alguna enfermedad autoinmune. El 18,91% de ellas correspondían con diferentes formas de afectación tiroidea siendo la más frecuente el hipotiroidismo autoinmune en el 16,21% de los casos. También se observó que el 10,81% de los pacientes presentaban psoriasis, y el 5,4% de ellos fibromialgia, trombopenias autoinmunes o artritis reumatoide. Se observaron también otras enfermedades autoinmunes en menor proporción tales como esclerosis sistémica o enfermedad de Crohn. De todos ellos, el **46,86%** padecieron finalmente una enfermedad COVID-19 **moderada o grave** frente al **53,14%** que tuvieron una enfermedad **leve**.

##### 4.6.2.2. CÁNCER

De entre los pacientes COVID-19 estudiados, el **12,9%** presentaba antecedentes de algún tipo de cáncer, observándose únicamente predominio de adenocarcinoma de próstata (20%). El 60% de pacientes con antecedentes oncológicos fue englobado dentro del grupo de pacientes con enfermedad moderada-grave derivada de la infección por SARS-CoV-2 frente al 40% que tuvieron una enfermedad leve sin requerimientos de oxigenoterapia. Entre los antecedentes oncológicos observados se encontraron antecedentes de cáncer de pulmón, carcinomas otorrinolaringológicos, dermatológicos, hematológicos (linfoma B folicular), adenocarcinoma de sigma, carcinoma urotelial, y carcinoma renal.

#### 4.6.2.3. TRATAMIENTOS CRÓNICOS

El **75,48%** de los pacientes estudiados se encontraban con algún tipo de tratamiento crónico, mayoritariamente con fármacos para la insuficiencia cardiaca y la diabetes mellitus tipo II. De entre ellos, solo el 5,1% se encontraban, en el momento del ingreso, en tratamiento con corticoides. El 82,92% de pacientes en tratamiento crónico con algún tipo de fármaco desarrolló una enfermedad COVID-19 moderada-severa frente al 69,12% que desarrolló una enfermedad leve, siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,036$ ).

ANTECEDENTES PERSONALES	Total (n=155)	Leve (n=73)	Moderada-Severa (n=82)	p
Enfermedades autoinmunes	32 (20,65%)	17 (23,28%)	15 (18,29%)	NS (0,570)
Cáncer	20 (12,9%)	8 (10,95%)	12 (14,63%)	NS (0,659)
Tratamientos crónicos	117 (75,48%)	49 (67,12%)	68 (82,92%)	0,036

*Tabla 7. Resultados clínicos en función de los antecedentes personales*

#### 4.6.3. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE TIPO DE TRATAMIENTO

El **76,13%** de los pacientes ingresados recibieron algún tipo de tratamiento para la infección por SARS-CoV-2, siendo el 23,87% el porcentaje de pacientes que no precisaron ningún tipo de tratamiento por cursar de forma asintomática o por tener una infección leve. De ellos, el **64,40%** pertenece a la categoría de los enfermos **moderados-graves** ( $p<0,001$ ). Según los protocolos empleados en el momento y en función de la gravedad y la cronología de los síntomas se emplearon principalmente plasma hiperinmune, remdesivir, corticoides y tocilizumab según las indicaciones vigentes en el momento. Algunos recibieron también profilaxis antibiótica como prevención frente a la sospecha de sobreinfección bacteriana, aunque debido al tratamiento con antibiótico para otros procesos concomitantes que presentaban algunos de estos pacientes es difícil precisar la cifra.

#### 4.6.4. RESULTADOS CLÍNICOS EN FUNCIÓN DE SOBREENFECCIONES

Según los registros estudiados, en el **17,42%** de los informes de alta de los pacientes estudiados se hablaba de posibles sobreinfecciones bacterianas, aunque esta cifra es difícil de precisar pues son más los pacientes que recibieron coberturas antibióticas preventivas. Dentro de los clasificados como enfermedad por COVID-19 **moderada-grave se dieron sobreinfecciones en el 20,73%**. De entre los casos que se confirmaron, hubo sobreinfecciones por microorganismos tales como *S. pneumoniae*, *Cándida albicans*, SARM o *S. haemolyticus*, no siendo ninguno de ellos observado con mayor frecuencia que los demás.

