

TESIS DOCTORAL

RESPUESTA INMUNITARIA EN COVID-19 TRAS INFECCIÓN ACTIVA Y VACUNACIÓN

PhD THESIS

COVID-19 IMMUNE RESPONSE AFTER ACTIVE INFECTION AND VACCINATION

AUTORA

PATRICIA LAMADRID PEROJO

DIRECTORES

MARCOS LÓPEZ HOYOS

DAVID SAN SEGUNDO ARRIBAS

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Escuela de **Doctorado** de la Universidad de Cantabria

Santander 2022

Respuesta inmunitaria en COVID-19 tras infección activa y vacunación



IDIVAL

Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biomedicina

Tesis Doctoral

Patricia Lamadrid Perojo

Directores: Dr. Marcos López Hoyos y Dr. David San Segundo Arribas

D. **MARCOS LÓPEZ HOYOS**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de la Universidad de Cantabria, Jefe de Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y responsable del grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IDIVAL:

CERTIFICA QUE,

Doña Patricia Lamadrid Perojo ha realizado, en el Grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IDIVAL, bajo su dirección el presente trabajo de tesis doctoral titulado:

“Respuesta inmunitaria en COVID-19 tras infección activa y vacunación”

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Examinado el trabajo considero que está adecuadamente elaborado para su lectura y defensa pública y ante la Comisión que ha de juzgar la Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido este certificado en

Santander a 29 de Noviembre de 2022.

Fdo. Marcos López Hoyos

D. DAVID SAN SEGUNDO ARRIBAS, Doctor Biomedicina, Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, integrante del grupo de Trasplante y Autoinmunidad y director científico de la Unidad de Citometría del IDIVAL,

CERTIFICA QUE,

Doña Patricia Lamadrid Perojo ha realizado, en el Grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IDIVAL, bajo su codirección el presente trabajo de tesis doctoral titulado:

“Respuesta inmunitaria en COVID-19 tras infección activa y vacunación”

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Examinado el trabajo considero que está adecuadamente elaborado para su lectura y defensa pública y ante la Comisión que ha de juzgar la Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido este certificado en

Santander a 29 de Noviembre de 2022.

Fdo. David San Segundo Arribas

Este trabajo ha sido financiado por:

1. El Gobierno de Cantabria (2020UIC22-PUB-001).
2. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (COV20/00170).

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

1. Lamadrid P, Alonso-Peña M, San Segundo D, Arias-Loste M, Crespo J, Lopez-Hoyos M. Innate and Adaptive Immunity Alterations in Metabolic Associated Fatty Liver Disease and Its Implication in COVID-19 Severity. *Front Immunol.* 2021 Mar 30;12:651728.
doi: 10.3389/fimmu.2021.651728. PMID: 33859644; PMCID: PMC8042647.
2. San Segundo D, Comins-Boo A, Irure-Ventura J, Renuncio-García M, Roa-Bautista A, González-López E, Merino-Fernández D, Lamadrid-Perojo P, Alonso-Peña M, Ocejo-Vinyals JG, Gutiérrez-Larrañaga M, Guiral-Foz S, López-Hoyos M. Immune Assessment of BNT162b2 m-RNA-Spike Based Vaccine Response in Adults. *Biomedicines.* 2021 Jul 22;9(8):868.
doi: 10.3390/biomedicines9080868. PMID: 34440072; PMCID: PMC8389701.
3. San Segundo D, Arnáiz de Las Revillas F, Lamadrid-Perojo P, Comins-Boo A, González-Rico C, Alonso-Peña M, Irure-Ventura J, Olmos JM, Fariñas MC, López-Hoyos M. Innate and Adaptive Immune Assessment at Admission to Predict Clinical Outcome in COVID-19 Patients. *Biomedicines.* 2021 Jul 29;9(8):917.
doi: 10.3390/biomedicines9080917. PMID: 34440121; PMCID: PMC8389676.
4. San Segundo D, Comins-Boo A, Lamadrid-Perojo P, Irure-Ventura J, Castillo-Otí JM, Wallman R, Calvo-Montes J, Méndez-Legaza JM, Baamonde-Calzada C, Sánchez-Molina I, Lecue-Martínez M, Ventisca-Pérez S, Batlle-López A, Hoyos ML. COVID-19 mRNA Based Vaccine Immune-Response Assessment in Nursing Home Residents for Public Health Decision. *Vaccines (Basel).* 2021 Dec 2;9(12):1429.
doi: 10.3390/vaccines9121429. PMID: 34960173; PMCID: PMC8703754.
5. Odriozola A, Lamadrid-Perojo P, Cuadrado A, San Segundo D, Del Barrio M, Fortea JI, Puente A, Amigo L, Fernández-Santiago R, Castillo F, Achalandabaso M, Andrés Echeverri J, Rodríguez-Sanjuan JC, López-Hoyos M, Crespo J, Fábrega E. Immune Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 2022 Jul 1;106(7):e341-e342.
doi: 10.1097/TP.0000000000004147. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35323163; PMCID: PMC9213066.

OTRAS PUBLICACIONES DURANTE EL PROGRAMA DE DOCTORADO

1. Iglesias-Escudero M, Sansegundo-Arribas D, Riquelme P, Merino-Fernández D, Guiral-Foz S, Pérez C, Valero R, Ruiz JC, Rodrigo E, Lamadrid-Perojo P, Hutchinson JA, Ochando J, López-Hoyos M. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Kidney Transplant Recipients and the Effect of Maintenance Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020 Apr 30;11:643.
doi: 10.3389/fimmu.2020.00643. PMID: 32425928; PMCID: PMC7203496.
2. Iglesias-Escudero M, Segundo DS, Merino-Fernandez D, Mora-Cuesta VM, Lamadrid P, Alonso-Peña M, Raso S, Iturbe D, Fernandez-Rozas S, Cifrian J, López-Hoyos M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Increased in Lung Transplant Recipients and Regulated by Immunosuppressive Therapy. *Front Immunol.* 2022 Jan 10;12:788851.
doi: 10.3389/fimmu.2021.788851. PMID: 35185863; PMCID: PMC8848105.

A mi padre

Agradecimientos

Para comenzar, me gustaría agradecer de la manera más sincera posible la participación en esta tesis doctoral a todos los integrantes que han formado parte durante estos años del laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y del grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IDIVAL. Han sido unos años con mucho volumen de trabajo, mucha presión, pero, sobre todo, mucho trabajo en equipo. Remarco el trabajo en equipo porque, en situaciones como la pandemia de la COVID-19, es algo fundamental. La coordinación, dedicación, motivación y pasión por la ciencia de muchos profesionales a la vez puede dar lugar a cosas maravillosas; como lo es para mí esta tesis doctoral. En ella se encuentra recogido el esfuerzo de muchas personas. GRACIAS, en mayúsculas, a todos vosotros por vuestro cariño y profesionalidad.

A continuación, me gustaría agradecer a mis directores de tesis: Marcos y David. Gracias, Marcos, por tu inestimable ayuda, tu disposición constante y todo el apoyo que me has brindado todos estos años desde que empecé contigo. Ha sido una etapa emocionante, en la que, a pesar de las dificultades, siempre he sentido que apostabas por mí y por mi formación. Me llevo un gran aprendizaje. Gracias de corazón.

David, ¡no se por dónde empezar contigo! Muchísimas gracias por todo tu apoyo, por guiarme durante toda la tesis, por enseñarme con tanta paciencia, por resolverme cada duda y por tu implicación conmigo. No podría haber tenido mejor co-director, eres un gran profesional.

Gracias a todo el personal del IDIVAL que me ha acompañado durante estos años. Gracias Sandra, Gabi, Chelo...por vuestro apoyo y compañía. A Marta, por tu ayuda y, ¡por esa maravillosa revisión!

A David, por tu ayuda constante, por iniciarme en la citometría hace ya... ¡4 años!, y bueno... ¿por qué no? por tus millones de sustos que hacían que me mantuviese “alerta”.

A María (IDIVAL), por formar parte de mis inicios aquí, por tus risas y por haber hecho que me sintiese tan cómoda al empezar en un sitio nuevo. Sabes que, aunque en esta tesis hayamos tenido más contacto en la distancia que en persona, siempre ocuparás un lugar especial en mi corazón.

Gracias a todo el personal implicado en los turbulentos inicios de la pandemia que, sin yo saberlo, ya me estaban ayudando a escribir esta tesis.

A Juan y Alejandra, por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Me habéis facilitado mucho el camino, os lo agradezco de corazón.

A todos los residentes del laboratorio de Inmunología: Sandra, María, Elena, Adriel, Mónica, Dzmitry, Carolina y Nerea, por todas las risas, el apoyo, el trabajo y la gran ayuda tan desinteresada que me habéis regalado todos estos años. Gracias por llamarme “Patri cientíiiiífica” para que me lo creyera un poco más. Sois maravillosos y os deseo lo mejor en vuestra carrera.

A todos los técnicos del laboratorio de Inmunología, sois el engranaje perfecto para que este funcione.

Gracias a todo el personal sanitario que ha participado en este estudio de manera altruista.

Gracias a Pedro Muñoz, por su gran apoyo y disponibilidad siempre que lo hemos necesitado.

Gracias a todos los que han hecho posible la coordinación de un estudio tan complejo y amplio como ha sido reclutar a tantas personas de residencias de ancianos; especialmente, a todos y cada uno de los residentes.

Gracias a los Servicios de Enfermedades Infecciosas, Neumología, Microbiología y Digestivo (especialmente a la Unidad de Trasplante Hepático), por todo el trabajo realizado y los pacientes aportados. Un agradecimiento especial a ellos, los pacientes, por contribuir a que la investigación avance. Vosotros sois los verdaderos protagonistas.

A a mis evaluadores, Ramón y Emilio, por darme los consejos necesarios en cada reunión durante estos años para que esta tesis doctoral saliera adelante.

A mi familia y amigos.

Gracias a mi madre, por demostrarme cada día lo que es el amor profundo y ayudarme en cada pequeño detalle para que me enfoque en conseguir mis metas. No se qué haría sin ti.

A mi hermano Guillermo, por implicarte y ser el pilar fundamental de mi vida, como lo has sido siempre, como lo serás siempre. A Ángela, por tu ayuda y buenos consejos.

A mi tía Mari, por ser otro de mis apoyos más importantes y haber estado siempre al pie del cañón.

A Lana, mi fiel compañera, por tu cariño incondicional.

A Álvaro y su familia, por estar siempre ahí. Pero sobre todo a ti, Álvaro, por demostrarme lo que es el amor verdadero. Por tratar mis preocupaciones, logros y fracasos como si fueran tuyos. Gracias por darme paz cuando más la necesito y por presionarme cuando la situación lo requiere. Por darme alas para que vuele alto, y querer acompañarme. Por quererme tanto. Gracias infinitas por cruzarte en mi camino hace casi ya 6 años.

A mis amigas, por permanecer a mi lado durante tantos años y seguir manteniendo nuestra esencia. Quiero agradecer especialmente las dotes artísticas de Ángela y María.

Ángela, gracias de corazón por dejarme plasmar tu talento y demostrarme lo que es la amistad. Me siento una gran afortunada por tener amigas así.

Y, por último, a ti, papá. Sobre todo, a ti.

Por tantas razones que resultan incontables. Por iluminar mi camino sin importar donde estés. Por seguir conmigo cada día. Por tener fé ciega en mí desde el día en que nací. Por enseñarme que, con esfuerzo, dedicación y una gran pasión por la vida se pueden conseguir cosas maravillosas. Por ser un padre extraordinario que siempre ha demostrado que, aunque cueste darse un baño en aguas heladas, la sensación de después hace que todo merezca la pena. Siempre me faltarán palabras contigo. Esta tesis, como todo lo que logre en mi vida, será gracias a tí.

A todos los mencionados y a los no intencionadamente olvidados: gracias, de corazón, por hacer esto posible.

***“Llegar a la verdad más simple,
requiere años de contemplación”***

- Isaac Newton

ABREVIATURAS

κ : cadena *kappa*

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

*: $p < 0,05$

**: $p < 0,01$

***: $p < 0,001$

#: Recuento absoluto (células/ μ L)

A

ACE2: Enzima Convertidora de Angiotensina 2

AcN: Anticuerpos Neutralizantes

ADNs: Ácido Desoxirribonucleico Bicatenario

ADNs: Ácido Desoxirribonucleico Monocatenario

AIMs: Marcadores Inducidos tras Activación

APC: Célula Presentadora de Antígeno

ARDS: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNss: Ácido Ribonucleico Monocatenario

AU: Unidades Arbitrarias

AUC: Área Bajo la Curva

B

BCR: Receptor de Células B

BSA: Albúmina de Suero Bovino

C

C3, C4, C5: Componente 3, 4 o 5 del Complemento

CEIm: Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos

CLIA: Inmunoensayo de Micropartículas Quimioluminiscente

Ct: Umbral de Ciclos

CTLA-4: Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico

CoV: Coronavirus

COVID-19: Enfermedad Provocada por el Coronavirus de 2019

D

DAMP: Patrón Molecular Asociado a Peligro

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: Sulfoxido de Dimetilo

E

E: Proteína de la Envoltura

EUA: Autorización de Uso por Emergencia

F

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FSC: Dispersión Frontal

FS INT: Intensidad de Dispersión Frontal

G

GesCARE: Sistema de Gestión de Residencias de Cantabria

H

HTA: Hipertensión Arterial

huCoVs: Coronavirus Endémicos

HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

I

IC: Intervalo de Confianza
IFN: Interferón
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
IgA: Inmunoglobulina A
IgG1: Subclase 1 de la Inmunoglobulina G
IgG2a: Subclase 2a de la Inmunoglobulina G
IL: Interleucina
IL-6R: Receptor de la Interleucina 6
ILC: Células Linfoides Innatas
IRF: Factores Reguladores de Interferón
ISG: Genes Estimulados por Interferón

J

JAK: Janus Cinasa

L

LB: Linfocito B
LDH: Lactato Deshidrogenasa
LISCAN: Sistema de Gestión de Laboratorios Unificados en Cantabria
LPS: Lipopolisacárido
LT: Linfocito T

M

MAC: Complejo de Ataque a Membrana
MAPK: Proteínas Cinasa Activadas por Mitógeno
MBLs: Lectinas Unión a Manosa
MEM: de Memoria
MERS-CoV: Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

MFI: Intensidad de Fluorescencia de la Mediana

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MyD88: Proteína de Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88

N

N: Proteína de la Nucleocápside

NA: No Aplicable

NF- κ B: Factor Nuclear κ B

NIH: Institutos Nacionales de Salud

NK: Natural Killer

NKT: Natural Killer de tipo T

NLR: Receptores de tipo NOD

NLRP: Receptores tipo NOD con Dominio de Pirina

NRP1: Neuropilina 1

NS: No Significativo

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: *Odds Ratio*

ORF: Marcos de Lectura Abierta

P

PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos

PANoptosis: Muerte Celular Inflamatoria donde se activan procesos de Piroptosis, Apoptosis y Necroptosis

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

PBS: Tampón Fosfato Salino

PCR: Proteína C Reactiva

PCR-RT: Reacción en Cadena de la Polimerasa por Retrotranscripción

PPPV: PCR Positiva Post Vacunación

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones

pT_{FH}: Células T Foliculares Colaboradoras Periféricas

Q

qPCR: PCR cuantitativa

R

RBD: Dominio de Unión al Receptor

RIC: Rango Intercuartílico

RLR: Receptores de tipo RIG-I

ROC: Curva Característica Operativa del Receptor

S

S: Proteína de la Espícula o Proteína *Spike*

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Grave

SARS-CoV: Primer coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave

SARS-CoV-2: Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave 2

SEI: Sociedad Española de Inmunología

SOTR: Receptor de Trasplante de Órgano Sólido

SSC: Dispersión Lateral

SS INT: Intensidad de Dispersión Lateral

SwM: de Memoria *Switched*

T

Tc: Células T citotóxicas

Tc1/2/17: Subclase 1,2 o 17 de Células T citotóxicas

TCM: Células T Centrales de Memoria

TCR: Receptor de Células T

TEM: Células T Efectoras de Memoria

TEMRA: Células T Efectoras de Memoria Recientemente Activadas

T_{FH}: Células T Foliculares Colaboradoras

Th: Células T Colaboradores o T *helper*

Th1/2/17: Subclase 1, 2 o 17 de células T colaboradores o T *helper*

TiCARES: Sistema de Citación Unificado de Cantabria

TLR: Receptor de Tipo Toll

TMPRSS2: Serina Proteasa Transmembrana 2

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

Tregs: Células T reguladoras

TRIF: Adaptador con Dominio TIR Inductor de Interferón β

U

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

V

VOC: Variantes de Preocupación

VOI: Variantes de Interés

ÍNDICE

Abreviaturas	12
Índice de Figuras	19
Índice de Tablas	23
Resumen.....	25
1. Introducción.....	29
1.1 Antecedentes.....	30
1.2 Brote de COVID-19.....	31
1.2.1 Sintomatología y grados de gravedad.....	32
1.2.2 Punto de entrada del SARS-CoV-2.....	34
1.2.3 Evolución genética y variantes del SARS-CoV-2	35
1.2.4 Opciones terapéuticas de la COVID-19: fármacos y vacunas.....	38
1.3 Respuesta inmunitaria	40
1.3.1 Respuesta inmunitaria innata anti-viral.....	42
1.3.1.1 Receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) y tormenta de citocinas.....	43
1.3.1.2 Respuesta a interferón (IFN)	45
1.3.1.3 Sistema del complemento.....	47
1.3.2 Respuesta inmunitaria adaptativa	47
1.3.2.1 Inmunidad humoral mediada por anticuerpos	50
1.3.2.2 Inmunidad celular.....	50
2. Hipótesis y objetivos	52
3. Material y métodos.....	55
3.1 Anticuerpos monoclonales empleados en citometría de flujo	56
3.2 Reactivos.....	58
3.3 Instrumentación	59

3.4	Material biológico necesario	59
3.5	Técnicas.....	60
3.5.1	Citometría de flujo para los linfocitos principales de sangre periférica.....	60
3.5.2	Citometría de flujo para poblaciones de células T y B, linfoides innatas, Natural Killer y subpoblaciones de monocitos.....	60
3.5.3	Expresión de proteínas TLR en PBMCs.....	65
3.5.4	Evaluación de la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2 mediante citometría de flujo	66
3.5.5	Determinación de la IL-6 circulante	68
3.5.6	Determinación de respuesta humoral específica frente a la proteína <i>spike</i> del SARS-CoV-2	68
3.5.7	Análisis de parámetros de laboratorio.....	69
3.5.8	Análisis estadístico	70
3.6	Cohortes.....	71
3.6.1	Cohorte de infección por SARS-CoV-2 al ingreso	71
3.6.1.1	Cohorte inicial	72
3.6.1.2	Cohorte de validación.....	72
3.6.2	Cohorte de respuesta vacunal.....	72
3.6.2.1	Personal sanitario.....	72
3.6.2.2	Sujetos institucionalizados en residencias de ancianos.....	73
3.6.2.3	Receptores de trasplante hepático	75
4.	Resultados	76
4.1	Cohorte de infección por SARS-CoV-2.....	77
4.1.1	Cohorte inicial	77
4.1.1.1	Poblaciones del sistema inmunitario innato al ingreso	79
4.1.1.2	Poblaciones del sistema inmunitario adaptativo al ingreso.....	82
4.1.1.3	Respuesta de células T específica del SARS-CoV-2 en la enfermedad de COVID-19.....	87
4.1.1.4	Evaluación de los parámetros inmunitarios como factor pronóstico	88

4.1.2	Cohorte de validación.....	89
4.2	Cohorte vacunal.....	92
4.2.1	Estudio de la inmunidad en personal sanitario.....	92
4.2.1.1	Respuesta inmunitaria de células T entre dosis y al mes de la vacunación en personal sanitario.....	92
4.2.1.2	Respuesta inmunitaria celular T específica de antígenos del SARS-CoV-2 en personal sanitario vacunado	94
4.2.1.2.1	Entre dosis de la vacunación y un mes después de la segunda dosis	94
4.2.1.2.2	A los nueve meses de la segunda dosis de la vacuna.....	96
4.2.1.3	Respuesta inmunitaria de células B y anticuerpos en personal sanitario vacunado	97
4.2.2	Estudio de la inmunidad de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos	100
4.2.2.1	Estudio de la inmunidad de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos a los dos meses de segunda dosis de la vacuna	100
4.2.2.2	Estudio de la inmunidad de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna	102
4.2.2.3	Riesgo de infección por el SARS-CoV-2 en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos tras la segunda dosis de la vacuna	106
4.2.3	Estudio de la inmunidad en receptores de trasplante hepático	108
5.	Discusión.....	110
6.	Conclusiones	123
7.	Referencias	125
	Anexo I: Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis	138
	Anexo II: Otras publicaciones durante el programa de doctorado	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los tres brotes principales de betacoronavirus en el mundo	32
Figura 2. Síntomas de la enfermedad COVID-19 causada por la infección del virus SARS-CoV-2	33
Figura 3. Entrada del virus SARS-CoV-2 en la célula a infectar a través del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)	35
Figura 4. Variantes de preocupación del SARS-CoV-2 en el mundo	37
Figura 5. Primera y segunda señal de la respuesta inmunitaria frente a un patógeno.....	41
Figura 6. Vías de señalización de los receptores extracelulares TLR1, TLR2, TLR6 y TLR4; y de los receptores intracelulares TLR3, TLR7 y TLR8.....	44
Figura 7. Respuesta a IFN-I temprana y retrasada en COVID-19 leve y grave.....	46
Figura 8. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa frente a la infección por el virus SARS-CoV-2	49
Figura 9. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de células T colaboradoras (Th o <i>T helper</i>).....	62
Figura 10. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de células T citotóxicas (Tc).....	63
Figura 11. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de células B	64
Figura 12. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de monocitos	65
Figura 13. Estrategia de gateado de la respuesta T específica frente al antígeno S del SARS-CoV-2.....	67
Figura 14. Ejemplo de una representación de la respuesta T específica frente a uno de los antígenos del SARS-CoV-2	68
Figura 15. Representación gráfica temporal cuantitativa de las muestras de las diferentes cohortes de pacientes analizadas en el laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV).....	71
Figura 16. Diseño del estudio de los sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria	74
Figura 17. Número absoluto de neutrófilos en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	80
Figura 18. Frecuencia relativa de monocitos no clásicos y células Natural Killer (NK) con fenotipo regulador, y número absoluto de Células Linfoides Innatas de tipo 3 (ILC3) en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	80
Figura 19. Número absoluto de linfocitos en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	82

Figura 20. Frecuencia de células Th1 memoria, células T citotóxicas HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ , células T citotóxicas CD27 ⁺ CD28 ⁺ , y plasmablastos en pacientes leves y moderados-graves con COVID-19 al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	87
Figura 21. Análisis de curva ROC del modelo de regresión logística para la predicción de pronósticos de COVID-19 moderados-graves	89
Figura 22. Análisis de curva ROC con una cohorte independiente de 37 pacientes para la validación del modelo de predicción realizado en la cohorte inicial	90
Figura 23. Evaluación de la respuesta inmunitaria de células T <i>helper</i> (Th) antes, durante y después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	93
Figura 24. Evaluación de los subtipos de células T <i>helper</i> foliculares periféricas (pTFH) de memoria después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	93
Figura 25. Evaluación de la respuesta celular T específica frente a péptidos del SARS-CoV-2, antes, durante y después de la vacunación, en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	94
Figura 26. Evolución de la respuesta celular T específica frente a los antígenos S, N y M del SARS-CoV-2 entre la primera y segunda dosis de la vacunación completa en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	96
Figura 27. Evaluación de la respuesta celular T específica frente a los antígenos S, N y M del SARS-CoV-2 al mes y a los nueve meses de la segunda dosis en sujetos de personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	97
Figura 28. Evaluación de la respuesta vacunal específica de células B frente al SARS-CoV-2 antes, durante y después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	98
Figura 29. Evaluación de la respuesta vacunal específica de células B frente al SARS-CoV-2 al mes de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	99
Figura 30. Evaluación de la respuesta vacunal específica de células B frente al SARS-CoV-2 nueve meses después de la segunda dosis de la vacuna en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	99
Figura 31. Evaluación de la respuesta inmunitaria a los dos meses de la segunda dosis de la vacuna en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria.	100
Figura 32. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los dos meses de la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria	102
Figura 33. Evaluación de la respuesta inmunitaria a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria.	103
Figura 34. Comparación de los niveles de anticuerpos anti-S1 a los dos y seis meses en el grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria con las dos dosis de la vacuna BNT162b2 sin infección previa al análisis por el SARS-CoV-2	104

Figura 35. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 en sujetos de residencias de ancianos de Cantabria	104
Figura 36. Niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los dos y seis meses en el grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria con las dos dosis de la vacuna BNT162b2 sin infección previa por el SARS-CoV-2 que han resultado ser seronegativos a los seis meses, y evaluación de su inmunidad celular T CD4 ⁺ específica	105
Figura 37. Análisis de la curva ROC para evaluar el riesgo de seronegativizar los niveles de anticuerpos anti-S1 a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna en los sujetos institucionalizados en residencias de Cantabria	106
Figura 38. Esquema explicativo del grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria sin infección previa con PCR positiva posterior a la segunda dosis de la vacuna BNT162b2	107
Figura 39. Niveles de anticuerpos anti-S1 a los dos meses de la segunda dosis del grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria sin infección previa por el SARS-CoV-2 con PCR positiva posterior a la vacuna BNT162b2	107
Figura 40. Respuesta humoral después de la tercera dosis de vacunación en receptores de trasplante hepático del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla	108
Figura 41. Niveles de anticuerpos IgG anti-S1 tras la segunda y tercera dosis de la vacuna mRNA-1273 SARS-CoV-2 en receptores trasplante hepático del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	109
Figura 42. Poblaciones celulares inmunitarias innatas y adaptativas desreguladas en pacientes de la cohorte inicial con COVID-19 grave	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fabricante, nombre, tipo y dosis necesarias de las vacunas de COVID-19 aprobadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y con Autorización de Uso por Emergencia (EUA).	39
Tabla 2. Anticuerpos monoclonales empleados en la técnica citometría de flujo. Se incluye el anticuerpo monoclonal, el fluorocromo asociado, el clon y su isotipo, la casa comercial y el número de referencia correspondiente.	56
Tabla 3. Parámetros demográficos, analíticos y clínicos de los 155 pacientes de la cohorte inicial analizados al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla	78
Tabla 4. Comparación de parámetros inmunitarios innatos en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	81
Tabla 5. Comparación de los principales grupos de linfocitos expresados como frecuencias relativas y números absolutos en sangre periférica en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	83
Tabla 6. Comparación de las frecuencias de los subgrupos de células T y B entre el grupo de pacientes leves y el de los moderados-graves con COVID-19 al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	85
Tabla 7. Expresión de CD134 y CD25 tras la estimulación con los antígenos específicos del SARS-CoV-2: N, M y S en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)	88
Tabla 8. Análisis univariante y multivariante de los siete parámetros incluidos en el modelo de regresión logística.....	88
Tabla 9. Parámetros detallados de la cohorte independiente de 37 pacientes al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) con COVID-19 confirmado	91

RESUMEN

La sobrecarga hospitalaria que caracterizó los primeros meses de la pandemia causada por el nuevo coronavirus responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2), supuso un gran reto para la Salud Pública. Mientras algunas personas mantuvieron un curso asintomático y sin complicaciones de la enfermedad, otras desarrollaron síntomas moderados, graves, o incluso fallecieron.

La respuesta inmunitaria desempeña un papel esencial en la variabilidad del curso de la infección por el SARS-CoV-2 y la respuesta a la vacuna frente a este virus. De este modo, la búsqueda e identificación de biomarcadores celulares y humorales de la respuesta inmunitaria podría ser de gran utilidad para predecir el pronóstico y tratamiento del paciente. Asimismo, la evaluación de la respuesta vacunal para determinar la eficacia clínica y duración de la protección ha sido, y es, indispensable para controlar la pandemia de la enfermedad causada por este virus (COVID-19).

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de distintos componentes de la respuesta inmunitaria innata y adquirida en sangre en COVID-19 para buscar biomarcadores pronósticos de la enfermedad. A su vez, los objetivos secundarios son 1) evaluar los componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria innata en pacientes con infección por SARS-CoV-2 activa; 2) analizar los componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria adquirida en pacientes con infección por SARS-CoV-2 activa; 3) establecer un modelo de predicción de los pronósticos más desfavorables en una cohorte inicial, y validar este modelo en una cohorte independiente de pacientes; 4) valorar la evolución y duración de la respuesta inmunitaria humoral y celular T específica frente al SARS-CoV-2 en la vacunación de un grupo inmunocompetente, y otro inmunocomprometido, ya sea por inmunosenescencia o por inmunosupresión farmacológica.

Para la realización de este estudio, incluimos dos cohortes principales de pacientes: una primera de infección activa por el SARS-CoV-2 al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), compuesta por una cohorte inicial con 155 pacientes y una de validación con 37 pacientes; y una segunda de respuesta vacunal, compuesta por 52 sujetos de personal sanitario de este mismo hospital, 624 pacientes institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria y 129 pacientes trasplantados hepáticos del HUMV.

Se realizaron técnicas de citometría de flujo para linfocitos de sangre periférica y poblaciones de células B, T, células linfoides innatas (ILC), subpoblaciones de monocitos y células Natural Killer (NK); se determinó la interleucina 6 (IL-6) circulante, la expresión de proteínas de receptores tipo Toll (TLR) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y la respuesta humoral específica frente a la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 (S). También se analizaron diferentes parámetros bioquímicos y se evaluó la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2 mediante citometría de flujo. La evaluación de esta respuesta celular es una

metodología que no estaba implementada en el Servicio de Inmunología del HUMV, por lo que se puso a punto para estos estudios: se cultivaron las células del paciente en presencia de la proteína S, de la nucleocápside (N) y de la membrana (M) del virus, junto con un control positivo y uno negativo sin estímulo.

En la cohorte inicial de pacientes se realizó un análisis de regresión logística multivariante donde se seleccionaron finalmente siete parámetros. La edad, ferritina, dímero D, número absoluto de linfocitos y niveles séricos C4 son variables que se obtienen de análisis clínicos de rutina en el HUMV. Adicionalmente, incluimos dos variables inmunológicas nuevas: el porcentaje de los monocitos no clásicos y el de células CD8+ exhaustas. Con estos datos, desarrollamos un modelo de predicción capaz de identificar al 78,2% de los pacientes con riesgo de enfermedad COVID-19 moderada-grave, con una sensibilidad y especificidad del 71,4 y 72,2%, respectivamente. Posteriormente, estos datos se validaron en una cohorte independiente de 37 pacientes con COVID-19 al ingreso en el HUMV, lo cual permitió establecer un *score* de gravedad con las siete variables seleccionadas para el modelo de predicción de la cohorte inicial, para así categorizar el riesgo de requerimiento de oxigenoterapia de los pacientes. El modelo de validación identificó correctamente al 88% de los pacientes ($p < 0,0001$), con una sensibilidad y especificidad del 88,0 y 83,3%, respectivamente. La identificación de pacientes favorables sin requerimiento de oxígeno en el momento del ingreso en el hospital podría ayudar a los clínicos a prevenir la saturación hospitalaria en futuras olas de COVID-19.

En cuanto a la cohorte de respuesta vacunal, se comprobó que tras las dos dosis de la vacuna el personal sanitario desarrolló una respuesta efectiva. Al mes de la vacunación completa, el 100% de ellos obtuvieron anticuerpos IgG, el 41,5% IgA y el 37,7% IgM. Pasados 9 meses, el 97% de los pacientes reclutados mantuvieron una respuesta humoral de anticuerpos IgG, el 8% de ellos tuvieron anticuerpos IgM y el 3% IgA. La respuesta celular T específica de este grupo de pacientes fue de un 90% tras dos dosis de la vacuna al primer mes de la vacunación, disminuyendo hasta el 39,47% en los pacientes reclutados a los 9 meses. Después del análisis de poblaciones de células T y B, se identificó una posible activación temprana de células T que podría ayudar a que las células B de memoria se diferenciaron en células plasmáticas productoras de anticuerpos para así desarrollar una respuesta protectora.

El grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria mostró una alta tasa de respuesta tras dos dosis de la vacuna. Se comprobó que, tanto por medio de inmunidad humoral o celular T específica, la mayor parte de ellos se encontraban protegidos frente al SARS-CoV-2. A los dos meses de la vacunación completa, el 97,42% respondió a la vacuna sin infección previa por el virus. Mientras que a los seis meses de la vacunación completa, el 92,16% de los sujetos reclutados respondieron a la vacuna sin infección previa.

Por último, en el grupo de pacientes receptores de trasplante hepático, se observó que tras la tercera dosis de la vacuna frente al SARS-CoV-2, seroconvirtieron el 75% de los casos sin inmunidad humoral, reforzando esta respuesta en casi el 98% de ellos.

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. La evaluación de los componentes de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa en sangre en pacientes con infección activa por SARS-CoV-2 permiten obtener biomarcadores pronósticos de la enfermedad COVID-19.
2. Nuestro modelo pronóstico puede ayudar a la gestión de los pacientes al ingreso, mejorando su gestión y categorizando su pronóstico.
3. Sujetos inmunocompetentes desarrollan respuesta inmunitaria completa tras dos dosis de la vacuna.
4. Hay una alta tasa de respuesta vacunal en sujetos inmunosenescentes procedentes de residencias de ancianos.
5. Una tercera dosis homóloga de la vacuna refuerza la respuesta inmunitaria específica frente al SARS-CoV-2 en pacientes con un sistema inmunitario comprometido con inmunosupresión farmacológica.
6. Sujetos sin inmunidad humoral pueden estar protegidos por inmunidad celular: la evaluación de la respuesta celular específica podría ser usada como herramienta para testar la respuesta inmunitaria a la vacuna en aquellos sujetos con defecto de inmunidad humoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En diciembre del año 2019 en Wuhan, China, se informó de la existencia de los primeros casos de pacientes ingresados en el hospital por una neumonía atípica e insuficiencia respiratoria causada por un coronavirus de nuevo origen. Poco después, el 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) alertó sobre el coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), un nuevo coronavirus que desencadenó una Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional, de manera que en febrero de este mismo año y tan solo dos meses después de la aparición de los primeros casos, la enfermedad provocada por el SARS-CoV-2 de 2019 se designó como COVID-19. La rápida expansión por todo el mundo demostró una transmisibilidad altamente eficiente de persona a persona incluso en sujetos asintomáticos (1, 2).

El primer paciente identificado como COVID-19 positivo en España se conoció el 31 de enero de 2020, un caso leve procedente de Alemania identificado en las Islas Canarias. Casi un mes después, el 27 de febrero comenzaron a aparecer multitud de casos que afectaban principalmente a la comunidad de Madrid, País Vasco y Cataluña, que en poco tiempo sufrieron un aumento exponencial hasta que, finalmente, el 11 de Marzo la OMS declaró la COVID-19 pandemia mundial: la mayor crisis sanitaria del siglo veintiuno responsable, hasta la fecha de redacción de este documento, de más de 6,6 millones de muertes en todo el mundo (3, 4).

Durante los primeros meses de pandemia, donde el funcionamiento y peligrosidad de este nuevo virus eran todavía una incógnita, la investigación ha sido, y sigue siendo, clave para resolverla. Se pudo demostrar que la mascarilla y la distancia social, así como el aislamiento temporal, son medidas preventivas que ayudan a controlar la expansión y reducir las infecciones del virus en la población (5). Sin embargo, debido a las limitaciones en las opciones terapéuticas existentes para estos pacientes, cada vez se ponían más esperanzas, trabajo y dedicación en el desarrollo de vacunas eficaces. Numerosos especialistas en multitud de disciplinas redirigieron sus investigaciones en curso para enfocarlas en la enfermedad causada por este coronavirus, empleando todos sus esfuerzos en descubrir y compartir la constante nueva información sobre este patógeno que había revolucionado el mundo (1). Especialmente, el campo de la inmunología cobró tal importancia que el concepto de “inmunidad” hoy en día ya es conocido por gran parte de la población independientemente de su disciplina. De hecho, a pesar de que el estudio inmunológico de las infecciones virales por coronavirus no era una prioridad en la mayoría de laboratorios de investigación, la llegada del SARS-CoV-2 y su rápida expansión por todo el mundo durante el año 2020 ha permitido llevar a cabo estudios

únicos en esta especialidad, avanzando enormemente en el conocimiento de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa humana, y en concreto frente al SARS-CoV-2 (6).

1.2 BROTE DE COVID-19

Los Coronavirus son un tipo de virus pertenecientes a la familia *Coronaviridae*, concretamente a una subfamilia ácido ribonucleico (ARN) monocatenario positivo llamada *Orthocoronavirinae*. A su vez se subdividen en cuatro géneros distintos: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (7). El virión del coronavirus (CoV) presenta en la membrana viral proteínas de la espícula (S o *Spike*), glicoproteínas de tipo I; de la envoltura (E), de carácter hidrofóbico; y de la membrana (M), con un ectodominio N terminal con una cola citoplasmática. Para formar la cápside helicoidal, se encuentra la proteína de la nucleocápside (N) unida al material genético del virus. El virus también tiene otras proteínas accesorias implicadas en distintas funciones y codificadas por varios marcos de lectura abierta (ORF, de sus siglas en inglés) (8).

Estos virus pueden ser muy patológicos para los humanos, causando un amplio espectro de enfermedad: desde resfriados comunes hasta enfermedades respiratorias de mayor calibre. Durante las dos últimas décadas, la población ha experimentado tres brotes principales de Coronavirus pertenecientes al género *Betacoronavirus* (Figura 1) (9): SARS-CoV, el primero que causó el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS, por sus siglas en inglés), descubierto en el año 2002 y, aunque ya se encuentra erradicado, dejó alrededor de 8000 casos con una mortalidad del 10% aproximadamente; MERS-CoV, causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS, por sus siglas en inglés) y, a pesar de ser una epidemia que hoy en día sigue vigente mayormente en la zona de oriente medio, en la actualidad hay menos de 2500 casos diagnosticados y se le atribuyen alrededor de 800 muertes desde su identificación en el año 2012 (10). Por último, en diciembre de 2019 en Wuhan (China), se detectó el SARS-CoV-2 responsable de la enfermedad por coronavirus identificada en este mismo año o COVID-19, término designado por OMS el 11 de febrero de 2020 (1).

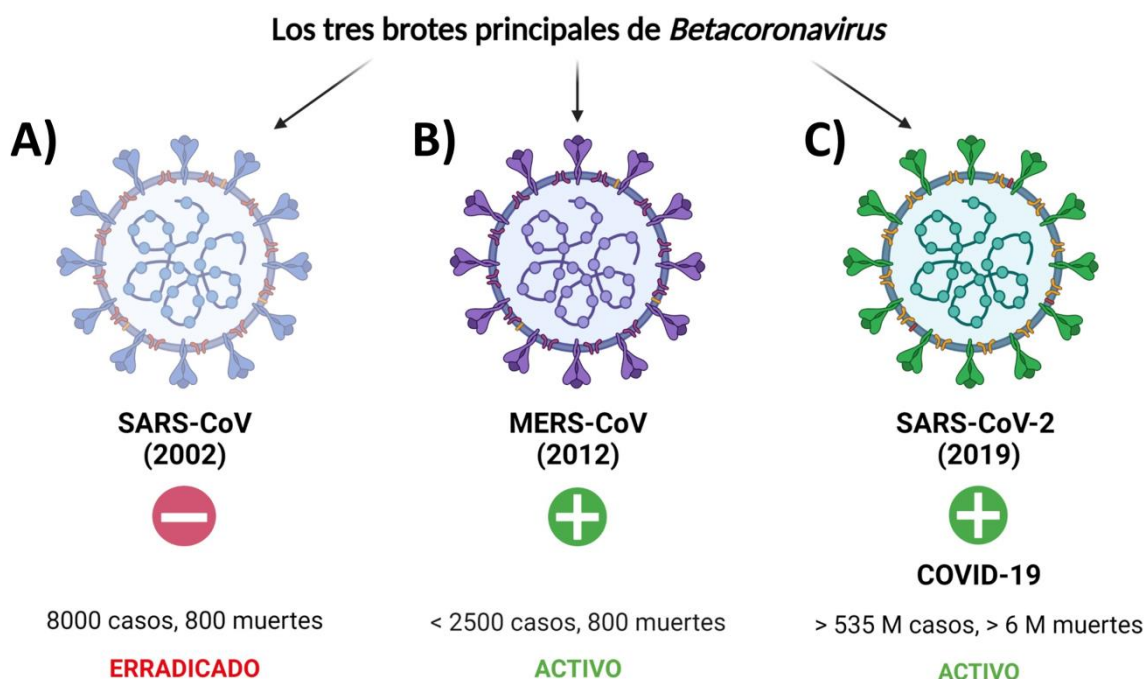


Figura 1. Representación de los tres brotes principales de betacoronavirus en el mundo. El coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo o SARS-CoV ya erradicado (A), el segundo coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo SARS-CoV-2 (C) y el coronavirus causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (B).

La infección por SARS-CoV-2 tiene muchas similitudes con la provocada por SARS-CoV, como el contagio de ambos por vía respiratoria, pero también diferencias: la tasa de transmisión e infectividad del SARS-CoV-2 es mucho mayor y el período de incubación (5,7 días) es el más extenso (1, 11). Debido a esto y a la rápida extensión por todo el mundo de este patógeno viral, el 11 de marzo de 2020 la OMS declaró el estado de pandemia. Todo ello ha supuesto una gran crisis mundial tanto a nivel sanitario como económico, en la que hasta la fecha, se han detectado alrededor de 639 millones de casos de pacientes con COVID-19 y más de 6 millones de muertes causadas por esta enfermedad (1).

1.2.1 SINTOMATOLOGÍA Y GRADOS DE GRAVEDAD

La OMS clasifica a los pacientes con la enfermedad COVID-19 en varias categorías con diferentes grados de gravedad: enfermedad leve; enfermedad moderada, donde el paciente ya presenta neumonía; enfermedad grave, caracterizada por una neumonía de mayor calibre; y por último, enfermedad crítica, donde el paciente puede desarrollar el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (ARDS, de sus siglas en inglés) así como sepsis o incluso shock séptico (12). El ARDS se define actualmente como la principal causa de muerte en pacientes con neumonía provocada por la infección del SARS-CoV-2. Las categorías de enfermedad grave y crítica engloban también complicaciones en otros órganos (13).

Los síntomas más frecuentes de la COVID-19 son fiebre, tos, disnea, producción de esputo, debilidad y fatiga. Síntomas neurológicos como la anosmia, y otros como la mialgia, estornudos, dolor de garganta, rinitis, dolor de cabeza, dolor de pecho y diarrea son también síntomas comunes (14). La sintomatología afecta principalmente a los pulmones y a las vías respiratorias, sin embargo la infección por SARS-CoV-2 es muy heterogénea y de carácter sistémico, afectando también a otros órganos como el corazón (síndrome coronario agudo), el hígado y los riñones. En algunos casos puede incluso haber complicaciones neurológicas, como enfermedades cerebrovasculares agudas, el Síndrome Guillain-Barré, encefalitis y encefalopatías, y linfocitosis hemofagocíticas; y tromboinflamatorias, como son la trombosis y la endotelopatía (15-17). La trombosis venosa, arterial y el embolismo pulmonar son unas de las principales complicaciones de los pacientes con infección por SARS-CoV-2, ya que en según varios estudios casi el 10% de los hospitalizados con COVID-19 las padecían, y se observó en el 79% de los fallecidos por esta enfermedad trombosis arterial pulmonar y microangiopatía. Este tipo de pacientes con coagulopatías se caracterizan por tener niveles elevados de dímero D (17).

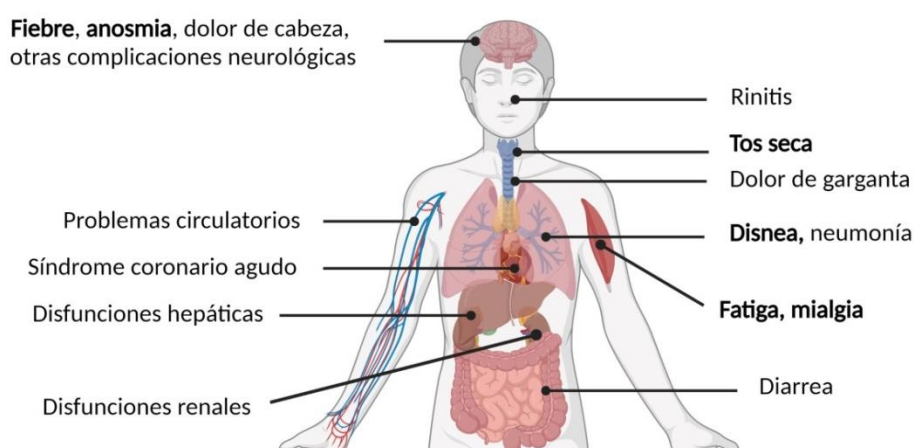


Figura 2. Síntomas de la enfermedad COVID-19 causada por la infección del virus SARS-CoV-2. Los síntomas más frecuentes se muestran en negrita.

Creado con BioRender.com

Aunque la mayoría de los casos de la infección por SARS-CoV-2 se desarrollan de manera asintomática y leve, los cursos más graves, críticos y de *exitus* de la enfermedad suelen corresponder al 10-20% de los pacientes con síntomas, mayormente en la población más envejecida y, especialmente, con comorbilidades asociadas (12). De esta manera, los factores de riesgo descritos que predisponen a un desarrollo más grave de la COVID-19 son: edad avanzada, sexo masculino, fumar y otras comorbilidades crónicas como obesidad, hipertensión, diabetes mellitus de tipo II y diversas enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, respiratorias, renales y malignas (18, 19). Sin embargo, todo apunta a que la heterogeneidad de esta enfermedad está relacionada, más que con el virus en sí, con el entorno y el huésped, siendo este último el

factor más importante en la gravedad de la enfermedad, tasas de infección y consecuencias clínicas a largo plazo (12).

La edad avanzada, la linfopenia y la elevación de los niveles del dímero D, interleucina 6 (IL-6), troponina, ferritina y lactato deshidrogenasa (LDH) se identificaron como parámetros pronósticos de muerte poco después de declararse el estado pandémico por la OMS (20). Estos parámetros fueron seguidamente confirmados alrededor del mundo para identificar pacientes con pronósticos desfavorables (21-26).

1.2.2 PUNTO DE ENTRADA DEL SARS-COV-2

En febrero de 2020 ya se había descubierto el receptor funcional de entrada del SARS-CoV-2 a las células humanas: la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, de sus siglas en inglés) (1). ACE2 se encuentra distribuido por todo el organismo, siendo en el intestino delgado, riñones, corazón, tiroides, testículos y tejido adiposo donde sus niveles son más altos (27). Se observó que la interacción entre el receptor ACE2 y el virus SARS-CoV2 se producía mediante la unión de esta molécula de superficie celular con el dominio de unión al receptor (RBD, de sus siglas en inglés) de la proteína *spike*, proteína empleada por el virus para introducir su material genético a la célula a infectar (28). El SARS-CoV-2 emplea la serina proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2), para la activación o *priming* de la proteína S del virus, y otras proteasas como Neuropilina 1 (NRP1) y furina han sido identificadas como cofactores. De hecho, la furina actúa escindiendo la proteína S en S1 y S2 para activar la maquinaria de fusión de S2 con la membrana de la célula a infectar y permitir la entrada del SARS-CoV-2 (Figura 3) (29). El hecho de que ACE2 y TMPRSS2 estén altamente coexpresados en las células epiteliales nasales, podría explicar la alta tasa transmisibilidad que tiene este patógeno viral. ACE2 junto con esta serina proteasa también se encuentra en los pulmones, concretamente en las células epiteliales alveolares de tipo II (12).

Entrada del SARS-CoV-2 a través de ACE2

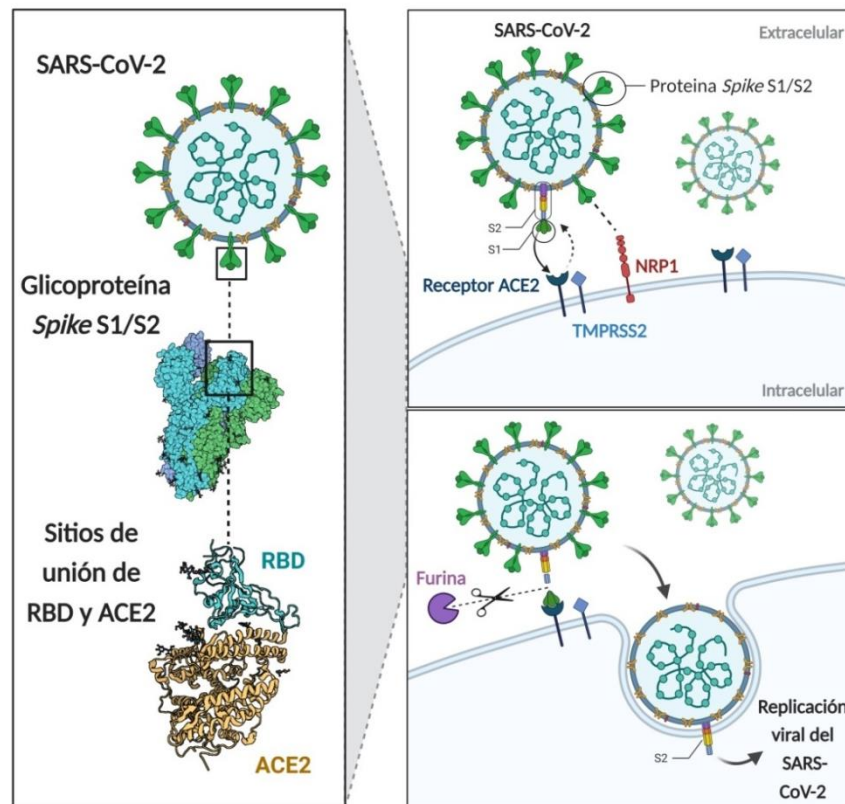


Figura 3. Entrada del virus SARS-CoV-2 en la célula a infectar a través del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Para introducir su material genético en la célula, el SARS-CoV-2 se une a esta molécula de superficie celular mediante el dominio de unión al receptor (RBD, de sus siglas en inglés) de la proteína *Spike* (S) presente en su propia membrana. En esta interacción intervienen también la serina proteasa asociada a membrana TMPRSS2 para la activación o *priming* de la proteína S del virus. Otras proteasas como Neuropilina 1 (NRP1) y furina han sido identificadas como cofactores. La furina actúa escindiendo la proteína S en S1 y S2, de manera que S2 se fusiona con la membrana de la célula permitiendo la entrada del SARS-CoV-2 al interior celular.