	Total (n=155)	Leve (n=73)	Moderada-Severa (n=82)	p
<b>Tratamiento hospitalario</b>	118 (76,12%)	42 (57,53%)	76 (92,68%)	<0,001
<b>Sobreinfecciones</b>	27 (17,42%)	10 (13,69%)	17 (20,73%)	NS (0,347)

*Tabla 8. Resultados clínicos en función del tipo de tratamiento y sobreinfecciones durante el ingreso*

## 5. DISCUSIÓN

El SARS-CoV2 y la COVID-19 derivada de la infección por este virus, han sido fuente de numerosos estudios en los últimos tres años. Se ha demostrado que la COVID-19 es una **entidad nueva y desconocida** por lo que, entender la estructura viral, el proceso de infección y los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, se han considerado de gran importancia para el **desarrollo de estrategias preventivas, predictivas y curativas personalizadas para los pacientes.**

Hasta el momento, existen numerosas publicaciones (5,8,11) donde se han estudiado algunos factores que parecían influir en el pronóstico clínico de los pacientes COVID-19. Asimismo, hay trabajos en los que se describen, de forma aislada, los elementos de la respuesta inmunitaria innata o adaptativa frente al SARS-CoV-2 (2,4,6,7), así como otros que estudian el posible papel de la adquisición de inmunidad, tanto de forma natural tras la infección como tras la vacunación como estrategia de desarrollar inmunidad de grupo frente a este virus(11). Sin embargo, en el presente trabajo se han comparado **dos cohortes** estudiadas en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (13,14) con el objetivo de tratar de comparar de forma más desglosada los **elementos de la respuesta inmunitaria innata y adquirida** presentes tras la infección natural y que se desencadenan tras la vacunación. En líneas generales, se puede concluir que los hallazgos aquí obtenidos concuerdan con dichos estudios publicados previamente además de aportar datos nuevos que podrían ser de gran utilidad para futuros estudios.

Dentro de los elementos estructurales de este nuevo virus, la **proteína S** de superficie ha demostrado jugar un papel fundamental en la adhesión a las células y la entrada a las mismas (2). Es por ello por lo que la respuesta inmunitaria se dirige principalmente frente a dicha proteína, razón por la cual en ambas cohortes objeto de análisis (13,14) se estudia la respuesta inmunitaria frente a dicha proteína, tanto en la cohorte de pacientes enfermos como en la de pacientes vacunados mediante la vacuna BNT162b basada en la proteína S.

Desde el momento de la realización y publicación de los estudios llevados a cabo en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla objeto de análisis, han continuado surgiendo **nuevas variantes** virales del SARS-CoV2 a partir de cambios de aminoácidos en el dominio RBD de la proteína S (2,3). Se precisa valorar el grado de protección frente a reinfecciones o infecciones posteriores con las nuevas variantes del SARS-CoV2 aparecidas tras el estudio realizado.

Respecto a la **cohorte de los pacientes COVID-19** (14) y en la misma línea de estudios anteriores (8), la diferencia natural en las características demográficas de cada persona en cuanto a su edad y sexo han demostrado jugar un papel importante en la gravedad del cuadro producido por la infección del SARS-CoV-2, siendo las personas de **edad avanzada** y las de **sexo masculino** las que se asocian con peores resultados clínicos así como aquellas con **tratamientos crónicos** pautados para otras patologías al ingreso. De la misma manera, se han demostrado valores significativamente más **elevados** de parámetros como la **PCR, la troponina, ferritina, LDH, C4, IL-6** en pacientes con mala evolución de la enfermedad.

Sin embargo, no se ha conseguido demostrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a las comorbilidades estudiadas ni en cuanto a la presencia de enfermedades autoinmunes o procesos oncológicos al ingreso.

Del mismo modo, se ha demostrado la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes **perfiles inmunológicos al ingreso** y los **resultados clínicos de su enfermedad** COVID19. De esta manera se han observado parámetros de la inmunidad innata, como linfopenia (19), neutrofilia (20) y el incremento de subpoblaciones de monocitos (21), así como algunos de la inmunidad adaptativa, como formas activas y exhaustas de linfocitos T citotóxicos (22) o niveles elevados de plasmablastos (23), relacionados con un peor pronóstico clínico.