Creado con BioRender.com

1.2.3 EVOLUCIÓN GENÉTICA Y VARIANTES DEL SARS-COV-2

Al igual que otros virus de ARN, el SARS-CoV-2, también se ha ido adaptando a sus huéspedes y ha evolucionado genéticamente desde su identificación en diciembre de 2019. Dentro de los virus causantes del SARS, se han identificado dos cepas con diferentes características: SARS-CoV y SARS-CoV2. A su vez, en una cepa podemos distinguir diferentes variantes o genomas que difieren en la secuencia. Una variante puede tener varios cambios en la secuencia o mutaciones en su genoma (30).

A partir de la cepa de SARS-CoV-2 se han ido identificando diferentes variantes con distintas mutaciones. Sin embargo, no todas ellas han tenido características como un aumento de transmisibilidad o cambio epidemiológico; un aumento de virulencia o diferente clínica; o una disminución de la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o de los medios de diagnóstico, vacunas y tratamientos. Es por ello, que no todas han sido consideradas por la OMS como **Variantes de Preocupación** (VOC, de sus siglas en inglés) (31). Durante los primeros meses de pandemia, el SARS-CoV-2 no tuvo prácticamente signos de evolución genética, excepto una variante con la mutación D614G que debido a una transmisibilidad superior se distribuyó de manera global; sin embargo, la gravedad de la infección no se vio afectada. Seguidamente se identificó en Dinamarca otra variable que no aumentó el nivel de transmisión. A partir de aquí hasta la actualidad, se describieron múltiples variantes, de las cuales, la OMS ha considerado como VOC las siguientes (Figura 4):

- **Alpha** (linaje B.1.1.7): Identificada en el Reino Unido a finales de Diciembre de 2020. Tiene 17 mutaciones diferentes.
- **Beta** (linaje B.1.351): Identificada en Sudáfrica en Diciembre de 2020. Tiene 9 mutaciones diferentes.
- **Gamma** (linaje P.1): Identificada en Brasil a principios de enero de 2021. Tiene 10 mutaciones diferentes.
- **Delta** (linaje B.1.617.2): Identificada en India en Diciembre de 2020. Tiene 10 mutaciones diferentes.
- **Ómicron** (linaje B.1.1.529): Identificada en Sudáfrica en Noviembre de 2021. Tiene más de 30 mutaciones diferentes.

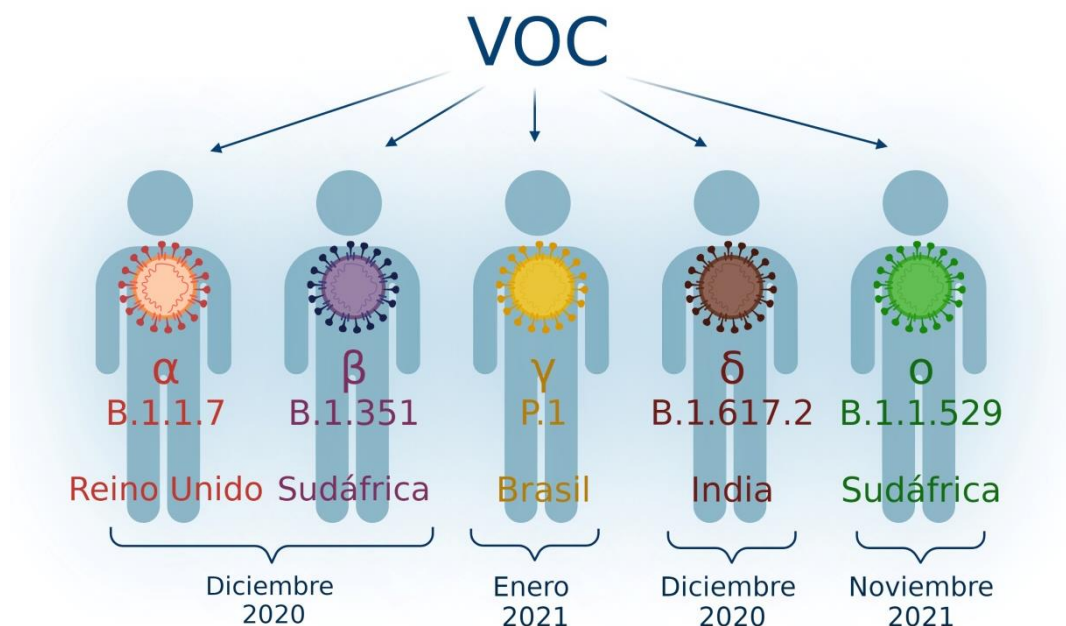


Figura 4. Variantes de preocupación del SARS-CoV-2 en el mundo. Desde el inicio de la pandemia se han descrito variantes del SARS-CoV-2 con diferentes características a medida que el virus se ha ido adaptando entre la población mundial. Sin embargo, solo algunas de ellas se han considerado Variantes de Preocupación (VOC, de sus siglas en inglés) por la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a su impacto en la salud pública global: alfa (α), pertenece al linaje B.1.1.7, primeros casos identificados en el Reino Unido en diciembre 2020; beta (β), linaje B.1.351, primeros casos en Sudáfrica en diciembre de 2020; gamma (γ), linaje P.1, primeros casos en Brasil en enero de 2021; delta (δ), linaje B.1.617.2, primeros casos en India en diciembre de 2020; y Ómicron (o), linaje B.1.1.529, primeros casos en Sudáfrica en Noviembre de 2021.

Creado con BioRender.com

Las variantes Alpha, Beta y Gamma tienen en común mutaciones que contribuyen a que el virus se propague más fácilmente. Otras mutaciones identificadas en las variantes de Beta y Gamma pueden afectar a la respuesta de anticuerpos producida por nuestro organismo. La variante Delta, posee otras mutaciones específicas que la ayudan a propagarse de una manera mucho más fácil. Por último, la variante Ómicron está caracterizada por más de 30 mutaciones en la proteína S que contribuyen a que pueda evadir la protección proporcionada por las vacunas (32).

Otras variantes del SARS-CoV-2 que, a lo largo de la pandemia, han presentado cambios en el genoma que pueden predecir que afectarán a la transmisión, el diagnóstico, los tratamientos o el escape inmunitario; han sido la causa de un aumento de la proporción de casos y han tenido una prevalencia y una expansión limitada. La OMS las ha caracterizado como **Variantes de Interés** (VOI, de sus siglas en inglés), y son las 8 siguientes: **Epsilon** (linaje B.1.427 y B.1.429), **Zeta** (linaje P.2), **Eta** (linaje B.1.525), **Theta** (linaje P.3), **Iota** (linaje B.1.526), **Kappa** (linaje B.1.617.1), **Lambda** (linaje C.37) y **Mu** (linaje B.1.621) (31, 32).

1.2.4 OPCIONES TERAPÉUTICAS DE LA COVID-19: FÁRMACOS Y VACUNAS

Hay varios fármacos para tratar la infección causada por el SARS-CoV-2 que se encuentran aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, de sus siglas en inglés) o con la Autorización de Uso por Emergencia (EUA, de sus siglas en inglés). Antivirales como remdesivir, aprobado por la FDA, actúa inhibiendo la polimerasa viral. También se encuentran aprobados fármacos inhibidores de citocinas, como tocilizumab que inhibe la IL-6 y es útil en una fase temprana de la enfermedad dependiendo de los niveles de IL-6; y otros que inhiben la producción de estas moléculas interfiriendo con la señalización inflamatoria, como un inhibidor de la Janus cinasa 1 – Janus cinasa 2 (JAK1-JAK2) llamado baricitinib. Múltiples antivirales, como la cloroquina e hidroxicloroquina, interferón y otros; y varias terapias inmunomoduladoras entre ellas, la dexametasona, siguen bajo estudio para probar su eficacia frente a la COVID-19 (8). Aun así, la dexametasona ha sido un corticoide decisivo y se ha usado ampliamente de manera rutinaria en pleno auge de la pandemia de COVID-19. Bajas dosis de este fármaco han reducido la reacción inflamatoria desbordada provocada por la infección del SARS-CoV-2, disminuyendo la mortalidad en pacientes con pronóstico grave. Sin embargo, no ha tenido efecto en pacientes con pronóstico más leve e incluso ha tenido efectos nocivos en algunos casos, como su administración a dosis altas y en pacientes que no necesitaban soporte de oxígeno (33).

Para reducir la inflamación se ha utilizado una combinación de baricitinib y tocilizumab junto con esteroides sistémicos. También se ha comprobado que la administración de remdesivir junto con baricitinib es una combinación mucho más efectiva que este fármaco en solitario (8).

Más recientemente se han desarrollado otros fármacos antivirales que inhiben la replicación de forma específica del virus. Lagevrio® es un fármaco llamado molnupiravir al que se le ha prestado especial atención, dado que además de inhibir la replicación del SARS-CoV-2, lo elimina rápidamente, reduce la carga viral y facilita una recuperación rápida del paciente (34). Por otro lado, también tenemos el Paxlovid®: una combinación de nirmatrelvir, un inhibidor de una proteasa implicada en la replicación viral; junto con ritonavir, un inhibidor del citocromo P450 3A4 utilizado convencionalmente para potenciar la inhibición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La coadministración de ambos fármacos tiene como objetivo aumentar las concentraciones de nirmatrelvir en suero potenciando su efecto terapéutico (35). Estos fármacos han demostrado ser seguros y efectivos reduciendo la mortalidad y las tasas de hospitalización en pacientes con COVID-19, además de no aumentar la aparición de efectos adversos. Aun así, se encuentran todavía bajo estudio, pero los datos hasta ahora parecen indicar que tienen un gran potencial para convertirse en terapias prometedoras frente a la COVID-19 (34).

En marzo de 2020 se comprobó que la infección por el SARS-CoV-2 inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes: se aislaron anticuerpos específicos de la región RBD de la proteína S del virus en individuos infectados. En este momento, fue también cuando empezaron a estar disponibles diferentes test comerciales que detectaban anticuerpos específicos del SARS-CoV-2. La proteína S comenzó a ser la diana principal para el desarrollo de las vacunas de la COVID-19, que pasaron de concepto a realidad en apenas 10 meses desde el inicio de la pandemia: hecho histórico para la ciencia, y en especial para la inmunología (8). Los tipos de vacuna son variados y han demostrado gran seguridad y eficacia (36-40). En especial, las vacunas de ARN mensajero (ARNm), como las desarrolladas por las farmacéuticas Pfizer y Moderna, nunca se habían utilizado en humanos hasta este momento (41). Otros tipos de vacunas han sido de vectores virales (adenovirus), virus inactivados y subunidades de proteínas. A día de hoy la OMS y FDA han autorizado o dejado pendiente las siguientes vacunas (42):

Tabla 1. Fabricante, nombre, tipo y dosis necesarias de las vacunas de COVID-19 aprobadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y con Autorización de Uso por Emergencia (EUA).

<i>Fabricante</i>	<i>Nombre de la vacuna</i>	<i>Tipo de vacuna</i>	<i>Dosis</i>
Pfizer/BioNTech	BNT162b2	ARNm	Dos. 21-28 días entre dosis.
Moderna	ARNm-1273	ARNm	Dos. 28 días entre dosis
AstraZeneca/Oxford	AZD1222 Vaxzevria	Vector adenovirus (CHAdOx1)	Dos. 4-12 semanas entre dosis.
Serum Institute of India	COVISHIELD	Vector adenovirus (CHAdOx1)	Dos. 4-12 semanas entre dosis.
Janssen (Johnson & Johnson)	Ad26.COVS.2	Vector adenovirus de tipo 26	Una sola dosis
SinoPharm / Beijing Institute of Biological Products (BIBP)	Covilo / BBIBP-CorV	Coronavirus completo inactivado	Dos. 21-28 días entre dosis.
Sinovac	CoronaVac	Coronavirus completo inactivado	Dos. 14-28 días entre dosis.
Bharat Biotech, India	COVAXIN	Coronavirus completo inactivado	Dos. 28 días entre dosis
Novavax	NVX-CoV2373 / Nuvaxovid	Subunidad de proteína	Dos. 21-28 días entre dosis.
Serum Institute of India	NVX-CoV2373 / Covovax	Subunidad de proteína	Dos. 21-28 días entre dosis.

De esta manera, el 16 de marzo de 2020 comenzó el primer ensayo clínico en fase I de la vacuna de la COVID-19 ARNm-1273: una vacuna de ARNm frente a la proteína S desarrollada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, de sus siglas en inglés) y la compañía estadounidense biotecnológica y farmacéutica Moderna (43). Pfizer y BioNTech anunciaba en mayo el comienzo de las fases I y II del ensayo clínico de su vacuna BNT162b2 también de ARNm (44). Fue el 9 de Noviembre cuando Pfizer/BioNTech

anunciaba que su vacuna BNT162b2 tenía una eficacia mayor del 90% (45). Pocos días después, Moderna anunciaba que la eficacia de su vacuna mRNA-1273 era del 94% (46). En diciembre de este mismo año, AstraZeneca en colaboración con la Universidad de Oxford, anunciaba que su vacuna ChAdOx1, que utiliza un adenovirus como vector viral, tenía una eficacia del 70% (38). Entre diciembre y enero de 2020 estas tres vacunas de Pfizer/BioNTech, Moderna y AstraZeneca fueron autorizadas para su uso en los Estados Unidos de América (EE.UU), Reino Unido y Europa (1). A finales de Enero vacunas como Ad26.CoV2.S de Janssen y NVX-CoV2373 de Novavax en el Reino Unido mostraron una eficacia del 66% y del 89,3%, respectivamente (47, 48). Otras vacunas como Sputnik V de *The Gamaleya National Center* y Ad5-nCoV de CanSinoBio aún no han sido aprobadas por la OMS ni tienen la EUA. Sin embargo, se han administrado en Rusia y China entre noviembre y diciembre de 2020 antes de que los datos de la fase III estuvieran disponibles. Ambas vacunas utilizan vectores virales: Sputnik V, vector de adenovirus humano; y Ad5-nCoV, vector tipo 5 de adenovirus (49, 50).

Además de las vacunas, se emplearon otras estrategias de protección pasiva frente a la COVID-19, como el uso de plasma hiperinmune o anticuerpos monoclonales neutralizantes. Los pacientes recuperados de la infección pueden someterse a aféresis para obtener plasma de convalecencia con títulos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 elevados, el cual se administró a pacientes con COVID-19 grave y crítico reduciendo la mortalidad en algunos casos (51). La administración temprana de plasma hiperinmune se ha considerado como un enfoque terapéutico en esta enfermedad, sin embargo, es necesario confirmar estos beneficios con futuros estudios, sobre todo en pacientes de alto riesgo (52). Por otro lado, también se utilizaron diversos anticuerpos monoclonales neutralizantes frente a la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 como terapia en pacientes con COVID-19, como tixagevimab y cilgavimab (Evusheld®), el primer *cocktail* diseñado no solo para el tratamiento de la enfermedad, si no también como profilaxis (53). La combinación de otros anticuerpos monoclonales como casirivimab e imdevimab (Ronapreve®), y Sotrovimab (Xevudy®) se emplearon para tratar la infección viral provocada por el SARS-CoV-2 (54, 55).

1.3 RESPUESTA INMUNITARIA

La respuesta inmunitaria es la que dirige todo tipo de respuesta inflamatoria en patologías humanas infecciosas. En cada tipo de proceso, la respuesta se dirige hacia una rama u otra de un sistema inmunitario muy complejo y, además, la respuesta es plástica y varía durante las distintas fases de la enfermedad. La respuesta inmunitaria se compone principalmente de dos señales. En la **primera señal**, la célula presentadora de antígeno (APC, de sus siglas en inglés) reconoce el patrón molecular asociado a patógeno o a peligro (PAMP o DAMP, de sus siglas en inglés, respectivamente) gracias a su receptor de reconocimiento de patrones (PRR, de sus siglas en inglés), presente en este tipo de células fagocíticas. Esto

produce que la APC se active, produzca citocinas e interiorice al patógeno para eliminarlo, y adicionalmente, que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de sus siglas en inglés) de la membrana de esta célula presente un péptido de ese patógeno. Por consiguiente, el antígeno es presentado por el MHC a células de la respuesta adaptativa, concretamente a las células T, que lo reconocen gracias a su receptor (TCR) y son activados. Sin embargo, es necesaria una **segunda señal** para completar el proceso. Esta segunda señal se caracteriza por su capacidad de coestimulación, y la función de la APC es expresar unas moléculas coestimuladoras llamadas B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) que, en una fase inicial de estimulación de la respuesta inmunitaria se unirán a una molécula de las células T denominada CD28. Por el contrario, en una fase de retracción de la respuesta, estas moléculas coestimuladoras se unirán al antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), movilizándolo por su mayor afinidad por B7-1 y B7-2. La respuesta inmunitaria se encuentra regulada por un balance entre señales coestimuladoras y coinhibitorias (56, 57) (Figura 5).

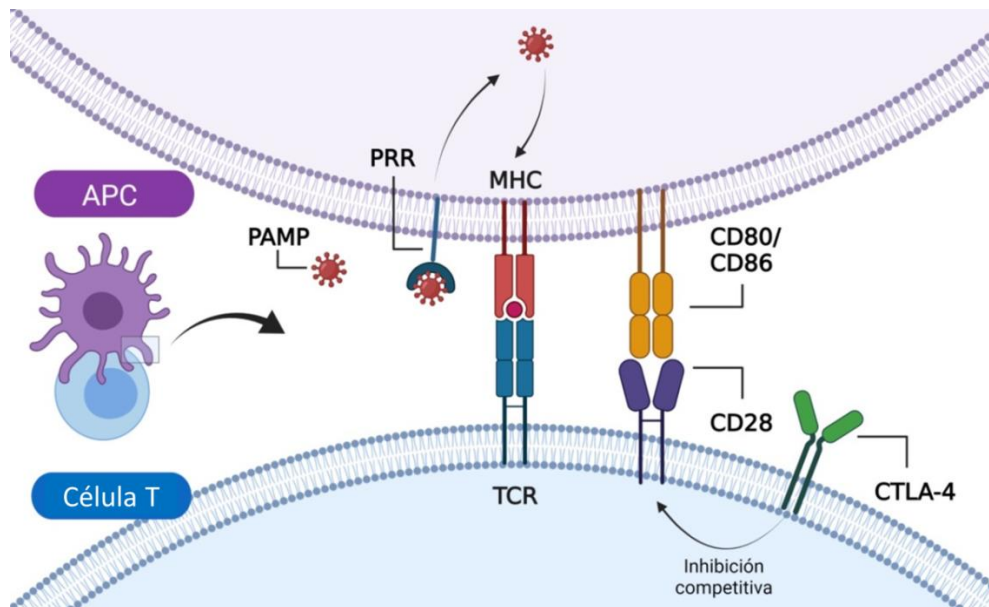


Figura 5. Primera y segunda señal de la respuesta inmunitaria frente a un patógeno. En una primera señal, la célula presentadora de antígenos (APC) reconoce por medio de su receptor de reconocimiento de patrones (PRR) al patrón molecular asociado al antígeno o a peligro (PAMP o DAMP). A continuación, la APC se activa y procesa el patógeno para proceder a su presentación antigénica a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Este antígeno es reconocido por el receptor del linfocito T (TCR). Para completar la respuesta, en una segunda señal, la APC expresa unas moléculas coestimuladoras (CD80 o CD86) que se unirán, en una fase de estimulación de la respuesta inmunitaria, a la molécula CD28 del linfocito T; y en el caso de retracción de la respuesta, al antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), enviando una señal de inhibición al TCR correspondiente.

Creado con BioRender.com

A continuación, como ocurre en la infección natural por el SARS-CoV-2 y después de que se activen y coestimulen las células T, un subtipo específico denominado células T foliculares colaboradoras (T_{FH}), tras reconocer este antígeno viral inducen a que las células B maduras naïve se desarrollen a células B “unswitched” para a continuación, alcanzar el estado de célula B memoria *switched* (SwM). Finalmente, la célula B madura folicular resultante continúa su maduración a células B memoria de larga vida o a células plasmáticas productoras de anticuerpos que anidarán en la médula ósea y lucharán contra una reinfección (37).

1.3.1 RESPUESTA INMUNITARIA INNATA ANTI-VIRAL

La respuesta inmunitaria innata es la primera línea de defensa contra las infecciones virales y la variabilidad de sus componentes interviene en la determinación de pronósticos muy heterogéneos. Este tipo de respuesta aparte de limitar la entrada viral, replicación y ensamblaje, también identifica y elimina células infectadas, facilitando así también el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa, más específica, que tendría lugar a continuación y se detalla más adelante. Sin embargo, es necesario puntualizar que una respuesta excesiva podría provocar una inflamación sistémica desmedida con una tormenta de citocinas que podría desembocar en complicaciones más graves. La respuesta inmunitaria innata anti-viral comienza con el reconocimiento del virus mediante los PRRs, siendo unos de los más estudiados los receptores tipo Toll (TLR), en concreto los especializados en el reconocimiento de estructuras virales. En esta primera etapa de la respuesta inmunitaria hay muchas oportunidades para identificar componentes virales, especialmente durante la entrada viral y durante su replicación. Intervienen muchos tipos celulares, como son los neutrófilos, macrófagos, monocitos, células dendríticas (DC, de sus siglas en inglés), células Natural Killer (NK) y las células linfoides innatas (ILC, de sus siglas en inglés) (8, 12). De estas últimas, hay estudios preliminares que relacionan su disminución en la mucosa epitelial con casos graves de COVID-19, mientras que un aumento del subtipo dos de estas células (ILC2) se atribuye a un mejor pronóstico y recuperación (58). Estos tipos de células tienen PRRs que se unirán a los PAMPs o DAMPs activando diversas vías de señalización y favoreciendo un ambiente inflamatorio en respuesta, en nuestro caso, a la infección por el SARS-CoV-2. Se ha observado que varias familias de PRRs responden frente a esta infección viral, como son los TLRs, los receptores de tipo RIG-I (RLRs, de sus siglas en inglés), los receptores de tipo NOD (NLRs, de sus siglas en inglés) e inflamasomas. Componentes del sistema inmunitario innato como el interferón (IFN, de sus siglas en inglés) y el sistema del complemento, juegan un papel decisivo en la respuesta frente al SARS-CoV-2 (8).

1.3.1.1 Receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) y tormenta de citocinas

Aunque los **TLRs** son uno de los PRRs más estudiados, su implicación en la activación del sistema inmunitario innato por infecciones virales aún se encuentra en proceso de estudio. Estos receptores se expresan a lo largo del tracto respiratorio humano (8), y utilizan principalmente dos moléculas adaptadoras para transducir sus señales (Figura 6): el adaptador de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y el adaptador con dominio TIR inductor de interferón β (TRIF, de sus siglas en inglés). Los TLRs se expresan de manera diferente en las células inmunitarias innatas y la mayor parte de ellos tienen una señalización mediada por MyD88; aunque TLR3, presente en células NK, utiliza exclusivamente TRIF. TLR4, frecuente en macrófagos, es la excepción ya que puede transducir sus señales mediante ambas moléculas. La señalización por TRIF participa en la activación del IFN e induce factores de transcripción dependientes de TLR3 y TLR4, varios de ellos con actividad antiviral. La señalización por medio de MyD88 desencadena la activación de moléculas como el factor nuclear κB (NF- κB , de sus siglas en inglés), proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK, de sus siglas en inglés) y factores reguladores de IFN (IRFs, de sus siglas en inglés); estas moléculas una vez translocadas al núcleo pueden activar diversas citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF, de sus siglas en inglés), IL-6 e IL-1, así como otros sensores inmunitarios innatos que ayudarán a crear este ambiente de inflamación (59).

Otros tipos de receptores TLR, como el TLR2, detectan directamente la proteína de la envoltura del SARS-CoV-2 contribuyendo a la inflamación en curso (60). TLR1, TLR6, y especialmente TLR4, podrían intervenir también en respuestas inflamatorias dependientes de citocinas al unirse a la proteína S del virus (61). Estos dos receptores son capaces de reconocer ARN monocatenario (ARNss) localizado en genomas de coronavirus para iniciar las respuestas de interferón (IFN, de sus siglas en inglés) I y III, las cuales han sido detectadas en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, de sus siglas en inglés) de infectados por el SARS-CoV-2 y su función es limitar la infección viral mediante la producción de diferentes mediadores proinflamatorios (62).