En la comparación de los parámetros de la respuesta inmunitaria **innata** entre los dos grupos (leve y moderado-severo) en que se ha dividido la cohorte de los pacientes COVID-19, se observó un incremento en la frecuencia de **neutrófilos y linfopenia** en el grupo más grave, lo cual podría estar relacionado con la mielopoyesis de emergencia observada en casos graves en estudios previos evidenciada mediante una desviación de neutrófilos disfuncionales (24) de emergencia. Se ha observado un aumento de los **monocitos no clásicos** en el grupo de los casos leves lo que podría estar relacionado con la eliminación viral, puesto que esta subpoblación de monocitos está relacionada con la restauración de tejidos tras la inflamación.

En cuanto al papel del total de **ILC** en la respuesta inmunitaria antiviral ya había sido descrita con anterioridad (25,26). A pesar de que recientemente se ha descrito una reducción de ILC1 en pacientes con COVID19 grave (26), no se han encontrado en el presente estudio diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por el contrario, sí se ha observado una reducción significativa de ILC3 al ingreso en aquellos pacientes con enfermedad grave. Las ILC3 juegan un papel importante en la homeostasis de la mucosa intestinal (27), aunque todavía no se había descrito su papel en la mucosa respiratoria. Los hallazgos de este estudio sean realizados a partir de sangre periférica, por lo que queda por demostrar su relación con la concentración tisular de las mismas.

Respecto a los **TLR**, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la expresión de TLR3 y TLR7, que suelen jugar un papel fundamental en las infecciones por virus RNA. Sin embargo, la mayor edad y el mayor número de comorbilidades presentes en el grupo de pacientes grave podría ser un factor confusor, pues ambos podrían reducir la expresión de dichos TLR.

En cuanto a los parámetros de la respuesta inmunitaria **adaptativa** estudiados, se ha confirmado una marcada **linfopenia** en los pacientes con COVID-19 moderado-grave (19). Analizando de forma desglosada las diferentes subpoblaciones de linfocitos se ha observado un menor porcentaje de **linfocitos T, B y células NK** en el grupo de pacientes graves a pesar de no evidenciarse diferencias entre las **subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8**.

Dentro de los linfocitos **T CD4**, se ha observado en el presente estudio un incremento de linfocitos **Th1** y **Th1 de memoria** en el grupo de pacientes leves que parece orientar hacia una activación temprana de la respuesta inmunitaria. Este hallazgo apoya estudios previos que sugerían que, uno de los factores que podría determinar un peor pronóstico clínico era la activación tardía de la respuesta inmunitaria en pacientes con inmunosenescencia (6). Este hallazgo permite apoyar la hipótesis previamente planteada de que la vacunación podría ser una estrategia útil en el desarrollo de una respuesta inmunitaria más rápida en este perfil de pacientes.

Respecto los linfocitos **T CD8**, considerados los principales responsables de la respuesta adaptativa frente a infecciones virales, cabe destacar que la activación temprana de dichos linfocitos viene marcada por la expresión de CD38 y HLA-DR. Teniendo esto en cuenta, es importante destacar que en el presente estudio y de acuerdo con publicaciones previas(28,29), se ha observado un aumento de los linfocitos **CD8+CD38+HLA-DR+** al ingreso en los pacientes graves frente a los pacientes leves, así como un aumento en el fenotipo de **linfocitos exhaustos CD8+CD27-CD28-**.

Frente a otros modelos predictivos descritos hasta el momento basados en parámetros demográficos, bioquímicos e inmunológicos (30–34), el **modelo predictivo** desarrollado a partir de este estudio incluyó la edad, IL-6, la ferritina, el dímero D, la IgM, el C4, el recuento absoluto de linfocitos, el recuento de ILC3, el porcentaje de plasmablastos, Th1, Th1 memoria, CD8+CD38+HLA-DR+, monocitos no clásicos, y CD3<sup>-</sup>CD56<sup>++</sup>CD16<sup>lo</sup> NK y el fenotipo de células CD8 exhaustas, obteniendo un área bajo la curva (AUC) del 78%. Esto podría ayudar a determinar los requerimientos de oxigenoterapia en el 78% de los pacientes, así como ayudar a mejorar el manejo terapéutico de los pacientes en su admisión. Sin embargo, la ausencia de datos de carga viral de SARS-CoV2, así como del número de ciclos (Ct) en los que la PCR resultó positiva, han sido dos factores limitantes en este estudio. El éxito de este modelo radica en la inclusión de parámetros inmunológicos de fácil medición tales como los monocitos no clásicos y los linfocitos CD8+CD38+HLA-DR+, aunque se requieren estudios adicionales para determinar la capacidad predictiva real del modelo.

Cabe destacar, en cuanto al manejo intrahospitalario de pacientes COVID-19, que no se han observado diferencias estadísticamente significativas en el número de coinfecciones víricas o bacterianas entre ambos grupos de enfermos. Sin embargo, aquellos clasificados como moderados-graves recibieron un número significativamente mayor de tratamientos durante su estancia en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Dentro de estos tratamientos administrados se encuentran, según los protocolos existentes en el momento, fármacos antivirales, corticoides y antibióticos principalmente. La situación de gravedad precisó, según los evolutivos e informes de ingreso y alta analizados para la realización del presente estudio, el uso empírico de antibioterapia en los pacientes más graves al ingreso, lo que podría estar relacionado con el hecho de no observar un número superior de infecciones bacterianas en dicho grupo de pacientes. Se precisan más estudios para confirmar o rechazar esta hipótesis.

Por otro lado, en los últimos tres años, se han realizado numerosos estudios que han tratado de establecer la eficacia de las vacunas en cuanto a la disminución de infecciones, la creación de inmunidad de grupo y la disminución del riesgo de enfermedad COVID-19 grave(11,35). Sin embargo, en el estudio realizado en el HUMV en la **cohorte de sanitarios vacunados**(13), se ha analizado de forma detallada los diferentes elementos de la respuesta inmunitaria adaptativa incluyendo la producción de anticuerpos específicos y la respuesta celular específica frente a SARS-CoV-2.

Tal y como se había descrito en estudios previos(2), en la cohorte objeto de análisis parece que **una respuesta duradera frente al SARS-CoV2 requiere la interacción de linfocitos T y B(13)**. En esta cohorte, se ha demostrado un incremento en células T helper foliculares con fenotipo memoria  $pT_{FH1}$  y  $pT_{FH2}$  tras la segunda dosis de vacuna BNT162b2. El incremento de células  $T_{FH}$  ha sido relacionado clásicamente, mediante estudios realizados a partir de la vacuna contra el virus de la gripe, con el desarrollo de una respuesta humoral específica. De esta manera, y como se había descrito previamente (36) las células  $pT_{FH1}$  carecen de capacidad para activar células B *naïve* mientras que son capaces de inducir la diferenciación de células B memoria hacia células plasmáticas (37) Además, las células  $pT_{FH2}$  de memoria son capaces de inducir la producción de IgG por parte de las células B *naïve* y el cambio de isotipo mediante la secreción de IL-12 (36) demostrándose, de esta forma, la interrelación entre respuesta humoral y celular. Sin embargo, a diferencia del curso natural de una respuesta inmunitaria basada en la cooperación de linfocitos T y B para generar células específicas implicadas en la producción de anticuerpos, en este estudio se ha detectado **la respuesta humoral previa a la detección de la respuesta celular**. Esto podría explicarse porque los estudios han sido realizados en sangre periférica y no en las subpoblaciones de linfocitos T presentes en los órganos linfoides, lo que podría suponer un retraso en la detección.

La vacuna BNT162b2 es una vacuna basada en ARNm. Antes del COVID19, ninguna vacuna de este tipo había sido aprobada en humanos. De esta manera, la principal forma de demostrar sensibilización frente al SARS-CoV2 ha sido mediante el desarrollo de **anticuerpos específicos**. Se ha demostrado el mismo nivel de respuesta en personas que habían padecido la enfermedad y habían recibido una dosis de vacuna y en aquellas que, sin haber padecido el COVID19 fueron vacunados con dos dosis (38). El estudio realizado en esta cohorte se basa en la producción de anticuerpos neutralizantes a pesar de que no se obtuvo información sobre dicha producción. Ésta es una de las principales limitaciones de este estudio, ya que el método ELISA empleado era capaz de detectar anticuerpos anti-S2 y anti RBD y se asumió que los anticuerpos que se detectaban eran anticuerpos neutralizantes (39) .

En esta cohorte, se observó tras la segunda dosis que todos los voluntarios desarrollaron anticuerpos de isotipo **IgG** y el 41,51% desarrolló anticuerpos IgA y el 37,74% IgM. Esto apoya los hallazgos de otros estudios previos (38) en los que se concluía que los títulos de IgG de pacientes vacunados mediante dos dosis de vacunas RNAm que codifican para la proteína S eran comparables con aquellos presentes en pacientes con COVID19 grave.