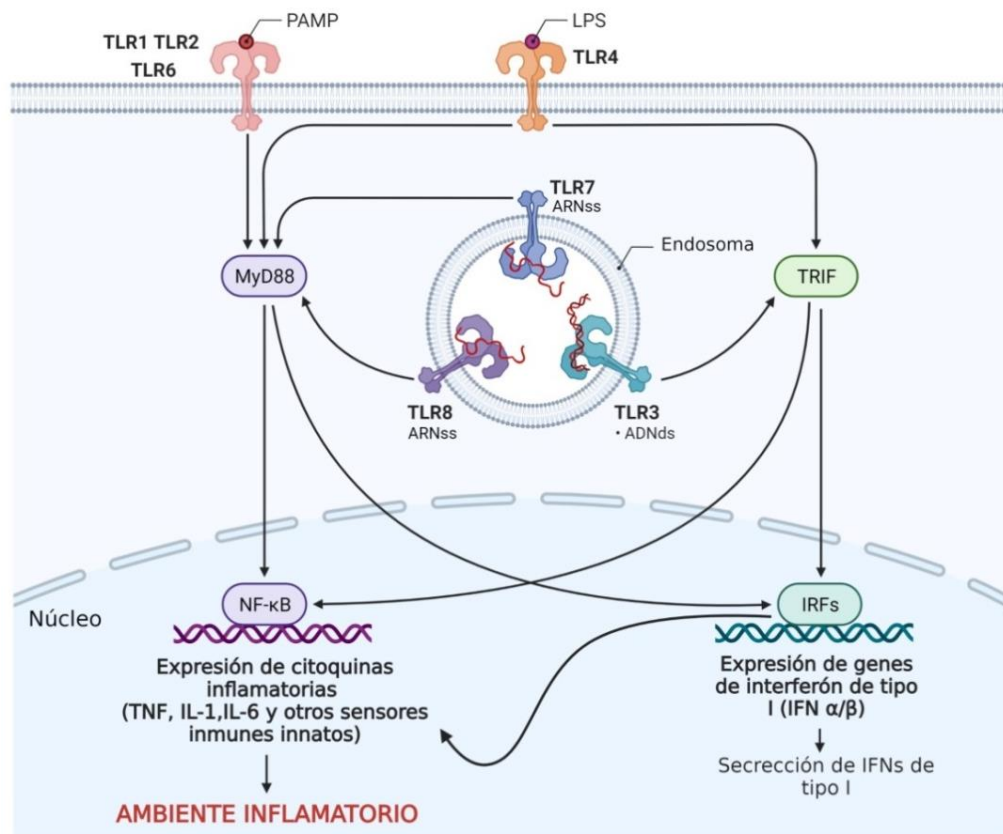


Figura 6. Vías de señalización de los receptores extracelulares TLR1, TLR2, TLR6 y TLR4; y de los receptores intracelulares TLR3, TLR7 y TLR8. La mayoría de ellos tienen una señalización mediada por la proteína MyD88, excepto TLR3 que utiliza exclusivamente el adaptador TRIF, y TLR4 que utiliza ambas vías de señalización. La señalización por TRIF participa en la secreción del IFN de tipo I y la señalización por MyD88 desencadena la activación de NF-κB, de esta manera ambas moléculas una vez en el núcleo participan en la producción de diversas citocinas inflamatorias y otros sensores inmunitarios innatos para así favorecer la inflamación. Abreviaturas: TLR, Receptor de tipo Toll; LPS, lipopolisacárido; PAMP, Patrón Molecular Asociado a Antígeno; ARNss, ácido ribonucleico monocatenario; ADNds, ácido desoxiribonucleico bicatenario; MyD88, proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; TRIF, interferón β inductor de adaptador que contiene el dominio TIR; TNF, Factor de Necrosis Tumoral; IL, Interleucina; IRFs, Factores Reguladores de Interferón; IFN, Interferón.

Creado con BioRender.com

Otro grupo de PRRs, los **NLRs** también responden al SARS-CoV-2 produciendo IFN-I y citocinas proinflamatorias. En concreto, una de las subfamilias de estos receptores es la de receptores tipo NOD con un dominio de pirina (NLRP, de sus siglas en inglés), donde particularmente, el sensor NLRP3 es capaz de unirse a los PAMPs/DAMPs y de esta manera formar el inflamasoma NLRP3. Estos inflamasomas se encuentran en monocitos y tejidos pulmonares de pacientes con infección por SARS-CoV-2, donde por medio de las caspasas, convierten las pro-citocinas en citocinas inflamatorias como IL-1β e IL-18, contribuyendo así a la inmunopatología de la COVID-19. Varias proteínas del virus, como la N y la S, contribuyen a la activación del inflamasoma NLRP3 y a la producción de citocinas inflamatorias (8, 10, 63).

Se ha comprobado que varios **RLRs**, como el receptor RIG-I, la proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma (MDA5, de sus siglas en inglés) y el correceptor LGP2, se unen al RNA del SARS-CoV-2. Se ha visto que estos RLRs son claves en la regulación de la señalización del IFN: pueden generar genes estimulados por IFN (ISGs, de sus siglas en inglés) e inhibir la replicación viral. Sin embargo, el ajuste de la respuesta de IFN es un proceso delicado que debe mantenerse en equilibrio para evitar efectos nocivos en el huésped (64-66).

La infección causante de la COVID-19 desencadena un aumento de citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- β , IFN- γ e IL-17) que ayudan en la eliminación viral y trabajan para mantener el equilibrio (67). Sin embargo, si esta producción se desregula produciendo más moléculas proinflamatorias de las necesarias, se desencadena una **tormenta de citocinas** que puede provocar daño multiorgánico mediado por una muerte celular inflamatoria, donde se activan procesos como la piroptosis, apoptosis y necroptosis (PANoptosis). De hecho, dos citocinas clave, como son IFN- γ y TNF, son capaces de desencadenar PANoptosis en COVID-19 (68). Adicionalmente, cabe mencionar que casos de COVID-19 grave se han visto caracterizados por un aumento de los niveles de TNF en centros germinales, limitando la maduración de células B, cambio de isotipo y maduración de anticuerpos; impidiendo con ello un pronóstico favorable del paciente (69).

1.3.1.2 Respuesta a interferón (IFN)

El interferón es un elemento clave en la defensa inmunitaria innata. En el caso de la infección por el SARS-CoV-2, la célula detecta el ARN viral en el citosol y seguidamente se activa la síntesis del IFN, que actúa de dos maneras para conferir protección: en el interior celular, impide la replicación del virus inhibiendo la síntesis de proteínas, lo que desencadena la muerte de la célula o apoptosis; y por otro lado, es liberado al exterior celular para actuar en las células vecinas, las cuales activan genes para conferir resistencia a la infección (70, 71).

Sin embargo, el IFN es un arma de doble filo en la COVID-19: protege ayudando a eliminar al virus en la fase aguda de la infección, pero también puede tener el efecto contrario en casos más graves de la enfermedad donde la respuesta de IFN-I se retrasa, manteniendo un ambiente inflamatorio y unas condiciones que no favorecen la resolución de la infección (Figura 7) (10). El IFN-II (subtipo γ) es principalmente producido por células T y células NK, para así modular la inmunidad adaptativa y la inflamación, y aunque también tiene actividad anti viral, el subtipo de IFN que se encuentra más relacionado con este proceso es el IFN-I (subtipos α y β) (1, 72). El SARS-CoV-2 tiene mecanismos de evasión de la respuesta que pueden inhibir la producción de estas proteínas: se ha observado que algunos pacientes con pronóstico grave tenían auto-

anticuerpos neutralizantes frente al IFN-I (73) y mientras que otros tenían mutaciones en la señalización e inducción del IFN-I (74).

Se han encontrado respuestas retrasadas y persistentes de IFN por largos períodos de tiempo y sin resolución en pacientes con mal pronóstico de COVID-19, mientras que en pacientes con un pronóstico moderado o leve la respuesta a IFN había sido temprana y efectiva (Figura 7) (10).

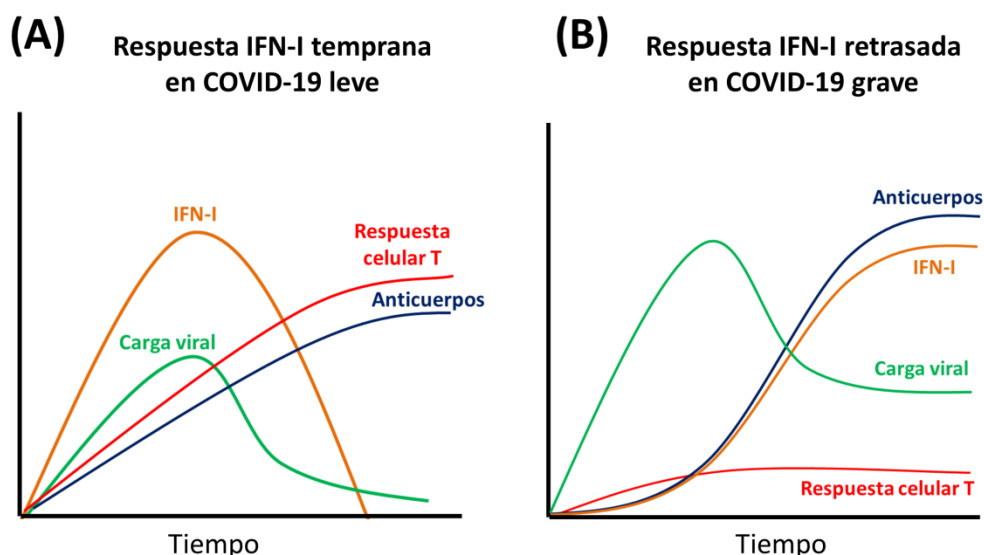


Figura 7. Respuesta a IFN-I temprana y retrasada en COVID-19 leve y grave. El momento de acción del interferón de tipo I (IFN-I) puede controlar la inmunidad y ser decisivo para el pronóstico del paciente en la infección por SARS-CoV-2. En la imagen (A) se observa el supuesto caso de una respuesta temprana de IFN-I propia de los casos más leves y adultos jóvenes, caracterizada por una eliminación viral rápida y buenas respuestas de células T y B. Mientras que en la imagen (B) se puede observar el caso de una infección grave debida a una respuesta tardía de IFN característica de adultos de mayor edad. En este caso la carga viral solo se reduce de manera parcial favoreciendo la expansión viral, y aunque la respuesta de células B sea adecuada, nos encontramos con una marcada linfopenia incapaz de resolver eficazmente la infección sin complicaciones.

Figura adaptada de Carvalho T, et al. (1).

Parece ser de vital importancia para la evolución del paciente llevar un control preciso de la terapia con IFN, debido a que su respuesta en el pico de replicación viral es peligrosa. Hay estudios que sugieren que niveles de IFN de tipo I y III en las vías respiratorias de pacientes con COVID-19 durante un período agudo tardío, pueden desencadenar un mal pronóstico al inhibir la regeneración del epitelio pulmonar (10); adicionalmente, estudios en ratones observaron que la administración de IFN en el pico de replicación viral activaba macrófagos y monocitos contribuyendo a la inmunopatología del IFN (75). Apoyando estos hallazgos, en otros estudios se ha observado que la profilaxis con IFN previa a la infección y en los momentos iniciales protegió contra las formas graves de la enfermedad. De este modo, los estudios

parecen indicar que el momento de la administración de la terapia con IFN es clave para determinar el éxito o fracaso del tratamiento (8, 10).

1.3.1.3 Sistema del complemento

El sistema del complemento es un complejo inmunitario bien conservado de proteínas que actúan en cascada detectando y eliminando patógenos y antígenos extraños. Este complejo proteico forma parte de la respuesta inmunitaria innata humoral y tiene función protectora al comienzo de la respuesta inmunitaria viral frente al SARS-CoV-2 (76). Sin embargo, al igual que el IFN, parece que es también clave en la patogenia de la COVID-19: es crucial que no se desregule ni se prolongue su acción en el tiempo. Altos niveles de proteínas del sistema del complemento como C5a y el complejo de ataque a membrana (MAC, de sus siglas en inglés) funcionan como marcadores de gravedad en la COVID-19, siendo especialmente los niveles de C3 un factor de riesgo de muerte (77, 78).

El SARS-CoV-2 es capaz de activar el sistema del complemento por cualquiera de sus tres vías de señalización. La vía clásica, se inicia por anticuerpos anti-S; la vía de las lectinas, por colectinas, ficolinas y lectinas de unión a manosa (MBLs, de sus siglas en inglés) que reconocen también la proteína N además de la S; y la vía alternativa, se desregula porque la proteína S se une al heparán sulfato compitiendo con un regulador negativo de la activación del complemento: el factor H (78-80). Todo esto, puede causar endotelopatía y tromboinflamación, relacionando la activación del complemento con las lesiones vasculares y la hipercoagulabilidad propias de la enfermedad COVID-19 (17).

Fármacos inhibidores de la vía clásica y en concreto del factor C5, como eculizumab, han disminuido complicaciones tromboembólicas en pacientes con COVID-19 (81). Adicionalmente, es posible que el sistema del complemento pueda estar implicado en los trombos asociados a ciertas vacunas. Finalmente, cabe decir que los beneficios de la terapia frente al sistema del complemento en la infección por SARS-CoV-2 dependen de la gravedad de la infección, del momento de inicio de la terapia y de si se están administrando otros fármacos al mismo tiempo. Sin embargo, todavía no hay evidencias claras que aseguren el empleo de este tipo de fármacos en pacientes con COVID-19 grave (17).

1.3.2 RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA

La respuesta inmunitaria adaptativa se define por ser una respuesta mucho más específica y dirigida que la respuesta inmunitaria innata. La interacción entre células APC y células T facilita el reconocimiento de patógenos activando vías efectoras para su eliminación. También es la responsable de la generación de memoria inmunológica para reconocer y combatir más eficazmente el patógeno si se presenta por segunda vez. Es una respuesta esencial a la hora de regular la homeostasis inmunitaria (82).

La respuesta inmunitaria innata y adaptativa no son independientes, si no que van de la mano: una respuesta innata eficaz con la involucración de la respuesta del IFN-I, así como la carga viral presente, serán factores determinantes para el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa y la eliminación viral. Se ha observado en pronósticos graves de pacientes con infección por SARS-CoV-2 una carga viral aumentada que se reducía solo parcialmente debido a una respuesta tardía del IFN, manteniendo en el tiempo el ambiente inflamatorio característico de las infecciones agudas. A pesar de que la respuesta de anticuerpos se mantuviese elevada en este tipo de pacientes, también se ha detectado una profunda linfopenia definiendo una respuesta celular T pobre (1) (Figura 7). Una respuesta temprana de células T es esencial para el control de la infección. De hecho, un aumento de la respuesta de células T CD8⁺ está relacionado con un desarrollo leve de la infección y buen pronóstico (83). También, disponer de células B memoria que reconozcan el patógeno y sean capaces de producir una respuesta de anticuerpos rápida y eficaz, ofrecen una inmunidad protectora y son importantes para que el paciente tenga un pronóstico favorable (84). Hay enfermos con infección por SARS-CoV-2 en los que la activación tanto de células T como de B parece estar desproporcionada, caracterizando los casos graves de COVID-19, con un ambiente hiperinflamatorio, manifestaciones clínicas graves y una respuesta inmunitaria adaptativa desregulada (85) (Figura 8).

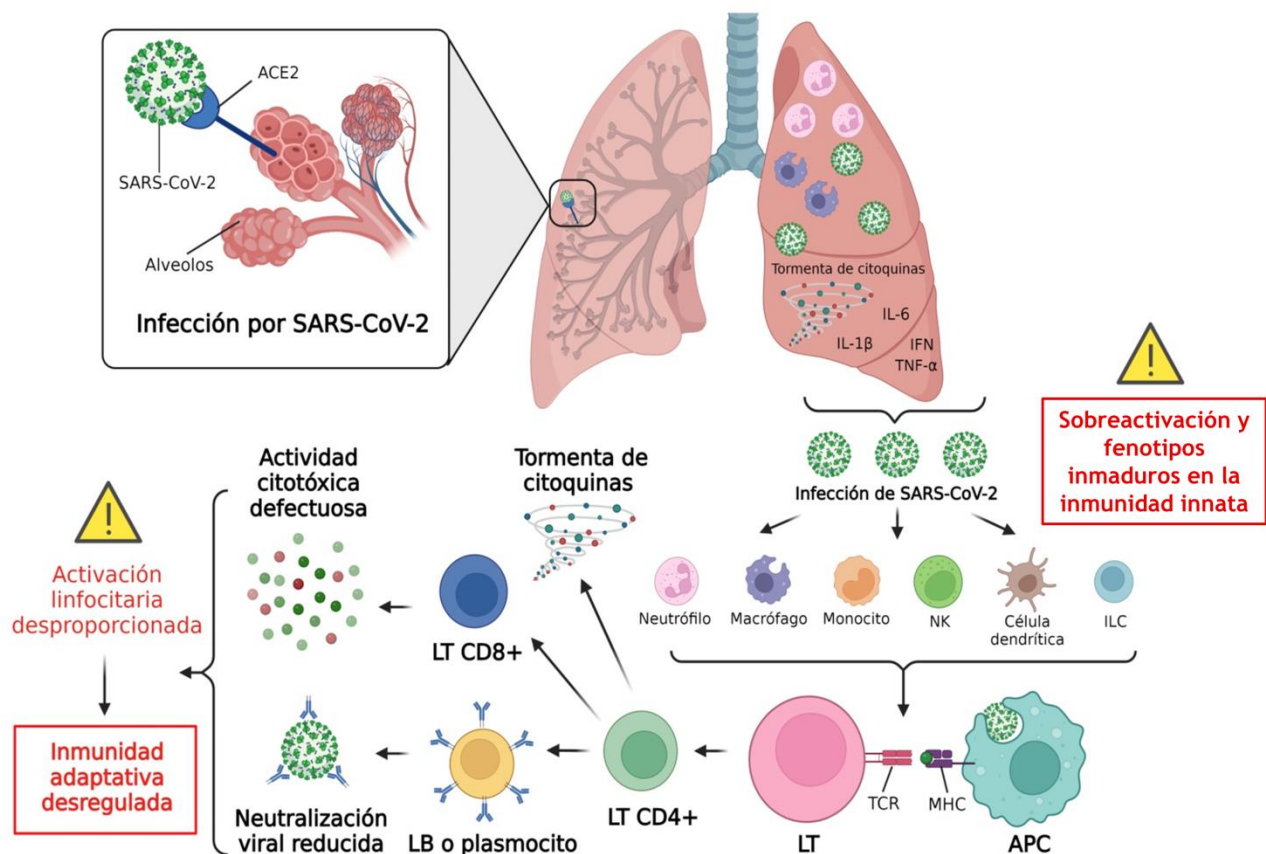


Figura 8. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa frente a la infección por el virus SARS-CoV-2. Después del reconocimiento del virus por el receptor ACE2, comienza una respuesta inmunitaria innata que dura alrededor de 10 días donde intervienen diferentes tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, monocitos, células NK, ILC y células dendríticas) y se producen diferentes citocinas inflamatorias. En la infección por el SARS-CoV-2, esta respuesta puede sobreactivarse con una producción excesiva de citocinas favoreciendo un ambiente altamente inflamatorio, y formar fenotipos inmaduros celulares desencadenando una respuesta inmunitaria innata inadecuada. Seguidamente, comienza el procesamiento y la presentación antigénica viral a las células T. En esta respuesta adaptativa más específica las células T CD4⁺ generan una tormenta de citocinas proinflamatorias, las células B no consiguen establecer una neutralización viral adecuada y la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ se encuentra comprometida. Toda esta activación linfocitaria desproporcionada conlleva una inmunidad adaptativa desregulada, que junto con la desregulación de la inmunidad innata, puede caracterizar los casos moderados o graves de COVID-19. Abreviaturas: ACE2, enzima convertidora de angiotensina 2; NK, Natural Killer; ILC, células linfoides innatas; LT, linfocitos o células T; LB, linfocitos o células B; APC, Célula Presentadora de Antígeno; TCR, Receptor de Células T; MHC, Complejo mayor de histocompatibilidad; IL, interleucina; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral

Creado con BioRender.com

Históricamente, para evaluar la respuesta vacunal se ha medido la producción de anticuerpos específicos del patógeno en cuestión. Sin embargo, es importante tener en cuenta otros componentes de la respuesta inmunitaria. De hecho, las principales vacunas desarrolladas contra la COVID-19 se centran en la respuesta inmunitaria frente a la proteína S del virus, permitiendo evaluar la respuesta celular T específica como la producción de anticuerpos específicos de la inmunoglobulina G (IgG) frente esta proteína (39). Abordar el

estudio de ambas respuestas es esencial para caracterizar correctamente la respuesta vacunal. A continuación, se detallan ambos tipos de respuesta.

1.3.2.1 Inmunidad humoral mediada por anticuerpos

La síntesis de anticuerpos representa uno de los mecanismos utilizados por el sistema inmunitario adaptativo para combatir diversas infecciones. Estas proteínas denominadas “inmunoglobulinas” se producen por las células B gracias a que su receptor (BCR, de sus siglas en inglés) reconoce el antígeno y múltiples clones de células B son capaces de activarse. La proliferación y diferenciación de los múltiples clones activados se realiza gracias su contacto con un tipo de célula T CD4⁺ presente en los ganglios linfáticos: las células T_{FH}. Posteriormente, estas células B producirán células B de memoria y plasmáticas productoras de anticuerpos. Sin embargo, no todos los anticuerpos producidos tendrán la capacidad de neutralizar al patógeno, ya que no todos se unen a la región correcta del mismo para combatir su infectividad (86, 87).

La infección por SARS-CoV-2 produce una fuerte respuesta humoral detectable en la mayor parte de los individuos. La seroconversión de la inmunoglobulina M (IgM) y de la IgG, se produce alrededor de los 12 días tras el inicio de los síntomas, siendo IgM la primera en producirse, e IgG, más específica y potente, posterior. La inmunoglobulina A (IgA) está presente mediante su dimerización en mucosas, expresándose por ejemplo en el epitelio respiratorio, que en el caso de la COVID-19 será de gran utilidad a la hora de combatir la infección en las vías respiratorias superiores por su capacidad neutralizante (87). La mayoría de los infectados tienen anticuerpos con capacidad neutralizante entre los días 14 y 20 tras el inicio de síntomas, pero con gran heterogeneidad: pueden ser altos, medios o bajos respondedores según los niveles de anticuerpos que tengan en sangre. Una vez que concluye la infección en curso, los niveles de anticuerpos tienden a caer, pero en el caso concreto de la infección por SARS-CoV-2 los niveles de anticuerpos neutralizantes (AcN) se mantienen detectables hasta los 4 meses aproximadamente, prediciendo una mayor capacidad neutralizante los anticuerpos IgG contra la región RBD de la proteína S (IgG anti-RBD) y los IgG anti-S. Las células B memoria específicas del virus responderán rápida y eficazmente ante una re-infección produciendo IgGs específicas del virus entre las primeras 24 y 72 horas (84, 86, 88)

1.3.2.2 Inmunidad celular

Un componente esencial de la respuesta inmunitaria adaptativa es la respuesta celular mediada por células T. El desarrollo de la respuesta estas células tiene su origen en la evolución de los vertebrados hace millones de años (89). Es una respuesta muy primaria que ha ido evolucionando su capacidad para

reconocer y eliminar patógenos intracelulares, por lo tanto, tendrá un papel de gran importancia en las infecciones virales.

Existen evidencias de que la acción de las células T es el mecanismo más efectivo para controlar la infección de SARS-CoV y MERS (90). En la infección por SARS-CoV se observa que los niveles de anticuerpos disminuyen hasta ser indetectables en un plazo aproximadamente de cuatro años; sin embargo, la respuesta celular se mantiene activa incluso 17 años después (91). En el caso del SARS-CoV-2, donde se ha comprobado con diversas variantes que las reinfecciones son un hecho, se ha estimado que una infección previa aporta una protección de aproximadamente un 87% hasta los 10 meses (92). Particularmente con la variante Omicron, se han producido gran cantidad de reinfecciones, pero se ha observado que la gran mayoría tenían respuesta de células T frente a esta variante y en consecuencia se caracterizaban por una gravedad clínica atenuada (93).

La respuesta de las células T CD4⁺ frente al SARS-CoV-2 se espera que dure muchos años, aunque parece ser que la gravedad con la que se desarrolla la infección es determinante (94, 95). Es por ello, que el desarrollo de esta respuesta celular tras la vacunación es muy esperanzador.

Se ha demostrado que sujetos con la reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción (PCR-RT, de sus siglas en inglés) negativa tras exponerse al virus del SARS-CoV-2, demostraban tener alta frecuencia de células T reactivas “cruzadas” secretoras de IL-2 pero no de IFN- γ (citocinas producidas por las células T CD4⁺), lo que indica que es un fenotipo de células T pre-existente. Este fenotipo concreto de células T corresponde con aquellas personas que han estado en contacto previo con otros coronavirus endémicos (huCoVs). Por lo tanto, estaríamos hablando de que la inmunidad cruzada, fenómeno definido por la habilidad del TCR para reconocer más de un péptido presentado por el MHC, es responsable de una posible protección frente a la infección posterior por SARS-CoV-2. Debido a la previa exposición a otros huCoVs, se desencadenaría una rápida expansión de las células T de memoria que llevaría a un control temprano de la infección: las células T pre-existentes combaten al virus sin necesidad de producir anticuerpos específicos frente a la nueva infección, por lo que se expanden más rápido en sujetos vírgenes a la infección por el SARS-CoV-2. Adicionalmente, también se ha comprobado que las células T reactivas por inmunidad cruzada secretoras de IFN- γ protegen frente a reinfecciones de SARS-CoV-2 en sujetos con niveles disminuidos de anticuerpos frente a la proteína S (96).