Mientras que los primeros grupos de vacunación a lo largo de toda Europa incluyeron tanto trabajadores sanitarios como personas de edad avanzada, en la cohorte objeto de análisis se incluyeron únicamente trabajadores sanitarios menores de 65 años y sin comorbilidades conocidas. En este grupo de sujetos se ha demostrado un **incremento de SwM B, Th1 memoria y  $pT_{FH}$  tras la vacunación**. Dentro de los linfocitos T helper foliculares, se ha observado un incremento de las subpoblaciones de  $pT_{FH1}$  y  $pT_{FH2}$  a expensas de un descenso de  $pT_{FH17}$ . Esto podría explicarse porque, a raíz de la segunda dosis de vacuna, se produce una inducción de la respuesta inmunitaria celular mediada por  $pT_{FH1}$  de memoria y una inducción de la reacción de centros germinales mediada por  $pT_{FH2}$  de memoria. Sin embargo, existen algunos grupos cuya respuesta inmunitaria es deficiente, como es el caso de los pacientes en hemodiálisis o los pacientes institucionalizados, en cuyo caso se ha demostrado una reducción de la respuesta humoral tras la vacuna frente a los controles. Por el contrario, todavía falta por determinarse la respuesta celular inducida tras la vacunación en estos grupos de pacientes inmunosuprimidos.

En contraposición al 52% de eficacia tras la primera dosis publicado por el ensayo clínico de la vacuna BNT162b2 (40), en esta cohorte se observó la producción de anticuerpos anti-S específicos en un **94%** de los sanitarios tras 20 días desde la primera dosis si bien esta diferencia

tan marcada puede deberse a la diferencia de edad entre los sujetos de ambos estudios puesto que la media de edad en la cohorte de sanitarios fue de 42,5 años (rango intercuartílico de 30,5-54,2).

La eficacia de las vacunas se mide, como ya se ha comentado, mediante la incidencia de infección, que parece ser menor del 5% con las vacunas basadas en ARNm contra el SARS-CoV2. Sin embargo, en ciertos grupos de enfermos tales como los receptores de trasplante de órgano sólido, se ha descrito una falta de protección frente a la enfermedad COVID19 grave. La determinación de anticuerpos anti-S del SARS-CoV2 es un objetivo y la forma biológica de valorar la eficacia vacunal. De esta forma, se ha demostrado una respuesta humoral más débil en pacientes trasplantados. El uso de la respuesta de células T en la evaluación de la protección vacunal no está implementado de rutina, pero podría ser una herramienta de gran utilidad en grupos específicos de riesgo o grupos de pacientes octogenarios.

Como se ha comentado previamente, éste es el primer estudio donde se describen las células **T helper foliculares en sangre periférica** como subpoblaciones relevantes implicadas en el desarrollo de una respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV2. La mayor inducción de este tipo de subpoblación tras la segunda dosis comparado con las cifras obtenidas tras la primera dosis podría ayudar a demostrar una mayor efectividad en la vacunación de grupos de pacientes más vulnerables como los previamente descritos. Una falta de respuesta tras la segunda dosis podría ser una señal de alarma para protegerlos y plantearse la necesidad de una dosis de refuerzo para obtener una respuesta efectiva en estos pacientes.

Entre las limitaciones de este estudio, destaca la **ausencia de PD1 y CCR7** como marcadores que permiten diferenciar entre células  $p_{T_{FH}}$  quiescentes y activadas. Además, la identificación de anticuerpos anti SARS-CoV2 como una **variable dicotómica** no ha permitido establecer una relación entre la presencia de estos anticuerpos y el nivel de subpoblaciones de linfocitos T.

Estos hallazgos, en concordancia con los de estudios previos (11,13) , sugieren que la **vacunación podría ser un elemento clave en el desarrollo de una respuesta inmunitaria precoz y eficaz** que permita tanto disminuir el riesgo de enfermedad COVID-19 grave (13) como el desarrollo de inmunidad de grupo (11). Mediante el estudio realizado en esta cohorte se ha descrito la respuesta inmunitaria específica tras la vacunación con la nueva vacuna BNT162b2 midiendo la producción de anticuerpos específicos y el desarrollo de una respuesta T específica. Además, tiene lugar una movilización de células T helper foliculares y células B foliculares hacia la circulación, reflejando una activación específica del sistema inmunitario. Esto podría ser de gran utilidad en el manejo de poblaciones con cierto grado de inmunosupresión o inmunosenescencia.

A pesar de que los datos de ambas cohortes aportan datos que podrían ser de gran utilidad para estudios posteriores, queda mucho por conocer acerca de la durabilidad de la inmunidad vacunal, la existencia o ausencia de protección cruzada frente a nuevas variantes, así como los posibles efectos adversos a medio-largo plazo de las diferentes vacunas existentes en el mercado (41) y el análisis del riesgo-beneficio de dichas vacunas.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados, se puede concluir lo siguiente:

- Por un lado, el análisis y la cuantificación de los diferentes elementos de la respuesta inmunitaria natural frente a la infección por SARS-CoV2 en pacientes COVID19 positivos al ingreso, ha permitido conocer de manera más precisa las diferencias existentes entre los dos grupos en los que se dividió dicha cohorte (leve y moderada-grave). La evidencia de diferencias estadísticamente significativas en la comparación de gran parte de los parámetros analizados, tales como la ferritina, la edad, el dímero D o niveles de monocitos clásicos entre otros, ha permitido desarrollar un modelo predictivo de gravedad que podría ser de gran utilidad en el manejo al ingreso de pacientes con COVID19. De la misma forma, parece existir una relación estadísticamente significativa entre la toma de tratamientos crónicos previos y el nivel de gravedad al ingreso así como la necesidad de mayor número de medidas terapéuticas durante el ingreso en este grupo de pacientes.
- Por otro lado, el estudio de la respuesta inmunitaria inducida tras la vacunación con BNT162b2 Pfizer-BioNTech ha permitido observar que existe una movilización de  $T_{FH}$  hacia la circulación periférica lo que refleja una activación específica del sistema inmunitario.

## 7. AGRADECIMIENTOS

En estas líneas de agradecimiento con las que doy cierre a este trabajo de fin de carrera y a esta etapa universitaria, me gustaría comenzar por acordarme de todos aquellos que han hecho posible la realización de este documento y me han acompañado y orientado durante su redacción, así como de todos los profesionales del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla implicados en la realización de ambos estudios analizados.

En primer lugar, al doctor Marcos López Hoyos, por hablarme desde el primer momento de la importancia de la investigación y hacerme ver mi papel en la misma. Gracias por motivarme a esforzarme al máximo por aprender sobre inmunología, sobre el SARS-CoV2 y sobre la realización de trabajos científicos y por sus directrices a lo largo de estos meses.

Especial agradecimiento al doctor Juan Irure Ventura, por sus innumerables correcciones y su infinita paciencia. Gracias por orientarme y acompañarme en cada paso de este trabajo y por hacerlo de manera tan constante y motivadora.

Agradecer al resto de profesores, tanto de la Universidad de Cantabria como de la Universidad Complutense de Madrid, donde cursé cuarto de carrera. Gracias a quienes, con tanta ilusión, han dedicado parte de su tiempo a transmitirnos sus conocimientos y hacernos partícipes de su experiencia personal y profesional en el mundo de la medicina. Especial agradecimiento al doctor José Antonio Riancho Moral, por enseñarme en este último curso a pensar desde un punto de vista diferente al que estaba acostumbrada, y al doctor Juan Antonio García Alonso, médico internista del Hospital Sierrallana bajo cuya supervisión he tenido el placer de poner en práctica durante dos meses los conocimientos teóricos adquiridos en estos seis años.

Gracias a todas mis amigas, por confiar en mí, por aguantarme y motivarme año tras año y examen tras examen. Si de algo estoy segura es de que gran parte del mérito lo tienen ellas y de que esto ha sido un trabajo en equipo. Gracias también a todos aquellos compañeros que a lo largo de la carrera han sido un apoyo fundamental y me han hecho confirmar la importancia del trabajo en equipo.