Dado que puede haber casos de pacientes que tengan una deficiencia humoral y no sean capaces de producir anticuerpos pero que sí desarrollen una respuesta celular T específica, es de vital importancia evaluar esta respuesta frente al virus como un parámetro para determinar, tanto la respuesta a la infección viral, como la respuesta de la vacuna frente al SARS-CoV-2.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Durante la pandemia, la sobrecarga hospitalaria ha sido un gran reto para Salud Pública. Mientras algunos pacientes mantenían un curso asintomático o leve de la COVID-19, otras personas infectadas por el SARS-CoV-2 desarrollaban síntomas graves que implicaban tratamientos clínicos. En estos pacientes, la respuesta inmunitaria frente al virus desempeña un papel esencial, ocasionando que el curso de la infección difiera de unos a otros, tanto en sujetos sanos como en pacientes con patologías previas (97). Así mismo, las opciones terapéuticas varían también según el momento de la infección. Por ello, la versatilidad de la infección del SARS-CoV-2 entre los pacientes afectados ha llevado a la hipótesis de que la búsqueda e identificación de biomarcadores basados en la cuantificación de componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria puede ser de gran utilidad en la definición del pronóstico del paciente o en la decisión del tipo de tratamiento a aplicar. De este modo, la medicina personalizada ha sido y es uno de los objetivos principales perseguido a lo largo de estos años por los clínicos para manejar especialmente pronósticos pobres, debido a que estos pacientes tienden a necesitar terapia con oxígeno durante su ingreso en el hospital, y es probable que sean derivados a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (21, 98). La utilización de un modelo pronóstico que ayude a identificar los casos más graves de COVID-19 podría ser de gran ayuda a la hora de establecer tratamientos personalizados para estos pacientes.

Por otro lado, la evaluación de la respuesta inmunitaria humoral y celular frente a las vacunas contra el SARS-CoV-2 es de gran importancia para determinar su eficacia clínica, así como el nivel y duración de la protección frente a este virus, para así poder controlar la pandemia de la COVID-19.

A continuación, se detallan los objetivos principales de la presente tesis doctoral:

- **Objetivo principal:** estudio de distintos componentes de la respuesta inmunitaria innata y adquirida en sangre en COVID-19 para buscar biomarcadores pronósticos de la enfermedad.
- **Objetivos secundarios:**
 - Evaluar los componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria innata en pacientes con infección por SARS-CoV-2 activa.
 - Analizar los componentes celulares y humorales de la respuesta inmunitaria adquirida en pacientes con infección por SARS-CoV-2 activa.
 - Establecer un modelo de predicción de los pronósticos más desfavorables en una cohorte inicial y validar este modelo en una cohorte independiente de pacientes.

- Valorar la evolución y duración de la respuesta inmunitaria humoral y celular T específica frente al SARS-CoV-2 en la vacunación de un grupo inmunocompetente, y otro inmunocomprometido, ya sea por inmunosenescencia o por inmunosupresión farmacológica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES EMPLEADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

En la Tabla 2 se muestran los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio, así como sus fluorocromos, clones e isotipos correspondientes.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales empleados en la técnica citometría de flujo. Se incluye el anticuerpo monoclonal, el fluorocromo asociado, el clon y su isotipo, la casa comercial y el número de referencia correspondiente.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Isotipo
CD45	FITC	J.33	IgG1 de ratón
CD8	FITC	B9.11	IgG1 de ratón
CD3	FITC	UCHT1	IgG1 de ratón
CD127	FITC	A7R34	IgG2a, κ, de rata
CD28	FITC	CD28.2	IgG1, κ, de ratón
IgD	FITC	IA6-2	IgG2a de ratón
CD21	FITC	BL13	IgG1 de ratón
CD183 (CXCR3)	FITC	G025H7	IgG1, κ, de ratón
CD45RA	AF488	2H4LDH11 LDB9	IgG1 de ratón
CD183 (CXCR3)	AF488	G025H7	IgG1 de ratón
CD4	PE	13B8.2	IgG1 de ratón
CD16	PE	3G8	IgG1 de ratón
CD56	PE	N901 (NKH-1)	IgG1 de ratón
CD25	PE	B1.49.9	IgG2a de ratón
IgD	PE	IA6-2	IgG2a de ratón
HLA-DR	PE	Immu-357	IgG1 de ratón
CXCR5	PE	J252D4	IgG1, κ, de ratón

CD14	PE	RMO52	IgG2a de ratón
CD134	PE	134-1	IgG1 de ratón
TLR4	PE	HTA125	IgG2a, κ, de ratón
ISO-TLR4	PE	eBM2a	IgG2a, κ, de ratón
TLR3	PE	TLR 3.7	IgG1, κ, de ratón
ISO-TLR3	PE	IS5-21F5	IgG1 de ratón
TLR7	PE	533707	IgG2a de ratón
ISO-TLR7	PE	20102	IgG2a de ratón
TLR8	PE	44C143	IgG1 de ratón
ISO-TLR8	PE	B11/6	IgG1 de ratón
CD14	ECD	RMO52	IgG2a de ratón
CD3	ECD	UCHT1	IgG1 de ratón
CD8	ECD	SFC121Thy2D3 ^{5,6, 22, 23}	IgG1 de ratón
CD19	ECD	J3-119	IgG1 de ratón
CD62-L	ECD	DREG56	IgG1 de ratón
CD45-RO	ECD	UCHL1	IgG2a de ratón
CD38	ECD	LS198.4.3	IgG1 de ratón
CD3	PC5	UCHT1	IgG1 de ratón
CD19	PC5.5	J3-119	IgG1 de ratón
CD4	PC5.5	13B8.2	IgG1 de ratón
CD27	PC5.5	1A4CD27	IgG1 de ratón
CD27	PC7	1A4CD27	IgG1 de ratón
CD19	PC7	J3-119	IgG1 de ratón

CD25	PC7	2A3	IgG2a de ratón
CD196 (CCR6)	PC7	B-R35	IgG2a, κ, de ratón
CD56	PC7	N901 (NKH-1)	IgG1 de ratón
CD38	APC	LS198-4-3	IgG1 de ratón
CD19	APC	J4.119	IgG1, κ, de ratón
CD16	APC	3G8	IgG1 de ratón
CD20	APC	B9E9 (HRC20)	IgG2a de ratón
PD-1	APC-700	EH12.2H7	IgG1, κ, de ratón
CD45-RA	APC-700	2H4LDH11LDB9 (2H4)	IgG1 de ratón
CD294	APC-A750	BM16	IgG2a, κ, de rata
CD4	APC-Vio770	VIT4	IgG2a, de ratón
CD3	Pacific Blue dye	UCHT-1	IgG1 de ratón
CD45	Krome Orange	J.33	IgG1, κ, de ratón

Abreviaturas: κ, cadena kappa; IgG1, subclase 1 de la Inmunoglobulina G; IgG2a, subclase 2a de la Inmunoglobulina G.

3.2 REACTIVOS

Los reactivos empleados en este estudio han sido los siguientes:

- Medio de cultivo TexMACS (Miltenyi Biotec).
- Sulfoxido de dimetilo (DMSO) al 0,1%.
- CD3/CD28 activador T humano Dynabeads (Gibco Thermo Fisher Scientific).
- PepTivator SARS-CoV-2. Proteína S, M y N (1μ/mL) (Miltenyi Biotec).
- PepTivator SARS-CoV-2. Proteína S B1.1.1.529 (Omicron) (1μ/mL) (Miltenyi Biotec).
- Ficoll Histopaque 1077 Hybri-Max (Sigma Aldrich).
- Formaldehído al 4%.
- Solución de lavado: Tampón Fosfato Salino (PBS).

- Solución permeabilizadora FACs (BD Bioscience).
- Kit ELISA para la detección de IL-6 (Enzo Life Sciences, Inc).
- ELISA protocolo IrsiCaixa: M6x-His Tag Antibody (MA1-21315) (ThermoFisher Scientific), PBS 1x + 1% de albúmina de suero bovino (BSA), S2+RBD (Sino Biologicals), anticuerpos de detección anti-IgG, -IgA e -IgM conjugados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) (99).

3.3 INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación empleada en este estudio ha sido la siguiente:

- Citómetro de flujo CytoFLEX y Navios EX (Beckman Coulter).
- Citómetro de flujo volumétrico AQUIOS CL (Beckman Coulter).
- Incubadora de Heracel 150i CO2 (Thermo Scientific).
- Campana de flujo laminar Bio II Advance Plus (Telstar).
- Centrífuga 5810 R (Eppendorf).
- Microscopio binocular (Zeiss).
- Cámara de Neubauer-improved (Marienfeld Superior).
- Cubreobjetos (Knittel-Gläser).

3.4 MATERIAL BIOLÓGICO NECESARIO

El material biológico empleado en este estudio ha sido el siguiente:

- Tubos BD Vacutainer de 4 mL de sangre periférica anticoagulada con heparina sódica. (Becton dickinson).
- Tubos BD Vacutainer de 4 mL de sangre periférica con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Becton dickinson).
- Tubos de suero BD Vacutainer de 10 mL con gel separador (Becton Dickinson).

3.5 TÉCNICAS

3.5.1 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LOS LINFOCITOS PRINCIPALES DE SANGRE PERIFÉRICA

Se han estimado las frecuencias y números absolutos de CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺/56⁺ y CD3⁺/CD16⁺/56⁺ usando el citómetro de flujo volumétrico AQUIOS CL. Este instrumento emplea un enfoque volumétrico para enumerar poblaciones celulares sin necesidad de referencia. De manera automática el equipo marca 50 µL de sangre completa con anti-CD45-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD16-CD56-PE, anti-CD8-ECD, anti-CD19-ECD y anti-CD3-PC5.

3.5.2 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA POBLACIONES DE CÉLULAS T Y B, LINFOIDES INNATAS, NATURAL KILLER Y SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS.

A partir de sangre completa, las PBMCs se han obtenido por centrifugación de gradiente con Ficoll Histopaque 1077 y posteriormente se han lavado con 2 mL PBS durante 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm) a 21°C. Las PBMCs se han diluido con 800 µL de PBS, se han marcado directamente en fresco y se han procesado de la siguiente manera:

- Para identificar las células T, B, linfoides innatas, NK, y los monocitos, las PBMCs se han marcado con diferentes anticuerpos monoclonales durante 30 minutos. Después se han lavado con 2 mL de PBS durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C y por último se han adquirido en el citómetro de flujo Navios EX.
 - Dentro de los linfocitos se han analizado diferentes subpoblaciones de **células T colaboradoras (Th o T helper)**, **T citotóxicas (Tc)** y **B**. También se han analizado distintas subpoblaciones de **monocitos** y **células NK**. Se han utilizado cuatro tubos con 100 µL cada uno de los PBMCs diluidos.
 - En el primer tubo se ha marcado con anti-CXCR3 (FITC), anti-CXCR5 (PE), anti-CD45RO (ECD), anti-CD4 (PC5.5), anti-CCR6 (PC7), anti-CD19 (APC), anti-PD1 (APC700), anti-CD294 (APC750), anti-CD3 (PB) y anti-CD45 (KrO).
 - En el segundo tubo se ha marcado con anti-CD28 (FITC), anti-HLA-DR (PE), anti-CD8 (ECD), anti-CD27 (PC7), anti-CD38 (APC) y anti-CD3 (PB).
 - En el tercer tubo se ha marcado con anti-CD21 (FITC), anti-IgD (PE), anti-CD38 (ECD), anti-CD27 (PC5.5), anti-CD19 (PC7), anti-CD20 (APC) y anti-CD3 (PB).

- En el cuarto tubo se ha marcado con anti-CD8 (FITC), anti-CD14 (PE), anti-CD62L (ECD), anti-CD56 (PC7), anti-CD16 (APC), anti-CD45RA (APC700) y anti-CD3 (PB).
- En el quinto tubo se ha marcado con anti-CD127 (FITC), anti-CD25 (PE), anti-CD3 (ECD), anti-CD4 (PC5.5).
- Para identificar las **ILCs** y sus subclases se han marcado 300 μ L de la dilución de PBMCs con anti-CD45 (PC5), Lin- (anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD56) (FITC), anti-CD127 (PC7), anti-CD117 (PE), anti-CD336 (APC) y anti-CD294 (APC-750).

Las estrategias de gateado para identificar las subpoblaciones de células T colaboradoras, T citotóxicas, B y monocitos se describen en las Figura 9, Figura 10, Figura 11, Figura 12 respectivamente.

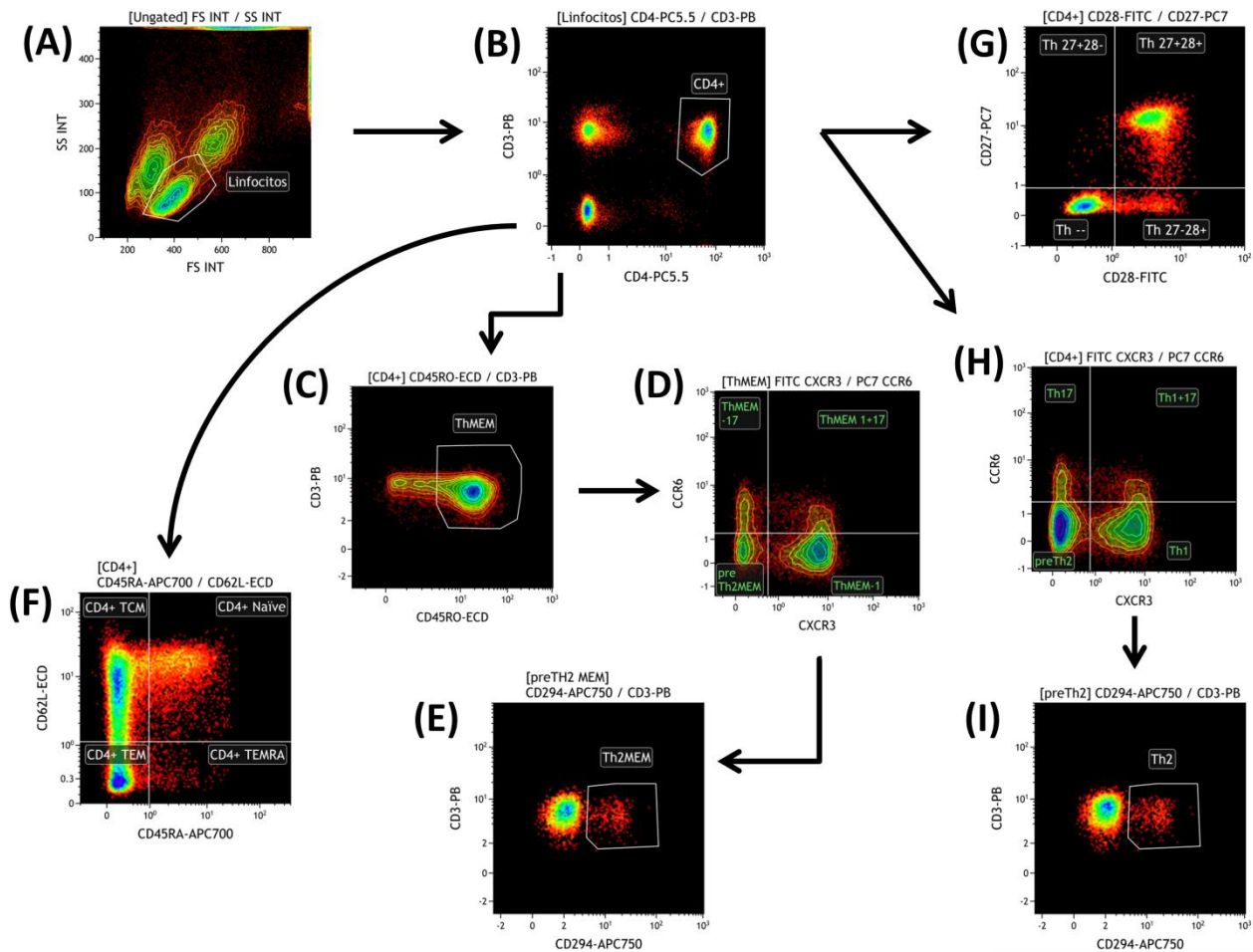


Figura 9. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de células T colaboradoras (Th o T *helper*). Los linfocitos se han gateado según la intensidad de dispersión frontal (FS INT) y lateral (SS INT) (A). De esta población se han seleccionado las células Th ($CD3^+CD4^+$) (B), de las cuales se han identificado distintas poblaciones de memoria ($CD45RO^+$) (C) mediante los marcadores CXCR3 y CCR6 (D): Th1 memoria ($CXCR3^+CCR6^-$), Th17 memoria ($CXCR3^+CCR6^+$), Th1+17 memoria ($CXCR3^+CCR6^+$) y Th2 memoria ($CXCR3^+CCR6^-CD294^+$) (E). De este modo, también se han gateado las mismas subpoblaciones (Th1, Th2, Th17 y Th1+17) directamente de la población de células $CD4^+$ (H, I). De las células Th se han gateado otras subpoblaciones en función de diferentes marcadores: enfrentando CD27 y CD28 nos encontramos las células $CD4^+$ activadas ($CD27^+CD28^+$), anérgicas ($CD27^-CD28^-$) y las positivas simples ($CD27^+CD28^-$ o $CD27^-CD28^+$) (G); mientras que con los marcadores CD62L y CD45RA se han diferenciado los distintos estadios madurativos de las células T $CD4^+$ (F): $CD4^+$ Naïve ($CD62L^+CD45RA^+$), $CD4^+$ efectoras de memoria recientemente activadas o TEMRA ($CD62L^-CD45RA^+$), $CD4^+$ efectoras de memoria o TEM ($CD62L^-CD45RA^-$) y $CD4^+$ centrales de memoria o TCM ($CD62L^+CD45RA^-$).

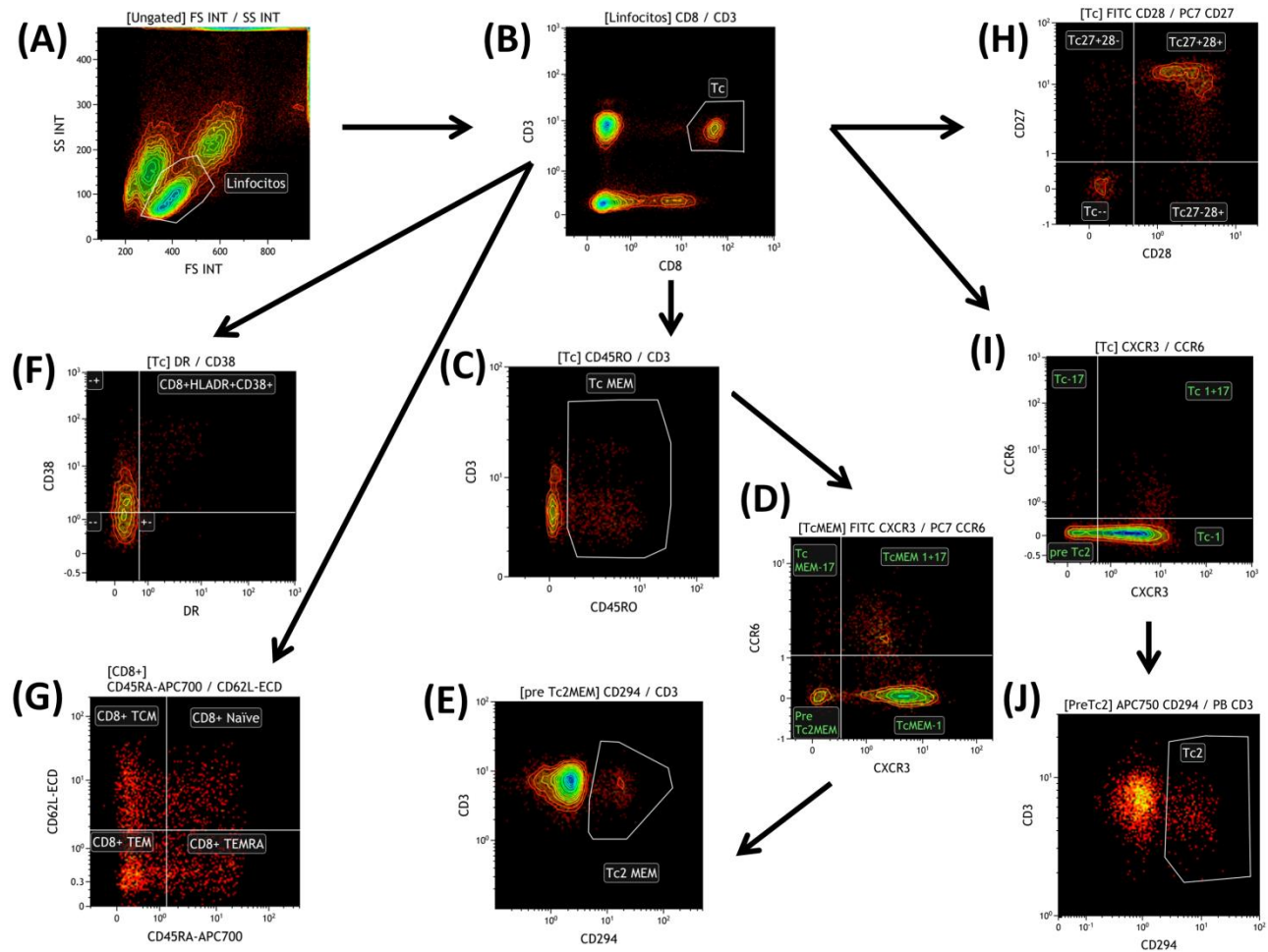


Figura 10. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de células T citotóxicas (Tc). Los linfocitos se han gateado según la intensidad de dispersión frontal (FS INT) y lateral (SS INT) (A). De esta población se han seleccionado las células Tc (CD3⁺CD8⁺) (B), de las cuales se han identificado distintas poblaciones de memoria (CD45RO⁺) (C) mediante los marcadores CXCR3 y CCR6 (D): Tc1 memoria (CXCR3⁺CCR6⁻), Tc17 memoria (CXCR3⁻CCR6⁺), Tc1+17 memoria (CXCR3⁺CCR6⁺) y Tc2 memoria (CXCR3⁻CCR6⁻ CD294⁺) (E). De este modo, también se han gateado las mismas subpoblaciones (Tc1, Tc2, Tc17 y Tc1+17) directamente de la población de células CD8⁺ (I, J). De las células Tc se han gateado otras subpoblaciones en función de diferentes marcadores: las células CD8⁺ sobreactivadas son positivas para los marcadores HLA-DR y CD38 (F); enfrentando CD27 y CD28 nos encontramos las células CD8⁺ activadas (CD27⁺CD28⁺), anérgicas (CD27⁻CD28⁻) y las positivas simples (CD27⁺CD28⁻ o CD27⁻CD28⁺) (H); mientras que con los marcadores CD62L y CD45RA se han diferenciado los distintos estadios madurativos de las células T CD8⁺ (G): CD8⁺ Naïve (CD62L⁺CD45RA⁺), CD8⁺ efectoras de memoria recientemente activadas o TEMRA (CD62L⁻CD45RA⁺), CD8⁺ efectoras de memoria o TEM (CD62L⁻CD45RA⁻) y CD8⁺ centrales de memoria o TCM (CD62L⁺CD45RA⁻).