Y, finalmente, el mayor agradecimiento se lo quiero dedicar a mi familia; por animarme desde que tengo uso de razón a tener inquietud por aprender, por impulsarme a buscar aquello que me hiciera feliz, por apoyarme en todas mis decisiones, por sus incansables frases y gestos de ánimo y por su paciencia durante todos estos años. Gracias a mis padres y abuelos, por sus consejos, por enseñarme la importancia del esfuerzo y del sacrificio para obtener un bien futuro mayor (tanto en lo personal como en lo profesional), por estar siempre tan orgullosos de mí, por no presionarme nunca y por ser mi apoyo fundamental. A mis hermanas, por aguantarme, animarme y alegrarme las horas de estudio y la vida. Y a Fernando, por confiar siempre en mí, acompañarme e impulsarme a tratar de ser mejor cada día. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Muchas gracias a todos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández-Rodríguez A, Casas I, Culebras E, Morilla E, Cohen MC, Alberola J. COVID-19 y estudios microbiológicos post mortem. *Revista Española de Medicina Legal* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 May 14];46(3):127–38. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-medicina-legal-285-articulo-covid-19-estudios-microbiologicos-post-mortem-S0377473220300304>
2. Röltgen K, Boyd SD. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021 Jul 14 [cited 2022 May 14];29(7):1063–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34174992/>
3. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 May 14];22(12):757–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34535792/>
4. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 May 14];184(7):1671–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33743212/>
5. Osuchowski MF, Winkler MS, Skirecki T, Cajander S, Shankar-Hari M, Lachmann G, et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 May 14];9(6):622–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33965003/>
6. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2022 May 14];184(4):861–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33497610/>
7. Goletti D, Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 May 14];27(12):1784–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34256141/>
8. Kilic G, Bulut O, Jaeger M, ter Horst R, Koeken VACM, Moorlag SJCFM, et al. The Immunological Factors Predisposing to Severe Covid-19 Are Already Present in Healthy Elderly and Men. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Aug 9 [cited 2022 May 14];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34434199/>
9. Zhang Q, Liu Z, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Bigio B, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2022 Jun 1];370(6515). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32972995/>
10. Vinh DC, Abel L, Bastard P, Cheng MP, Condino-Neto A, Gregersen PK, et al. Harnessing Type I IFN Immunity Against SARS-CoV-2 with Early Administration of IFN- $\beta$ . *Journal of Clinical Immunology* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Jun 1];41(7):1. Available from: </pmc/articles/PMC8186356/>
11. Nordström P, Ballin M, Nordström A. Association Between Risk of COVID-19 Infection in Nonimmune Individuals and COVID-19 Immunity in Their Family Members. *JAMA Intern*

- Med [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 May 14];181(12):1589–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34633407/>
12. Creech CB, Walker SC, Samuels RJ. SARS-CoV-2 Vaccines. JAMA [Internet]. 2021 Apr 6 [cited 2022 May 14];325(13):1318–20. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2777059>
  13. Segundo DS, Comins-Boo A, Irure-Ventura J, Renuncio-García M, Roa-Bautista A, González-López E, et al. Immune Assessment of BNT162b2 m-RNA-Spike Based Vaccine Response in Adults. Biomedicines [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 May 14];9(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34440072/>
  14. Segundo DS, de las Revillas FA, Lamadrid-Perojo P, Comins-Boo A, González-Rico C, Alonso-Peña M, et al. Innate and Adaptive Immune Assessment at Admission to Predict Clinical Outcome in COVID-19 Patients. Biomedicines [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 May 14];9(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34440121/>
  15. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. J Leukoc Biol [Internet]. 2012 May [cited 2022 May 14];91(5):829–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22345707/>
  16. Pradenas E, Trinité B, Urrea V, Marfil S, Ávila-Nieto C, Rodríguez de la Concepción ML, et al. Stable neutralizing antibody levels 6 months after mild and severe COVID-19 episodes. Med (N Y) [Internet]. 2021 Mar 12 [cited 2022 May 14];2(3):313–320.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33554155/>
  17. Cossarizza A, de Biasi S, Guaraldi G, Girardis M, Mussini C. SARS-CoV-2, the Virus that Causes COVID-19: Cytometry and the New Challenge for Global Health. Cytometry A [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 May 14];97(4):340–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32187834/>
  18. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. Cell [Internet]. 2020 Jun 25 [cited 2022 May 14];181(7):1489–1501.e15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473127/>
  19. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. Signal Transduct Target Ther [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Jun 2];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296069/>
  20. Reusch N, de Domenico E, Bonaguro L, Schulte-Schrepping J, Baßler K, Schultze JL, et al. Neutrophils in COVID-19. Front Immunol [Internet]. 2021 Mar 25 [cited 2022 Jun 2];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33841435/>
  21. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. Science [Internet]. 2020 Sep 4 [cited 2022 Jun 2];369(6508). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32669297/>