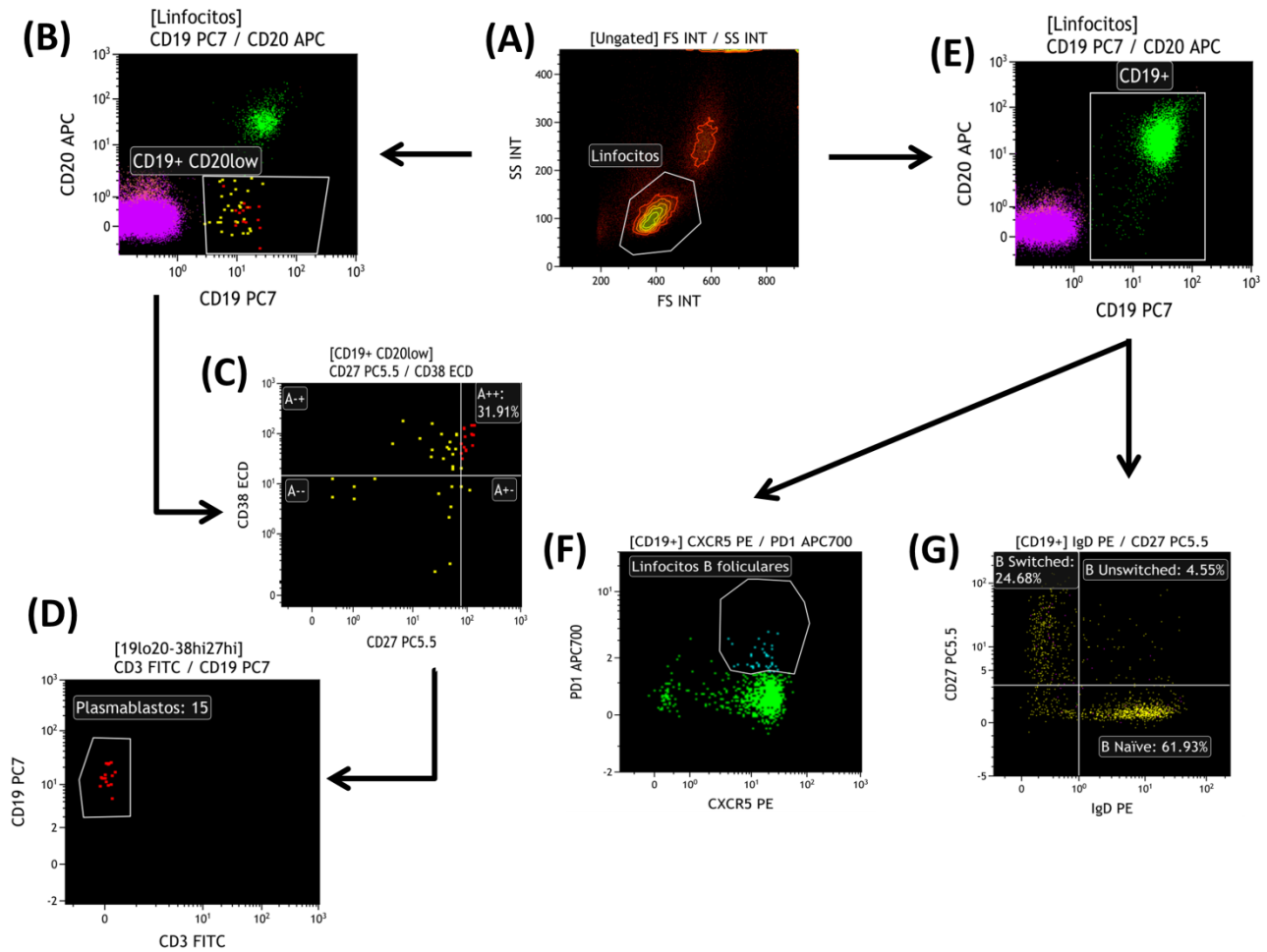


Figura 11. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de células B. Los linfocitos se han gateado según la intensidad de dispersión frontal (FS INT) y lateral (SS INT) **(A)**. De esta población se han gateado las células B CD19⁺CD20^{low} **(B)**, y posteriormente se ha seleccionado el porcentaje positivo para los marcadores CD27 y CD38 **(C)** para identificar la población de plasmablastos **(D)**. Por otro lado, de la población total de las células B CD19⁺ **(E)** se han caracterizado las foliculares (CXCR5⁺PD1⁺) **(F)** y sus distintos estadios madurativos **(G)**: B Naïve (CD27⁺IgD⁺), B Switched (CD27⁺IgD⁺) y B Unswitched (CD27⁺IgD⁺).

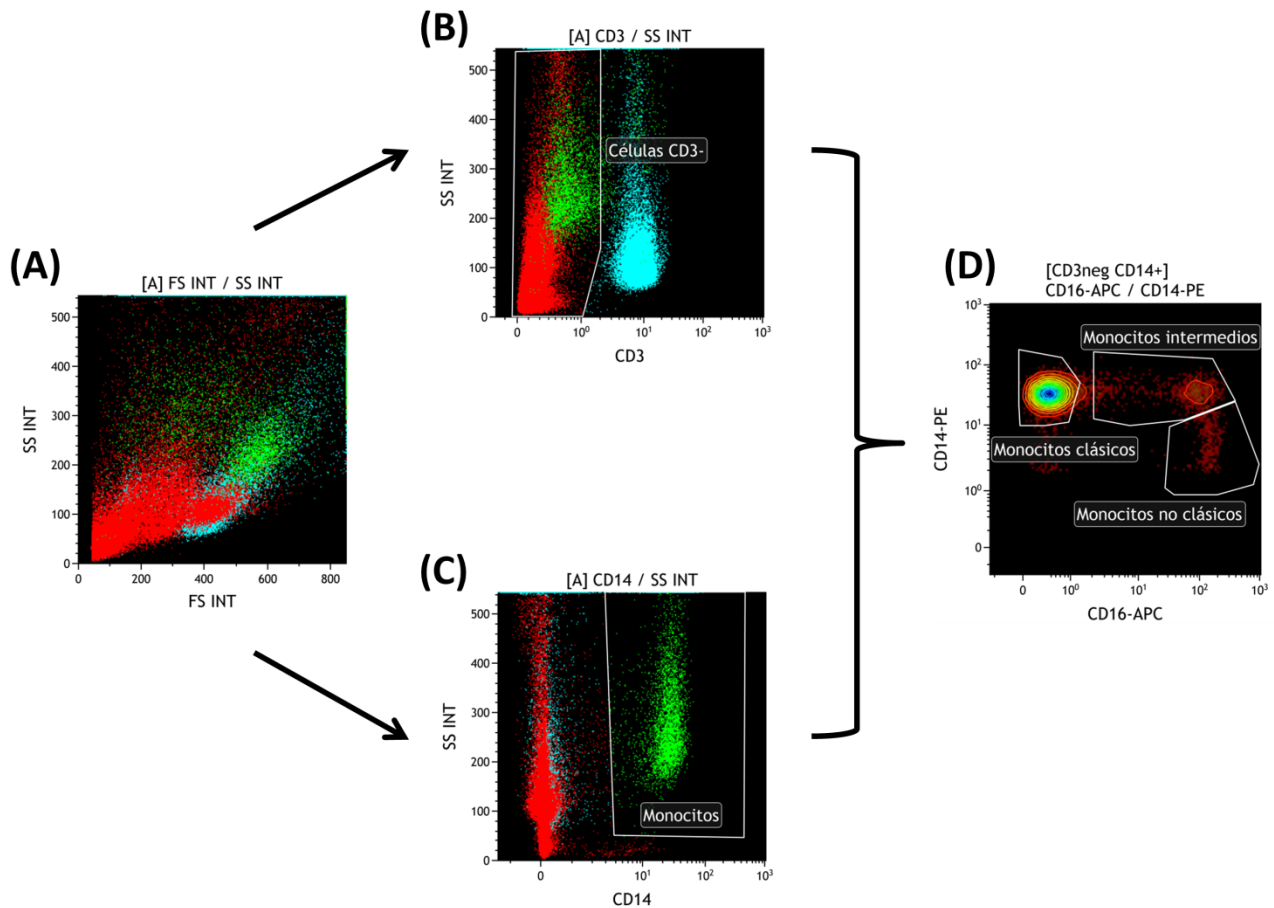


Figura 12. Estrategia de gateado de las diferentes subpoblaciones de monocitos. Intensidad de dispersión frontal (FS INT) y lateral (SS INT) (A). Se han gateado las células CD3⁻ (B) y las células CD14⁺ (C) enfrentando estos marcadores con la SS INT. A continuación, se ha realizado un gateado booleano con las poblaciones de B y C, para así caracterizar las tres subclases diferentes de monocitos (D): monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻), monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (CD14^{low}CD16⁺).

3.5.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TLR EN PBMCs

También se ha estimado la expresión de los TLR involucrados en el reconocimiento de antígenos o componentes virales, como el receptor de superficie celular TLR4 y los receptores intracelulares TLR3 y TLR7 en PBMCs. A partir de sangre completa, se han aislado las PBMCs mediante centrifugación de gradiente con Ficoll Histopaque 1077 y posteriormente se han lavado con 2 mL PBS durante 5 minutos a 1500 rpm y 21°C. Las PBMCs se han diluido en 160 µL de PBS, y se ha realizado un marcaje extracelular en fresco previo al marcaje específico de los TLRs con 3 µL de anti-CD14 (ECD), 3 µL de anti-CD19 (PC7) y 3 µL de anti-CD3 (PB) en cada una de las muestras. Posteriormente, se ha incubado durante 20 minutos a 21°C y en oscuridad. Tras la incubación se ha realizado un lavado con 2 mL de PBS durante 5 minutos a 1500 rpm y 21°C. A continuación, se han resuspendido las PBMCs en 200 µL de PBS, y se han utilizado 100 µL para el marcaje de los TLRs de superficie y los otros 100 µL para el marcaje de los TLRs intracitoplasmáticos.

- Citometría de **TLRs de superficie**: se han añadido 100 µL de PBS a los 100 µL separados para el marcaje de los TLRs superficiales. Se ha repartido 100 µL de muestra en cada uno de los dos tubos utilizados, donde previamente hemos añadido 1,5 µL de anti-TLR4 en uno de ellos, y 1,5 µL de su control de isotipo IgG2a en el otro.
- Citometría de **TLRs intracitoplasmáticos**: se han añadido 300 µL de BD-FACS-Perm (1x) a los 100 µL separados para el marcaje de los TLRs intracitoplasmáticos. Se ha incubado durante 10 minutos, a 21°C y en oscuridad, y se ha realizado un lavado con 2 mL de PBS-BSA_{0,5%} durante 5 minutos a 1500 rpm y 21°C. Después, se ha resuspendido la muestra en 600 µL repartiendo 100 µL para cada uno de los 4 tubos donde previamente se ha añadido 1,5 µL de anti-TLR3, anti-TLR7 y de sus correspondientes controles de isotipo (IgG1 e IgG2a, respectivamente).

A continuación, se han incubado los TLR de superficie y los intracitoplasmáticos durante 20 minutos a 21°C y en oscuridad. Tras la incubación, se ha realizado un lavado con 2 mL de PBS durante 5 minutos a 1500 rpm y 21°C. Finalmente, la expresión de los TLRs y de sus controles de isotipo se ha adquirido en el citómetro de flujo Navios EX.

3.5.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA T ESPECÍFICA FRENTE AL SARS-COV-2 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La evaluación de la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2 es una metodología que no estaba implementada en el servicio y que hemos puesto a punto para estos estudios. El procedimiento se ha validado por la Sociedad Española de Inmunología (SEI) y se ha basado en la expresión de los marcadores inducidos tras activación (AIMs, de sus siglas en inglés) tras la exposición a los antígenos específicos del SARS-CoV-2 (100). Las PBMCs aisladas de tubos con sangre heparinizada fueron aisladas por gradiente de Ficoll y cultivadas a una concentración de 10⁶ células/mL en medio TexMACS durante 24 horas a 37°C en placas de 96 pocillos de fondo plano a 0,1% de DMSO, con distintos antígenos del virus (PepTivator SARS-CoV-2 Prot S, Prot M y Prot N, Miltenyi Biotec) y con un estímulo policlonal como control positivo (Dynabeads Human T activator CD3/CD28, Gibco Thermo Fisher Scientific). Tras la estimulación, las PBMCs fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (FITC), anti-CD134 (PE), anti-CD8 (ECD), anti-CD25 (PC7) y anti-CD4 (APC-Vio770), lavadas con 150 µL de PBS y centrifugadas durante 5 min a 4°C y 1800 rpm. Finalmente, y antes de adquirir las muestras por el citómetro de flujo CytoFLEX, se ha añadido 2 µL del marcador de viabilidad celular 7-aminoactinomicina D (7-AAD) y 90 µL de PBS. Entre los anticuerpos utilizados se encuentran los que reconocen los AIMs, de los cuales en un comienzo se han utilizado los siguientes: anti-CD134, anti-CD25, anti-CD137 y anti-CD154. Sin embargo, a medida que se fueron analizando los resultados se comprobó que tras las 24 horas de incubación solo se alcanzaba el pico de

activación de manera consistente para CD134 y CD25, de manera que el resto de los marcadores se descartaron en la realización de esta técnica.

La estrategia de gateado utilizada para evaluar la respuesta T específica frente a los diferentes *pools* de péptidos del SARS-CoV-2 se muestra en la Figura 13.

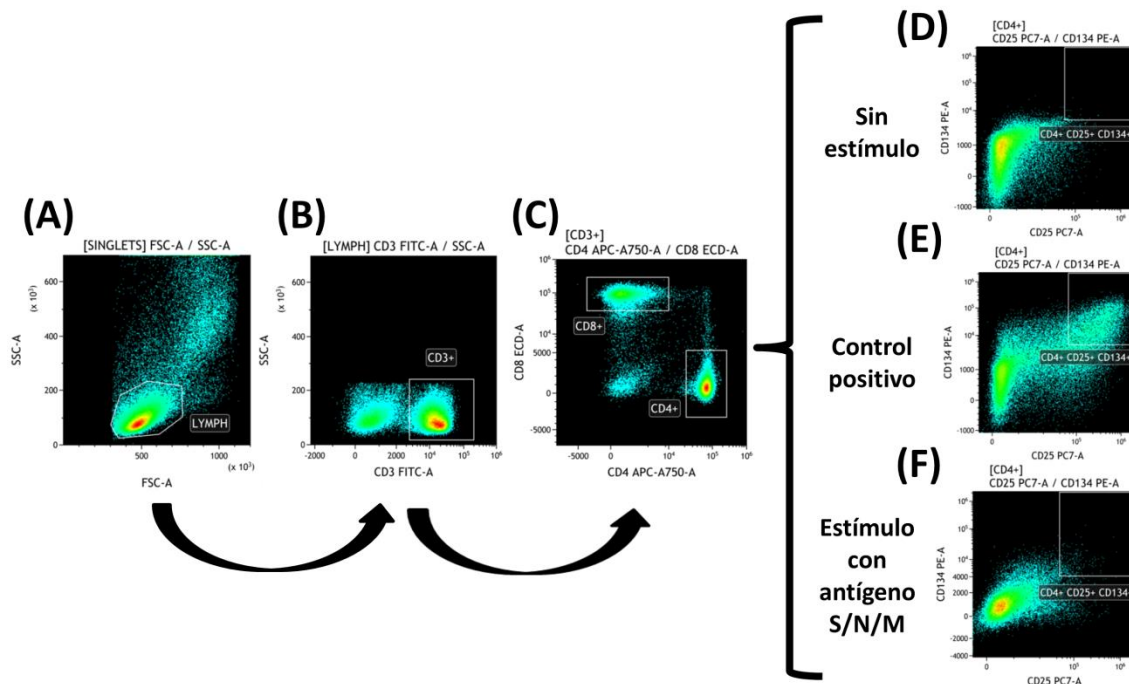


Figura 13. Estrategia de gateado de la respuesta T específica frente al antígeno S del SARS-CoV-2. En un principio, los linfocitos se han gateado según la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) **(A)**. A continuación, se seleccionaron las células T (CD3⁺) **(B)** y a partir de estos, las T colaboradoras (CD4⁺) y las T citotóxicas (CD8⁺) **(C)**. Finalmente, en la subpoblación de células CD4⁺, se han propuesto tres condiciones diferentes bajo el nivel de expresión de los marcadores inductores de activación (AIMs): un control negativo no estimulado **(D)**, un control positivo CD3⁺/CD28⁺ **(E)** y la estimulación de las células con el antígeno correspondiente (S, N o M) **(F)**.

Los resultados fueron expresados como el ratio de la frecuencia de expresión de los AIMs (CD25⁺ y CD134⁺) obtenidos tras la activación específica con respecto al control negativo no estimulado. Un ratio >3 en uno de los péptidos específicos del SARS-CoV-2 ha sido considerado como reacción positiva. En la Figura 14 se muestra un ejemplo de lo que sería una reacción positiva específica frente a uno de los antígenos del SARS-CoV-2.

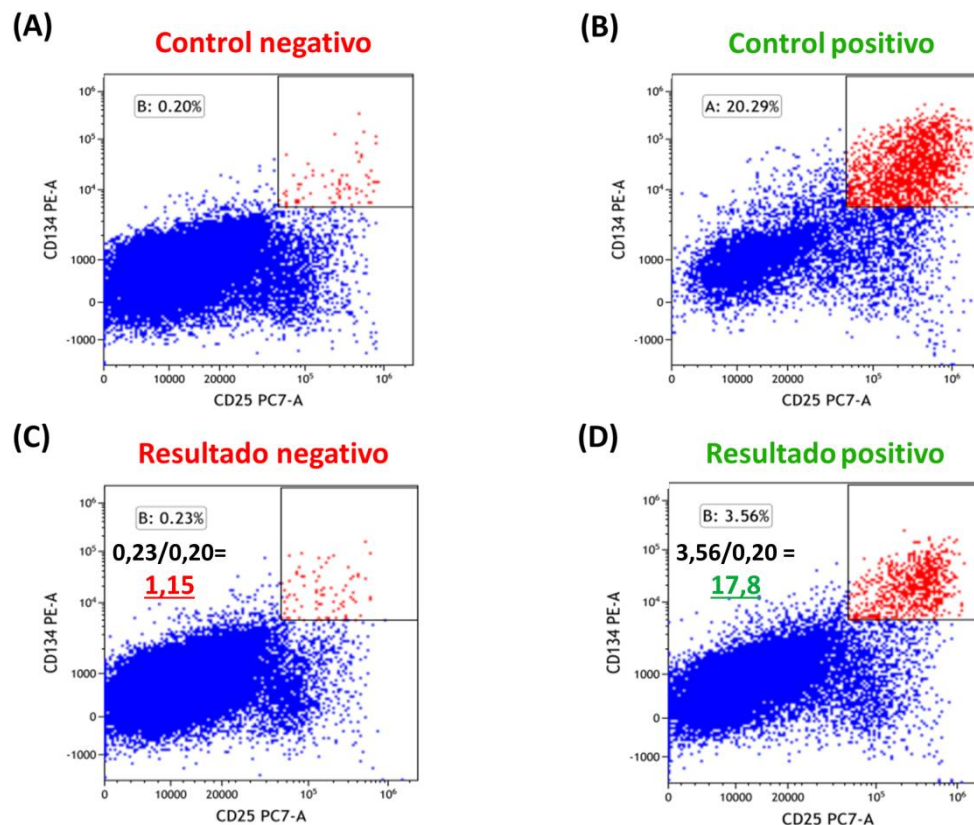


Figura 14. Ejemplo de una representación de la respuesta T específica frente a uno de los antígenos del SARS-CoV-2. En las gráficas A y B se encuentran los controles empleados en esta técnica: un control negativo **(A)**, que muestra la actividad basal e inespecífica de las células T; y un control positivo estimulado con CD3/CD28 **(B)** donde se observa la actividad policlonal de estas células. En las gráficas C y D encontramos un ejemplo de un resultado negativo **(C)** debido a que el cociente de su porcentaje entre el porcentaje del control negativo de referencia (A) da lugar a un ratio inferior a tres, correspondiendo con un sujeto que no ha tenido contacto con el virus; mientras que en la gráfica **D** observamos que el cociente de su porcentaje entre el de A es igual a un ratio significativamente superior a tres, lo cual corresponde con un sujeto que sí ha tenido contacto con el virus y desarrollaría una respuesta positiva estimulando a las células T.

3.5.5 DETERMINACIÓN DE LA IL-6 CIRCULANTE

Dada la utilidad clínica en pacientes recién ingresados con COVID-19, se ha medido la IL-6 humana mediante la técnica de ELISA (Enzo Life Sciences, Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad de los niveles de IL-6 sérica fue 0,057 pg/mL. La variabilidad intra e interensayo fue de 4,38% y 9,6%, respectivamente.

3.5.6 DETERMINACIÓN DE RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA FRENTE A LA PROTEÍNA SPIKE DEL SARS-COV-2

La determinación de anticuerpos del SARS-CoV-2 se ha realizado mediante dos metodologías.

Por un lado, la detección de la presencia o ausencia de los anticuerpos IgG, IgA e IgM anti-S1, anti-RBD y anti-S2 frente al virus se ha realizado mediante la técnica ELISA siguiendo el protocolo publicado IrsiCaixa (101). Las muestras de suero se han diluido previamente 1:100 en PBS. Las placas Nunc MaxiSorp de 96 pocillos se han recubierto con concentraciones optimizadas de 2 µg/mL del anticuerpo de captura MA1-21315 diluido con PBS durante toda la noche a 4°C. Las placas recubiertas han sido lavadas y se les ha añadido el buffer de bloqueo, PBS 1x + 1% de albúmina de suero bovino (BSA), durante dos horas a temperatura ambiente. Tras lavar las placas con PBS, se ha añadido la solución del antígeno (S2 + RBD diluido en un buffer de bloqueo) a la mitad de la placa y buffer de bloqueo a la otra mitad, después se ha incubado durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se han añadido las muestras de suero y se han incubado durante una hora a temperatura ambiente. Después, se ha incubado con anticuerpos de detección anti-IgG, -IgA e -IgM conjugados con peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos específicos de antígeno de unión se han detectado añadiendo la solución de sustrato. La absorbancia se ha medido a 492 nm. La señal específica asociada con cada muestra se calculó mediante sustracción de fondo de la siguiente manera: señal específica de OD = OD (+Ag) – OD (-Ag).

Por otro lado, se han recogido datos de la cuantificación de anticuerpos IgG anti-S1, anti-RBD y anti-N del SARS-CoV-2 en muestras de suero por la técnica de inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente (CLIA, de sus siglas en inglés), utilizando el SARS-CoV-2 IgG II Quant Assay on the Alinity I y siguiendo las instrucciones del fabricante gracias al departamento de Microbiología en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Los resultados han sido expresados con unidades arbitrarias (AU) por mL (AU/mL). Valores superiores de 50 AU/mL para anticuerpos anti-S1 y por encima de 1,5 AU/mL para anticuerpos anti-N se han considerado positivos.

3.5.7 ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE LABORATORIO

Se han cuantificado diferentes variables bioquímicas para comprobar si se encontraban significativamente alteradas. Entre ellas están los niveles de proteína C reactiva (PCR), dímero D, troponina, ferritina, LDH y el porcentaje de saturación de O₂ al ingreso del paciente en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. También se ha realizado un hemograma donde se han recogido datos de distintas poblaciones celulares, como el porcentaje de linfocitos, neutrófilos y monocitos, así como el recuento total de estas mismas poblaciones. Por último, se han cuantificado distintos factores inmunitarios del suero como la IgG, IgM, IgA, y los componentes 3 y 4 del complemento (C3 y C4). Todos estos parámetros se encuentran reflejados junto a sus valores de referencia en la Tabla 3.

3.5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el software SPSS (versión 19.0), el software Graph Pad Prism (versión 6.0) y el software RStudio (versión 1.3.959). La distribución de las variables continuas se ha evaluado mediante los test de Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk. Los resultados se han expresado como media $\pm$ desviación estándar para variables paramétricas o mediana (rango intercuartílico o RIC) para variables no paramétricas. Para comparaciones entre las variables se ha aplicado el test T-Student y U-Mann-Whitney, y para comparaciones de varios grupos ANOVA y Kruskal-Wallis. Un valor de $p < 0,05$ se ha considerado estadísticamente significativo.

Para identificar variables asociadas con pronósticos clínicos moderados-graves, al ingreso hospitalario se realizó un análisis de regresión logística. Tras el análisis univariante con las variables potencialmente independientes, se ha calculado el *odds ratio* (OR) con el estadístico de Wald. En un posterior análisis multivariante, se incluyeron en el modelo aquellas con un valor de $p < 0,25$ en el análisis univariante, siguiendo los criterios propuestos por Hosmer y Lemeshow (102), y respaldados por otros autores de referencia (103). Para la selección del modelo se utilizó el procedimiento del método de retroceso para realizar automáticamente la selección de variables. Se ha realizado una curva de la característica operativa del receptor (ROC, de sus siglas en inglés) para evaluar la capacidad predictiva del modelo, y se ha medido el área bajo la curva (AUC, de sus siglas en inglés). Posteriormente, se ha validado este modelo en una cohorte independiente de pacientes al ingreso calculando un score de gravedad. Para ello, se ha expresado el modelo de regresión logística en el modo “*logit*”. El *logit* se ha calculado a partir del resultado de la suma de una constante ($C=3,411343368$) y el producto de cada variable por el coeficiente B correspondiente obtenido del análisis de regresión logística. La fórmula modelo empleada se corresponde con la siguiente:

$$\text{Logit} = C + (\text{Variable 1} * B^{\text{Variable 1}}) + (\text{Variable 2} * B^{\text{Variable 2}}) + (\text{Variable 3} * B^{\text{Variable 3}}) + \text{etc...}$$

A partir de la aplicación de esta fórmula matemática se ha obtenido un valor numérico que se ha transformado en probabilidad mediante el uso de la ecuación “ $e^{\text{logit}}/1+e^{\text{logit}}$ ”. A continuación, se ha calculado el índice de Youden para obtener el punto de corte empleado en la interpretación de los valores de probabilidad obtenidos, y se ha realizado la curva ROC correspondiente.

También se ha realizado una curva ROC para calcular el punto de corte de los niveles de anticuerpos anti S-RBD tras vacunación y poder discriminar correctamente el riesgo de PCR-RT positiva post vacunación (PPPV).

3.6 COHORTES

En la presente tesis doctoral se han analizado dos cohortes principales: una cohorte de infección por SARS-CoV-2 al ingreso al hospital, compuesta por una sub-cohorte inicial y otra de validación; y una segunda cohorte de respuesta vacunal, compuesta por personal sanitario, sujetos institucionalizados en residencias de ancianos y receptores de trasplante hepático. Las muestras analizadas se representan temporalmente en la Figura 15, distribuidas según el grupo al que correspondan.

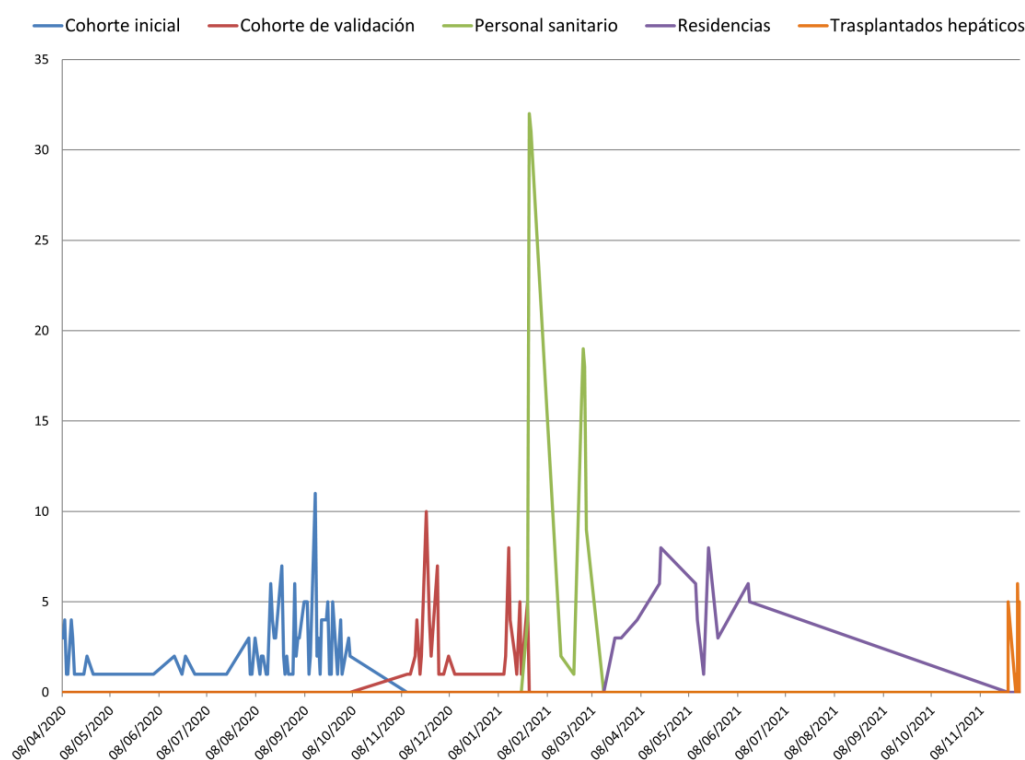


Figura 15. Representación gráfica temporal cuantitativa de las muestras de las diferentes cohortes de pacientes analizadas en el laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). La línea azul representa las muestras de COVID-19 activo de la cohorte inicial; la roja, las de la cohorte de validación; la verde, las del personal sanitario; la morada, las de los sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria; y la naranja, las de los receptores de trasplante hepático. Las dos primeras líneas se encuentran dentro de la cohorte de infección, mientras que las tres últimas se encuentran dentro de la cohorte de respuesta vacunal.

3.6.1 COHORTE DE INFECCIÓN POR SARS-COV-2 AL INGRESO

En esta primera cohorte se estudiaron 192 pacientes al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) con infección activa por SARS-CoV-2. El Comité de Ética regional de la Investigación con medicamentos (CEIm, código interno 2020.167, 14 de Mayo de 2020) aprobó el protocolo para los pacientes incluidos en el estudio de esta cohorte. En el momento de ingreso los pacientes, o un representante legal, otorgaron el consentimiento informado que se ha incluido en el historial médico. Los

criterios de inclusión fueron tener una edad superior a 18 años y demostrar COVID-19 con un test PCR positivo para el SARS-CoV-2.

Se estableció un *score* clínico en función de las necesidades terapéuticas: pacientes leves, sin necesidad de oxigenoterapia; moderados, con gafas nasales y mascarillas Venturi (Ventimask); graves, con ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y algunos de ellos fallecidos. Dentro de esta cohorte de infección, se encuentran la cohorte inicial y la cohorte de validación.

3.6.1.1 Cohorte inicial

La cohorte inicial, reclutada entre los meses de abril y diciembre del año 2020, se compone de un total de 155 pacientes estudiados al ingreso en el HUMV. Los pacientes de esta cohorte se han categorizado según el requerimiento de oxígeno en leves o moderados-graves. Esta última categoría incluye grados muy heterogéneos de gravedad con necesidades de oxígeno muy variadas: la mayoría de los pacientes requirieron oxigenoterapia con gafas nasales o Ventimask, mientras que pocos necesitaron UCI e incluso menos fallecieron. Los pacientes leves, 73, no requirieron oxígeno; mientras que los 82 pacientes moderados-graves si que necesitaron oxigenoterapia, cuidados intensivos o fallecieron (20).

3.6.1.2 Cohorte de validación

A partir de diciembre de 2020 se comenzó a reclutar una cohorte de validación para corroborar la utilidad de los marcadores pronósticos identificados en la cohorte inicial. Esta segunda cohorte está compuesta por otros 37 pacientes al momento del ingreso en el HUMV reclutados hasta febrero de 2021. El estudio de esta cohorte ha permitido que se pueda desarrollar un *score* estadístico de gravedad para categorizar a los pacientes evaluando su pronóstico.

3.6.2 COHORTE DE RESPUESTA VACUNAL

En una segunda cohorte principal encontramos diferentes grupos de pacientes vacunados frente al SARS-CoV-2. Hemos estudiado la evolución de su respuesta vacunal humoral y celular T específica frente al virus en inmunocompetentes (personal sanitario), inmunosenescentes (sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria) y pacientes con inmunosupresión farmacológica (trasplantados hepáticos).

3.6.2.1 Personal sanitario

Un total de 52 trabajadores sanitarios (con una mediana de edad de 42,5 años y un rango intercuartílico o RIC de 30,5-54,2) han sido reclutados para este estudio después de otorgar consentimiento informado, de los cuales 41 son mujeres (78,8%). Este estudio se ha realizado de acuerdo a la declaración

de Helsinki y se ha aprobado por el Ceim (código interno 2020.167). Ninguno de los sujetos tenía registro de haber padecido la COVID-19 y se vacunaron con el mismo lote (EK9788) de la vacuna BNT162b2 (Pfizer-BioNTech). La primera dosis fue inoculada entre el 4 y el 8 de enero del año 2021, y la segunda dosis entre el 27 y el 30 de enero de este mismo año. Se ha analizado la respuesta vacunal entre dosis, recolectando las muestras a los 20 días después de la primera dosis, al mes (30 días) de la segunda dosis para comprobar la tasa de respuesta temprana (37), y a los 9 meses, para comprobar cuando decaía la respuesta inmunitaria.

3.6.2.2 Sujetos institucionalizados en residencias de ancianos

Se ha realizado un muestreo de todas las residencias de Cantabria (España), un estudio en colaboración con Salud Pública y la Unidad de Seguimiento Epidemiológico de Cantabria. Estos sujetos de residencias han sido vacunados entre enero y marzo del año 2021 siguiendo las recomendaciones de Salud Pública y las pautas europeas. Los sujetos incluidos en el trabajo tienen una media de edad de 80,56 años $\pm$ 13,51, de los cuales el 67,6% son mujeres. La gran mayoría presentan diversas comorbilidades como hipertensión arterial (HTA), Diabetes Mellitus (DM) y dislipemias, entre otras.

El total de sujetos institucionalizados en residencias de Cantabria al comienzo del estudio fue de 6598, del cual se calculó el tamaño muestral para cubrir el 85% de la población con un intervalo de confianza del 95% y una precisión de $\pm$ 3%. Aproximadamente el 10% del total, 641 sujetos, se incluyeron en el estudio, pero de 17 de ellos no fue posible obtener muestras. Finalmente, la evaluación temprana de la respuesta vacunal a los 2 meses de la vacunación ha sido realizada en un total de 624 residentes seleccionados, cubriendo todos los puntos de la región repartidos en 57 residencias. Todos los sujetos han recibido la vacuna BNT162b2. Más adelante, se ha evaluado la respuesta inmunitaria tras 6 meses de la vacunación en un subgrupo compuesto por 558 sujetos de residencias, en los que se realizó un estudio de anticuerpos anti-S y anti-N posterior. El diseño del estudio se muestra en la Figura 16.

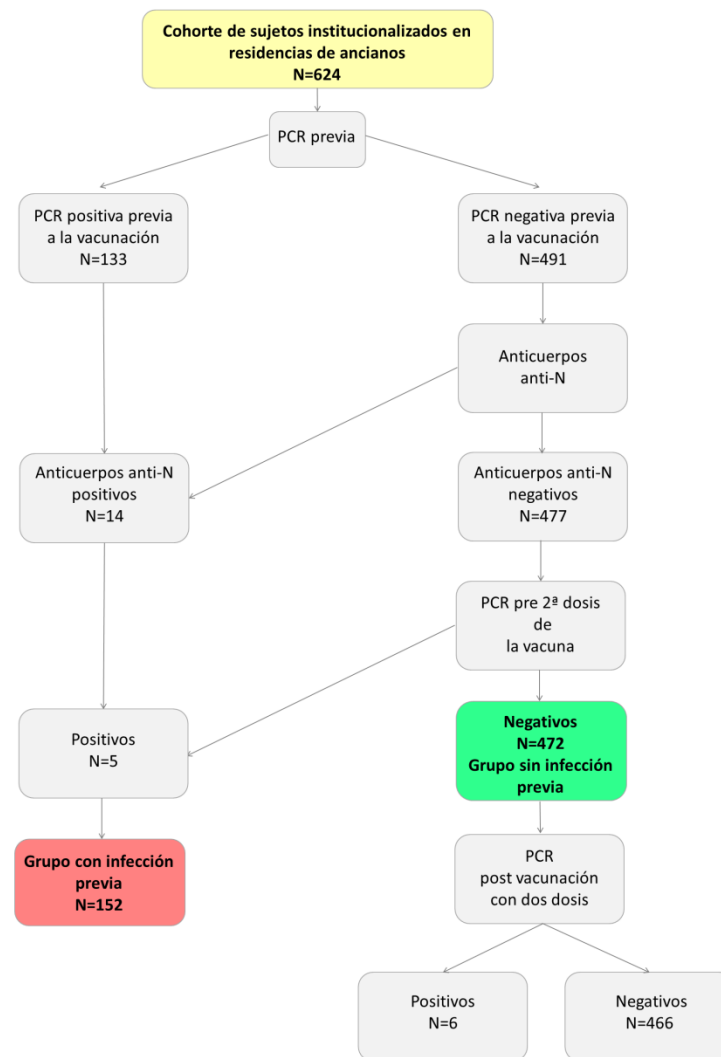


Figura 16. Diseño del estudio de los sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria. Un total de 624 sujetos de residencias han sido elegidos para el estudio. Se han definido dos grupos principales de sujetos con las dos dosis de la vacuna BNT162b2: uno con infección previa y otro sin ella. Abreviaturas: PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa (de sus siglas en inglés).

Se ha realizado PCR secuencial en tiempo real cada dos semanas a los sujetos del grupo sin infección previa para monitorizar posibles infecciones. Además, en aquellos pacientes con sospecha de infección o contacto estrecho se les ha hecho un test de antígenos; si el resultado era negativo se les ha realizado un test PCR posterior (104).

El Sistema de Gestión de Laboratorios Unificados en Cantabria (LISCAN) integrado con una plataforma de residencias (GesCARE) y un sistema de citación unificado (TiCARES) fueron esenciales para determinar en tiempo real el diagnóstico de cada paciente.

3.6.2.3 Receptores de trasplante hepático

El 7 de septiembre de 2021 la Autoridad Sanitaria recomendó administrar la tercera dosis de la vacuna frente al SARS-CoV-2 a todos los receptores de órgano sólido. Esta recomendación se debe a que, según varios estudios, más del 50% de estos pacientes no habían desarrollado respuesta humoral de anticuerpos que les protegiera contra la COVID-19, y en consecuencia, podrían estar en riesgo de infección, especialmente al tratarse de pacientes inmunocomprometidos por inmunosupresión farmacológica (105).

De esta manera, se ha realizado un análisis de la respuesta humoral en 129 pacientes receptores de trasplante hepático de la Unidad de Trasplante de Hígado del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, los cuales tenían una historia desfavorable frente a la COVID-19 y estaban vacunados con ambas dosis de la vacuna ARNm-1273 frente al SARS-CoV-2. Cuatro meses después se les administró una tercera dosis de esta misma vacuna entre el 27 de septiembre y el 10 de octubre de 2021. Los anticuerpos IgG anti-S1 del SARS-CoV-2 se han cuantificado mediante la técnica de CLIA con una mediana de 43 días (37-49 días) después de ser administrada la segunda dosis, y con una mediana de 30 días (30-33,7 días) después de ser inoculada la tercera.

Los grupos han sido definidos basados en los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 cuantificados tras la administración de la segunda dosis de la vacuna: seronegativos, con niveles inferiores a 50 AU/mL; respondedores bajos, con niveles entre 50 y 4,159 AU/mL; y respondedores altos, con niveles superiores o iguales a 4160 AU/mL.

A los pacientes receptores de trasplante hepático seronegativos se les ha evaluado la respuesta T específica frente al SARS-CoV-2 mediante citometría de flujo para comprobar si, a pesar de no tener inmunidad humoral, tenían inmunidad celular.

Este estudio se ha aprobado por el CEIm (código interno: 2021.391) y se han seguido las pautas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki.

4. RESULTADOS

4.1 COHORTE DE INFECCIÓN POR SARS-COV-2

Se han estudiado 192 pacientes con infección activa por SARS-CoV-2 al ingreso en el Hospital Marqués de Valdecilla, estableciendo también un *score* clínico en función de las necesidades terapéuticas: sin oxigenoterapia, gafas nasales, Ventimask, ingreso en UCI y fallecimiento.

4.1.1 COHORTE INICIAL

En esta cohorte se han incluido 155 pacientes positivos en COVID-19 al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, la mediana de días de ingreso fue de 1 día (RIC, 1-2). La mediana entre el inicio de los síntomas y el ingreso al hospital fue de 6 días (RIC, 3-9).

Se ha clasificado a los pacientes de esta cohorte según su evolución clínica posterior al ingreso en dos grupos: 73 pacientes leves sin necesidad de oxigenoterapia y 82 pacientes moderados-graves con requerimiento de terapia con oxígeno. Los pacientes con COVID-19 moderado-grave tenían una edad significativamente más avanzada y una saturación de oxígeno menor en el momento del ingreso que el grupo de enfermedad leve. También se ha observado que los pacientes moderados-graves tenían significativamente aumentados los niveles de diversos parámetros, como la proteína C reactiva, troponina, ferritina, LDH, C4 e IL-6 en comparación con aquellos que no necesitaban oxigenoterapia. Los niveles de dímero D también estaban aumentados en este grupo, pero no significativamente. En cuanto a las concentraciones de inmunoglobulinas en suero (IgG, IgA e IgM), no se han observado diferencias al ingreso entre ambos grupos, y la concentración de las mismas se ha mantenido dentro de los valores de rango normal, establecido por el servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

La siguiente tabla representa un resumen de los principales parámetros clínicos, analíticos y demográficos comparando ambos grupos de pacientes (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros demográficos, analíticos y clínicos de los 155 pacientes de la cohorte inicial analizados al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Para las variables paramétricas y no paramétricas, se muestra la media $\pm$ desviación típica, y la mediana (rango intercuartílico, RIC), respectivamente. Para las comparaciones entre las variables, se han utilizado los test t-Student y U-Mann Whitney. Para la comparación de frecuencias se ha utilizado el test Chi-cuadrado.

	Leves (n=73)	Moderados-graves (n=82)	Valor p	Valores de referencia
Demográficos				
Edad (años)	59 (47-77)	72 (63-79)	< 0,001	NA
Sexo (% de mujeres)	43 (58,90%)	26 (31,71%)	0,001	NA
Comorbilidades				
Hipertensión	30 (41,10%)	43 (52,44%)	NS (0,158)	NA
Diabetes tipo II	11 (15,07%)	17 (20,73%)	NS (0,360)	NA
Enfermedad cardíaca	12 (16,44%)	20 (24,39%)	NS (0,222)	NA
Enfermedad respiratoria	6 (8,22%)	8 (9,76%)	NS (0,739)	NA
Obesidad	12 (16,44%)	11 (13,41%)	NS (0,597)	NA
Parámetros bioquímicos				
Proteína C Reactiva (mg/dL)	2,9 (0,9-6,6)	6,5 (3,0-10,7)	0,001	0,1-0,5
Ferritina (ng/mL)	203,5 (105,5-603)	535 (224-1135)	< 0,001	10-291
Dímero D (ng/mL)	540 (313-992)	702 (389-1309)	NS (0,199)	0-500
Troponina (ng/mL)	5 (3-14)	11 (6-21)	0,006	0-40
Lactato Deshidrogenasa (LDH) (IU/L)	227 (173-277)	274 (223-362)	< 0,001	120-246
Saturación de O ₂ al ingreso (%)	97 (96-98)	95 (93-97)	< 0,001	NA
Hemograma				
Linfocitos (%)	23,40 (16,00-32,75)	16,65 (10,80-24,90)	0,001	20,0-50,0
Neutrófilos (%)	64,85 (54,35-74,40)	74,00 (65,30-81,40)	< 0,001	42,0-75,0
Monocitos (%)	8,70 (6,85-11,85)	7,05 (4,70-10,00)	0,003	2,0-13,0
Recuento de linfocitos (x10 ³)	1,20 (0,80-1,80)	0,90 (0,70-1,20)	0,001	1,2-5,0
Neutrófilos (x10 ³)	3,45 (2,30-4,90)	4,15 (2,70-5,90)	NS (0,077)	1,4-7,5

Monocitos ($\times 10^3$)	0,53 $\pm$ 0,27	0,45 $\pm$ 0,26	0,051	0,2-1,0
Factores inmunitarios del suero				
Inmunoglobulina G (IgG) (mg/dL)	1094,91 $\pm$ 351,20	1096,39 $\pm$ 344,30	NS (0,979)	734-1486
Inmunoglobulina M (IgM) (mg/dL)	98,18 (73,85 -134,31)	82,68 (51,42-133,88)	NS (0,078)	41-201
Inmunoglobulina A (IgA) (mg/dL)	262,36 $\pm$ 155,21	279,47 $\pm$ 135,86	NS (0,454)	49-401
C3 (mg/dL)	131,50 $\pm$ 33,02	133,32 $\pm$ 30,60	NS (0,724)	77-203
C4 (mg/dL)	31,04 (25,26-37,02)	35,44 (27,86-40,22)	0,019	7,7-50,5
Interleucina 6 (IL-6) (ng/dL)	26,68 (8,12-54,20)	33,88 (7,46-125,0)	0,048	0-30

Abreviaturas: NA, no aplicable; NS, no significativo; O₂, oxígeno; C3 y C4, componentes 3 y 4 del complemento.

4.1.1.1 Poblaciones del sistema inmunitario innato al ingreso

El sistema inmunitario innato desempeña la primera fase de cualquier infección viral (8, 12) y sus componentes celulares principales detectables en sangre periférica son los neutrófilos, monocitos, células NK e ILC. En los pacientes con COVID-19 activo incluidos en este estudio se han identificado diferentes patrones celulares inmunitarios innatos en el grupo de pacientes leves y en el de moderados-graves. De acuerdo con otras investigaciones (106, 107), en este estudio aquellos pacientes con un fenotipo más grave presentan una frecuencia de **neutrófilos** en sangre aumentada y de monocitos totales disminuida en el momento del ingreso (Figura 17 y Tabla 3, respectivamente). Específicamente, se ha observado un aumento significativo en la frecuencia relativa de **monocitos no clásicos** (CD14^{low}CD16^{high}) en el grupo de enfermedad leve ($p=0,01$; Figura 18 A). También se ha observado un aumento en el número absoluto de **células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3)** ($p < 0,001$; Figura 18 C) así como en la frecuencia relativa de células **NK con fenotipo regulador** (CD3⁺CD56^{high}CD16^{-/low}) ($p = 0,016$; Figura 18 B) en el grupo de los leves. El resultado del resto de subpoblaciones de monocitos, células NK e ILC se encuentran en la Tabla 4.

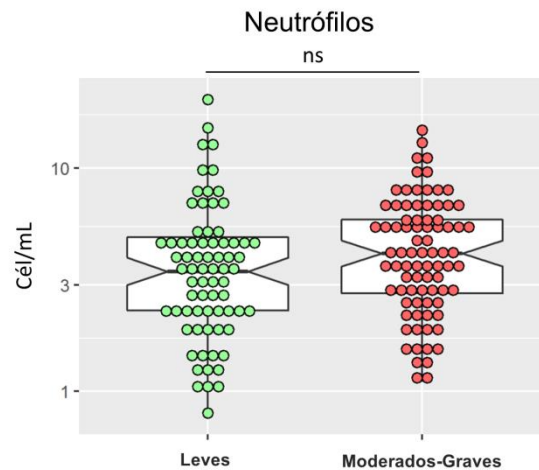


Figura 17. Número absoluto de neutrófilos en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se ha utilizado el test U Mann-Whitney para comparar medianas. Abreviaturas: ns, no significativo.

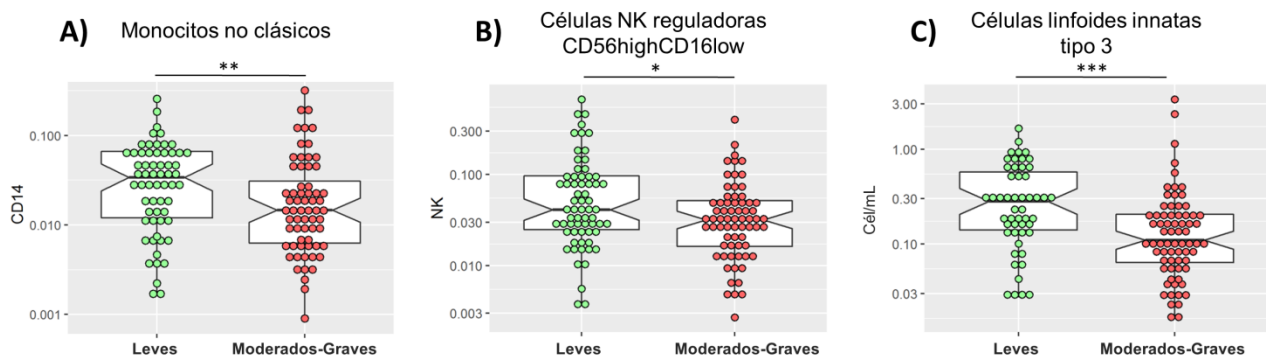


Figura 18. Frecuencia relativa de monocitos no clásicos **(A)** y células Natural Killer (NK) con fenotipo regulador **(B)**, y número absoluto de Células Linfoides Innatas de tipo 3 (ILC3) **(C)** en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para comparar medianas en A, B y C. Abreviaturas: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; y ***, $p < 0,001$.

Los TLRs son receptores inmunitarios innatos que juegan un papel importante a la hora de reconocer partículas virales. Entre los TLRs descritos en humanos, TLR3 y TLR7 se han visto implicados en la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2 (108, 109). De esta manera, se ha medido la expresión de TLR3, TLR7, y TLR4 como control. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en la expresión de TLRs entre los dos grupos de pacientes (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de parámetros inmunitarios innatos en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Para variables paramétricas y no paramétricas, se muestra la media $\pm$ desviación típica, y la mediana y rango intercuartílico (RIC). Para las comparaciones se han utilizado los test de t de Student y de Mann-Whitney, respectivamente. La expresión de los TLR ha sido calculada como el ratio de la intensidad de fluorescencia de la mediana (MFI) del control de isotipo/anticuerpo monoclonal del TLR.

	Leves (n=73)	Moderados-graves (n=82)	Valor <i>p</i>
Monocitos			
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 ^{low} CD16 ^{high})	3,4 (1,2-6,6)	1,5 (0,6-3,5)	0,010
Expresión de TLR3	1,1 (0,8-1,7)	1,1 (0,9-1,6)	NS (0,956)
Expresión de TLR4	2,1 (1,0-3,1)	1,7 (1,1-2,6)	NS (0,593)
Expresión de TLR7	1,4 (1,0-2,3)	1,3 (1,0-2,1)	NS (0,631)
Células NK			
% CD56/16 totales	13,77 (10,71-23,1)	17,25 (11,7-25,9)	NS (0,097)
% NKT (CD56 ⁺ CD3 ⁺)	5,05 (3,205-10,945)	4,52 (3,76-9,25)	NS (0,746)
# CD16/56	169 (114-277)	159 (98-230)	NS (0,205)
# NKT	59 (32,5-130)	44 (30-71)	0,019
% CD56 ⁺ CD16 ⁻ (NK reguladoras)	4,2 (2,5-9,7)	3,2 (1,6-5,1)	0,014
% CD56 ⁺ CD16 ⁺ (NK citotóxicas)	95,8 (90,3-97,5)	96,8 (94,8-98,3)	0,014
ILC1 (Lin⁻CD127⁺CD117⁻CD294⁻)	2,33 (1,33-4,64)	1,66 (0,94-3,88)	NS (0,198)
ILC2 (Lin⁻CD127⁺CD117⁺CD294⁺)	0,32 (0,13-0,73)	0,25 (0,11-0,44)	NS (0,497)
ILC3 (Lin⁻CD127⁺CD117⁺CD294⁻)	0,28 (0,14-0,60)	0,11 (0,06-0,21)	0,00028

Abreviaturas: TLR, receptor tipo Toll; NK, Natural Killer; NKT, Células T Natural Killer; #, recuento absoluto (Células/ μ L); ILC, células linfoides innatas; NS, no significativo.