22. de Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Jun 2];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32632085/>
23. Bolouri H, Speake C, Skibinski D, Long SA, Hocking AM, Campbell DJ, et al. The COVID-19 immune landscape is dynamically and reversibly correlated with disease severity. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Jun 2];131(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33529167/>
24. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* [Internet]. 2020 Sep 17 [cited 2022 Jun 2];182(6):1419-1440.e23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32810438/>
25. NJ S, Y W, Z MH, C C, A D, BP B, et al. Innate lymphoid cells and disease tolerance in SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* [Internet]. 2021 Jan 15 [cited 2022 Jun 2]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33469605/>
26. García M, Kokkinou E, Carrasco García A, Parrot T, Palma Medina LM, Maleki KT, et al. Innate lymphoid cell composition associates with COVID-19 disease severity. *Clin Transl Immunology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 2];9(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33343897/>
27. Zeng B, Shi S, Ashworth G, Dong C, Liu J, Xing F. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Jun 2];10(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962426/>
28. Bobcakova A, Petriskova J, Vysehradsky R, Kocan I, Kapustova L, Barnova M, et al. Immune Profile in Patients With COVID-19: Lymphocytes Exhaustion Markers in Relationship to Clinical Outcome. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Apr 15 [cited 2022 Jun 2];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33937096/>
29. Rezaei M, Marjani M, Mahmoudi S, Mortaz E, Mansouri D. Dynamic Changes of Lymphocyte Subsets in the Course of COVID-19. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Jun 2];182(3):254–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33498051/>
30. Martín MC, Jurado A, Abad-Molina C, Orduña A, Yarce O, Navas AM, et al. The age again in the eye of the COVID-19 storm: evidence-based decision making. *Immun Ageing* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jun 2];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34016150/>
31. Fan X, Zhu B, Nouri-Vaskeh M, Jiang C, Feng X, Poulsen K, et al. Scores based on neutrophil percentage and lactate dehydrogenase with or without oxygen saturation predict hospital mortality risk in severe COVID-19 patients. *Virol J* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jun 2];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33789703/>
32. Gupta RK, Marks M, Samuels THA, Luintel A, Rampling T, Chowdhury H, et al. Systematic evaluation and external validation of 22 prognostic models among hospitalised adults with COVID-19: an observational cohort study. *Eur Respir J* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Jun 2];56(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32978307/>

33. Qin ZJ, Liu L, Sun Q, Li X, Luo JF, Liu JS, et al. Impaired immune and coagulation systems may be early risk factors for COVID-19 patients: A retrospective study of 118 inpatients from Wuhan, China. *Medicine* [Internet]. 2020 Aug 28 [cited 2022 Jun 2];99(35):e21700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32871887/>
34. Bobcakova A, Petriskova J, Vysehradsky R, Kocan I, Kapustova L, Barnova M, et al. Immune Profile in Patients With COVID-19: Lymphocytes Exhaustion Markers in Relationship to Clinical Outcome. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Apr 15 [cited 2022 Jun 2];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33937096/>
35. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* [Internet]. 2011 Jan 28 [cited 2022 May 22];34(1):108–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215658/>
36. Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* [Internet]. 2013 Mar 13 [cited 2022 May 22];5(176). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23486778/>
37. Gobbi F, Buonfrate D, Moro L, Rodari P, Piubelli C, Caldrelli S, et al. Antibody Response to the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Subjects with Prior SARS-CoV-2 Infection. *Viruses* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 May 22];13(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33807957/>
38. Carrillo J, Izquierdo-Useros N, Ávila-Nieto C, Pradenas E, Clotet B, Blanco J. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2021 Jan 29 [cited 2022 May 22];538:187–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33187644/>
39. Chodick G, Tene L, Patalon T, Gazit S, Tov A ben, Cohen D, et al. Assessment of Effectiveness of 1 Dose of BNT162b2 Vaccine for SARS-CoV-2 Infection 13 to 24 Days After Immunization. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 1];4(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34097044/>
40. Hodgson SH, Mansatta K, Mallett G, Harris V, Emary KRW, Pollard AJ. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 May 22];21(2):e26–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33125914/>