4.1.1.2 Poblaciones del sistema inmunitario adaptativo al ingreso

Como se observa en la Figura 19, el grupo de pacientes moderados-graves presenta una marcada linfopenia.

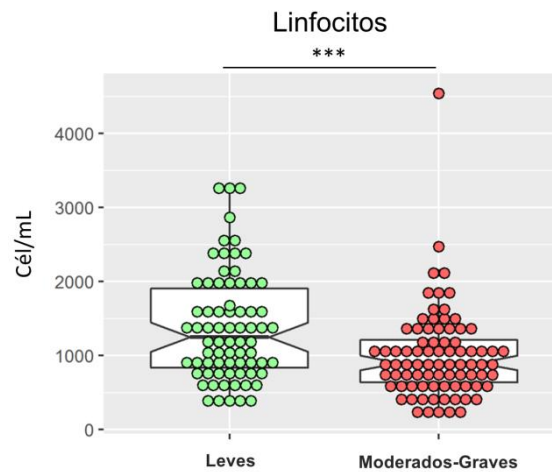


Figura 19. Número absoluto de linfocitos en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se ha utilizado el test U Mann-Whitney para comparar medianas. Abreviaturas: ***, $p < 0,001$

Se han evaluado específicamente las frecuencias relativas para evitar los sesgos en la interpretación con los números absolutos. Dentro de los grupos principales de linfocitos, el porcentaje de células T al ingreso estaba aumentado en el grupo de pacientes leves, mientras que las células B y NK se encontraban disminuidas en este mismo grupo comparado con el de los graves (Tabla 4 y Tabla 5). No se observaron diferencias en las frecuencias de células T CD4⁺ y CD8⁺ (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los principales grupos de linfocitos expresados como frecuencias relativas y números absolutos en sangre periférica en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Los valores se muestran como mediana y rango intercuartílico (RIC), y media $\pm$ desviación típica. El test de U-Mann-Whitney y T-student se han aplicado cuando ha correspondido.

	Leves (n=73)	Moderados-graves (n=82)	Valor <i>p</i>
%CD3	70,30 $\pm$ 10,79	65,81 $\pm$ 13,11	0,022
%CD4	45,33 $\pm$ 13,2	42,02 $\pm$ 12,93	NS (0,118)
%CD8	21,76 $\pm$ 11,74	20,18 $\pm$ 11,60	NS (0,403)
Ratio CD4/CD8	2,15 (1,39-3,74)	2,32 (1,36-3,83)	NS (0,498)
%CD19	10,56 $\pm$ 6,29	11,94 $\pm$ 10,30	NS (0,324)
#Linfocitos	1249 (836-1909)	904 (639-1216)	0,001
#CD3	866 (534-1406)	619 (367-839)	< 0,001
#CD4	553 (383-857)	358 (228-544)	< 0,001
#CD8	227 (122-476)	156 (86-297)	0,007
#CD19	105 (62-200)	82 (45-122)	0,762

Abreviaturas: #, recuento absoluto (Células/ μ L); NS, no significativo.

Dentro del subgrupo de células T CD4⁺, se ha observado un aumento de las frecuencias de las **Th1** (CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻), **Th1/Th17** (CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁺) y **Th1 de memoria** (CD4⁺CD45RO⁺ CXCR3⁺CCR6⁻) en el grupo de pacientes leves ($p= 0,057$, $p= 0,039$ y $p=0,030$, respectivamente) en comparación con los moderados-graves (Tabla 6, Figura 20 A).

Adicionalmente, se ha encontrado una ligera disminución de la frecuencia de células T con un fenotipo regulador (**Tregs**) en el grupo de pacientes moderados-graves ($p= 0,063$) respecto a los leves (Tabla 6).

En nuestro estudio, se ha observado una frecuencia aumentada de células **CD8⁺ activadas** (CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺) (Tabla 6 y Figura 20 B) y **exhaustas** (CD8⁺CD27⁻CD28⁻) circulantes en el grupo de los pacientes moderados-graves comparado con el de los leves (Tabla 6 y Figura 20 C) ($p= 0,028$ y $p= 0,019$, respectivamente).

Las frecuencias de las poblaciones **CD8 naïve** CD8⁺CD62L⁺CD45RA⁺ y CD8⁺CD27⁺CD28⁺ se han visto aumentadas en el grupo de pacientes leves ($p=0,026$ y $p= 0,004$, respectivamente) respecto a los moderados-graves (Tabla 6).

Las frecuencias en sangre de las poblaciones **Tc1** (CD8⁺CXCR3⁺CCR6⁻) y **Tc1/Tc17** (CD8⁺CXCR3⁺CCR6⁺) y **Tc17 de memoria** (CD8⁺CD45RO⁺CXCR3⁻CCR6⁺) se han encontrado aumentadas en el grupo de pacientes leves al ingreso comparado con el grupo de moderados-graves ($p=0,043$, $p=0,0003$ y $p=0,0003$, respectivamente), mientras que la frecuencia de **Tc1/Tc17 de memoria** (CD8⁺CD45RO⁺CXCR3⁺CCR6⁺) se ha encontrado ligeramente aumentada en el grupo de pacientes leves al ingreso respecto a los moderados-graves ($p=0,0002$) (Tabla 6).

Finalmente, se ha confirmado una alta proporción de **plasmablastos** (CD19⁺CD20⁻CD27^{high}CD38^{high}) en el grupo de pacientes moderados-graves ($p=0,002$) en comparación con los leves (Tabla 6, Figura 20 D).

Tabla 6. Comparación de las frecuencias de los subgrupos de células T y B entre el grupo de pacientes leves y el de los moderados-graves con COVID-19 al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Los valores se muestran como mediana (rango intercuartílico) para las muestras que no siguen una distribución normal; y media $\pm$ desviación estándar para las muestras con una distribución normal. Para las comparaciones se ha utilizado T-student y el test de U-Mann Whitney.

	Leves (n=73)	Moderados-graves (n=82)	Valor p
% Subgrupos de T helper (CD4+)			
CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺	86,7 (73,9-93,9)	87,1 (75,2-93,6)	NS (0,782)
CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁺	4,8 (3,1-8,1)	4,3 (2,5-7,2)	NS (0,695)
CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁻	0,6 (0,3-1,0)	0,8 (0,3-1,2)	NS (0,724)
CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁻	6,5 (1,0-16,8)	6,7 (2,0-13,6)	NS (0,927)
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Th1)	23,9 (18,3-34,8)	20,1 (15,3-30,0)	0,057
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ (Th1/Th17)	12,6 (8,7-16,0)	9,6 (7,1-14,0)	0,039
CD4 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ (Th17)	12,3 $\pm$ 5,0	12,4 $\pm$ 5,2	NS (0,907)
CD4 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CD294 ⁺ (Th2)	1,0 (0,7-1,7)	0,8 (0,4-1,3)	NS (0,830)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ (Th memoria)	62,8 (50,4-71,9)	58,1 (40,2-72,0)	NS (0,064)
CD4 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁺ (Naïve)	19,7 (12,7-29,3)	18,5 (9,9-31,3)	NS (0,290)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺ (TCM)	46,4 $\pm$ 13,9	48,3 $\pm$ 15,8	NS (0,234)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁻ (TEM)	24,5 (17,8-38,5)	21,3 (11,5-42,8)	NS (0,252)
CD4 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁻ (TEMRA)	1,4 (0,5-3,8)	1,3 (0,6-3,9)	NS (0,957)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Th1 memoria)	32,2 (26,9-44,4)	28,7 (24,0-38,0)	0,030
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Th1/Th17 memoria)	19,4 (16,1-25,2)	23,2 (17,5-26,0)	NS (0,137)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ (Th17 memoria)	21,1 $\pm$ 8,7	18,5 $\pm$ 7,9	NS (0,098)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CD294 ⁺ (Th2 memoria)	1,4 (1,0-2,7)	1,4 (0,7-2,6)	NS (0,769)
CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ (T _{FH})	0,2 (0,1-0,4)	0,3 (0,1-0,5)	NS (0,153)
CD4 ⁺ CD127 ⁻ CD25 ⁺ (Tregs)	6,4 (5,5-7,5)	5,7 (4,3-7,2)	NS (0,063)
% Subgrupos T citotóxicos (CD8+)			
CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺	57,1 (31,4-71,1)	37,6 (21,5-53,2)	0,004

CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺	2,1 (1,2-3,7)	2,2 (1,1-3,7)	NS (0,580)
CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁻	10,2 (7,4-16,2)	12,0 (6,5-19,0)	NS (0,219)
CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁻	27,7 (15,8-53,1)	44,5 (24,4-63,2)	0,019
CD8 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Tc1)	57,7 ± 2,4	50,9 ± 2,4	0,048
CD8 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ (Tc1/Tc17)	4,9 (3,2-9,5)	3,0 (1,8-4,6)	0,0003
CD8 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ (Tc17)	2,8 (1,0-8,1)	2,9 (1,0-5,7)	NS (0,738)
CD8 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CD294 ⁺ (Tc2)	0,7 (0,3-2,2)	1,2 (0,4-2,5)	NS (0,568)
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ (Tc memoria)	42,9 (34,9-57,7)	42,2 (35,2-57,6)	NS (0,749)
CD8 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁺ (Naïve)	25,9 (14,8-40,8)	19,2 (10,3-28,8)	0,026
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺ (TCM)	15,0 (10,0-19,2)	14,1 (8,8-21,7)	NS (0,942)
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁻ (TEM)	30,9 (23,9-38,7)	31,6 (22,6-44,6)	NS (0,780)
CD8 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁻ (TEMRA)	21,0 (11,8-34,4)	26,1 (14,3-38,1)	NS (0,125)
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Tc1 memoria)	61,7 ± 2,1	60,5 ± 2,2	NS (0,698)
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ (Tc1/Tc17 memoria)	2,5 (1,4-6,6)	2,8 (1,2-5,1)	0,0002
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ (Tc17 memoria)	10,7 (6,8-18,8)	6,5 (4,3-9,8)	0,0003
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CD294 ⁺ (Tc2 memoria)	1,6 (0,6-4,3)	1,5 (0,6-4,3)	NS (0,875)
CD8 ⁺ DR ⁺ CD38 ⁺	11,2 (5,3-20,5)	13,8 (8,8-25,6)	0,028

% Células B

B Naïve (CD27 ⁺ IgD ⁺)	65,3 (47,8-75,5)	63,8 (48,3-75,0)	NS (0,656)
B Unswitched (CD27 ⁺ IgD ⁺)	15,4 (9,0-23,4)	11,5 (8,3-21,5)	NS (0,196)
B Switched (CD27 ⁺ IgD ⁻)	15,9 (8,5-24,1)	17,0 (9,8-25,5)	NS (0,478)
Plasmablastos (CD19 ⁺ CD20 ^{low} CD27 ^{hi} CD38 ^{hi})	1,9 (0,8-5,8)	5,3 (1,6-9,7)	0,002
Células B foliculares (CD19 ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺)	0,6 (0,2-1,3)	0,6 (0,4-1,0)	NS (0,408)

Abreviaturas: Th, linfocito T helper; TCM, células T de memoria centrales; TEM, células T de memoria efectoras; TEMRA, células T diferenciadas terminalmente; Tregs, células T reguladoras; Tc, células T citotóxicas; T_{FH}, células T helper foliculares; NS: no significativo.

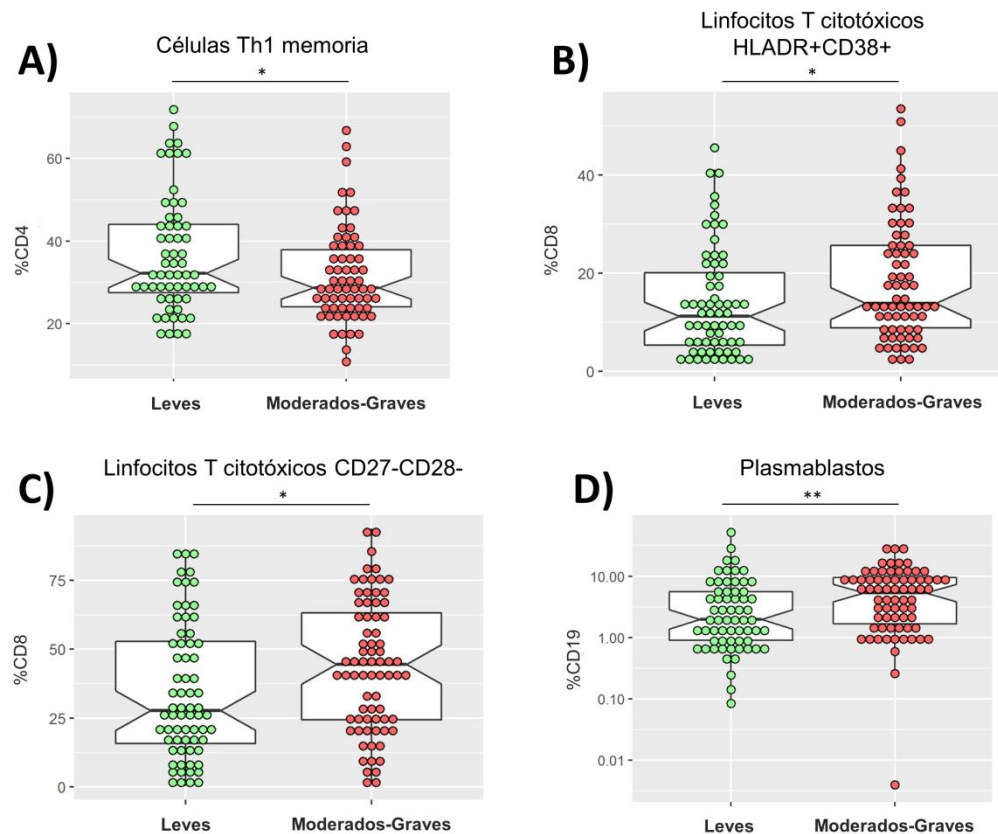


Figura 20. Frecuencia de células Th1 memoria (A), células T citotóxicas HLA-DR⁺CD38⁺ (B), células T citotóxicas CD27⁻CD28⁻ (C), y plasmablastos (D) en pacientes leves y moderados-graves con COVID-19 al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para comparar medianas en A, B, C y D. Abreviaturas: *, $p < 0,05$; y **, $p < 0,01$.

4.1.1.3 Respuesta de células T específica del SARS-CoV-2 en la enfermedad de COVID-19

La caracterización fenotípica de las células inmunitarias puede que no refleje su función y especificidad. Se ha evaluado la respuesta T específica frente a *pools* de péptidos de la fosfoproteína N, y las glicoproteínas M y S del SARS-CoV-2 a través de la activación de las PBMCs en un grupo de pacientes leves y en otro de moderados-graves. La respuesta se ha evaluado mediante la frecuencia de expresión de los AIMs (CD134 y CD25) tras 24 horas de estimulación. La estimulación policlonal de células T se ha realizado con *beads* anti-CD3/CD28 y se ha empleado como control positivo, mientras que un medio sin estimular ha actuado como control negativo. El índice global de estimulación para los antígenos del SARS-CoV-2 no ha mostrado diferencias significativas comparando ambos grupos de pacientes; leves y moderados-graves (Tabla 7).

Tabla 7. Expresión de CD134 y CD25 tras la estimulación con los antígenos específicos del SARS-CoV-2: N, M y S en pacientes con COVID-19 leve y moderado-grave al ingreso al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Los valores se muestran como mediana y rango intercuartílico (RIC). Para las comparaciones se ha empleado el test U-Mann Whitney.

	Leves (n=38)	Moderados-Graves (n=42)	Valor <i>p</i>
CD4; mediana (RIC)			
N	1,43 (0,82-2,96)	1,67 (1,04-2,80)	NS (0,305)
S	1,61 (0,83-3,20)	1,94 (1,62-3,01)	NS (0,551)
M	1,64 (0,99-3,11)	1,77 (1,03-2,90)	NS (0,380)

Abreviaturas: N, proteína de la nucleocápside; S, proteína de la espícula; M, proteína de la membrana; NS, no significativo.

4.1.1.4 Evaluación de los parámetros inmunitarios como factor pronóstico

Una vez realizado el análisis univariante con todas las variables identificadas en este estudio, se ha llevado a cabo una regresión logística multivariante donde se han seleccionado finalmente siete parámetros. La edad, concentración sérica de ferritina, dímero D y C4 junto con el número absoluto de linfocitos son variables que se obtienen de los análisis clínicos de rutina en el HUMV. Adicionalmente, hemos incluido dos variables inmunológicas nuevas: el porcentaje de los monocitos no clásicos y células CD8⁺ exhaustas sanguíneas. Ambos análisis están resumidos en la Tabla 8. El modelo de regresión logística se ha realizado siguiendo las pautas detalladas en el apartado 3.5.8 de Material y Métodos. El modelo es capaz de identificar al **78,2%** de los pacientes con riesgo de enfermedad COVID-19 moderada-grave, con una sensibilidad y especificidad de 71,4 y 72,2%, respectivamente (Figura 21).

Tabla 8. Análisis univariante y multivariante de los siete parámetros incluidos en el modelo de regresión logística.

Parámetros	Univariante			Multivariante		
	Valor <i>p</i>	OR	IC	Valor <i>p</i>	OR	IC
Edad	<0,001	1,033	1,013-1,053	0,015	1,038	1,007-1,069
Ferritina	<0,001	1,001	1,001-1,002	0,021	1,001	1,001-1,002
Dímero-D	0,226	1,000	1,000-1,000	0,010	1,000	1,000-1,001
# Linfocitos	0,002	0,999	0,999-1,000	0,023	0,999	0,998-1,000
C4	0,016	1,041	1,007-1,075	0,110	1,036	0,992-1,082
% CD8⁺CD27⁻CD28⁻	0,023	1,017	1,002-1,031	0,701	1,004	0,985-1,023
% Monocitos no clásicos (CD14^{low}CD16^{high})	0,288	0,18	0,000-29,826	0,908	1,712	0,000-0,000149

Abreviaturas: IC, Intervalo de Confianza; OR, odds ratio; #, número absoluto; C4, componente 4 del complemento.

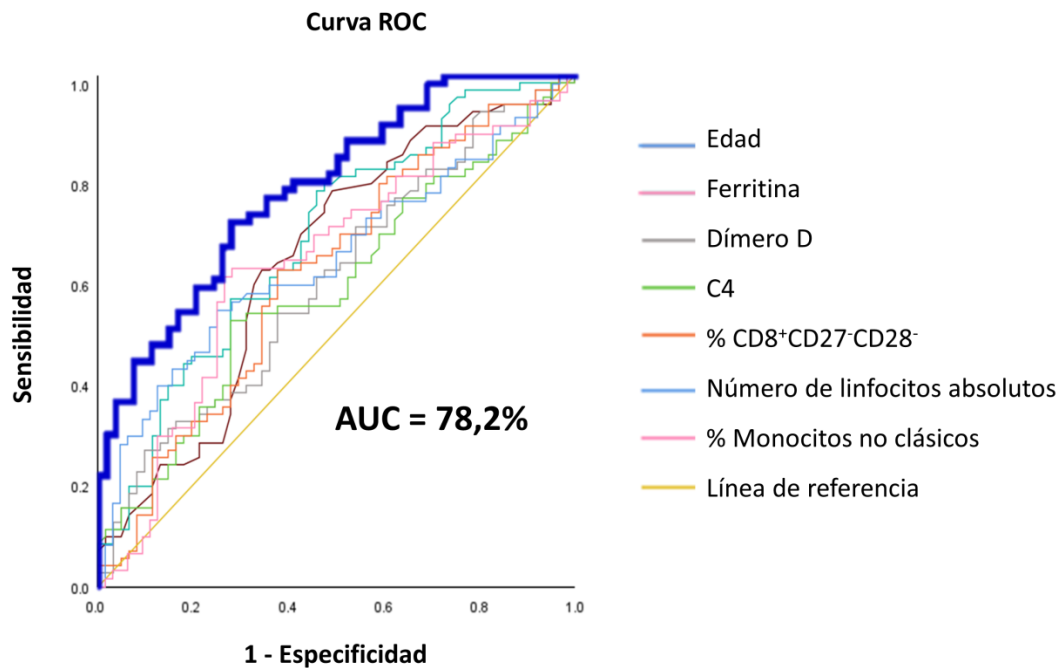


Figura 21. Análisis de curva ROC del modelo de regresión logística para la predicción de pronósticos de COVID-19 moderados-graves. Se representan análisis del área bajo la curva (AUC, de sus siglas en inglés) superpuestos (línea gruesa azul) e independientes de las variables incluidas en el modelo de regresión logística. El AUC de la probabilidad combinada se ha obtenido del modelo predictivo en la línea gruesa azul, calculado según las pautas seguidas del apartado 3.5.8 de Material y Métodos.

4.1.2 COHORTE DE VALIDACIÓN

Para poder corroborar los resultados obtenidos en la cohorte inicial, se ha analizado una cohorte independiente de validación compuesta por 37 pacientes con infección por SARS-CoV-2 activa al ingreso en el Hospital Marqués de Valdecilla, momento en el que se han recogido los datos de las siete variables del modelo de predicción.

Estos datos han permitido calcular un *score* de gravedad, un valor obtenido del resultado de la fórmula estadística detallada en el apartado 3.5.8 de Material y Métodos incluyendo las siete variables seleccionadas para el modelo (Figura 21). La fórmula corresponde con la siguiente:

$$\text{Logit (requerimiento de terapia con oxígeno)} = C + (\text{Edad} * B^{\text{Edad}}) + (\text{Ferritina} * B^{\text{Ferritina}}) + (\text{Dímero D} * B^{\text{Dímero D}}) + (\text{Linfocitos} * B^{\text{Linfocitos}}) + (C4 * B^{C4}) + (CD8^{+}CD27^{-}CD28^{-} * B^{CD8^{+}CD27^{-}CD28^{-}}) + (\text{Monocitos no clásicos} * B^{\text{Monocitos no clásicos}})$$

El valor resultante del *logit* (102) se ha transformado en probabilidad, con un rango entre cero y uno, según la fórmula " $e^{\text{logit}}/1+e^{\text{logit}}$ ". El punto de corte obtenido con el índice de Youden ha sido 0,35.

De este modo, se han categorizado los pacientes con más probabilidades de requerir terapia con oxígeno durante los siguientes días: aquellos con un *score* más cercano a "1" han tenido un pronóstico más desfavorable, necesitando gafas nasales o mascarillas de oxígeno para contrarrestar su saturación de oxígeno disminuida. Todos los parámetros incluidos en el modelo así como el *score* obtenido se encuentran detallados en la Tabla 9.

Finalmente, este modelo de regresión logística ha conseguido predecir el requerimiento de la terapia con oxígeno en el **88%** de los pacientes de la cohorte de validación con una sensibilidad y especificidad del 88,0 y 83,3% respectivamente (Figura 22). Finalmente, cabe decir que podría ser un modelo fácilmente transferible debido a que los parámetros incluidos pueden ser medidos en la mayoría de los hospitales.

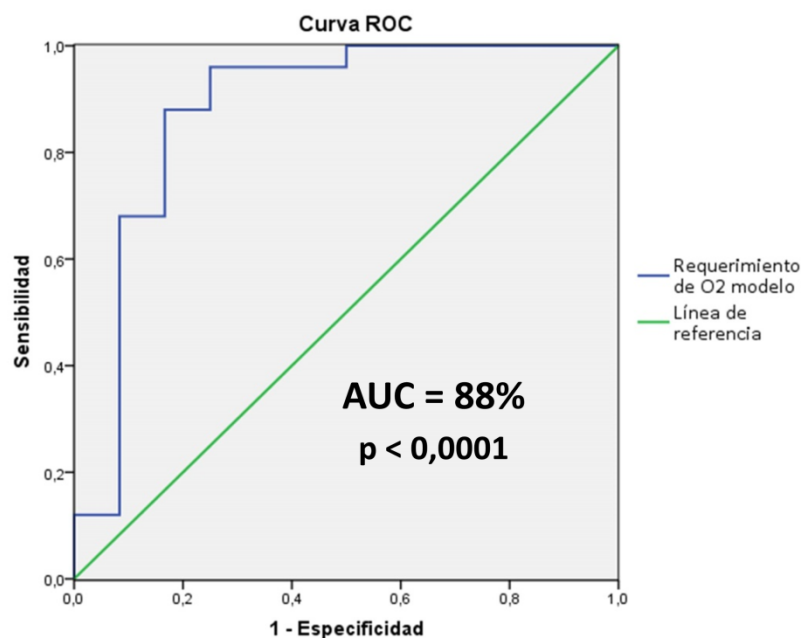


Figura 22. Análisis de curva ROC con una cohorte independiente de 37 pacientes para la validación del modelo de predicción realizado en la cohorte inicial. El punto de corte obtenido con el índice de Youden ha sido 0,35. El modelo ha predicho el requerimiento de oxígeno con un área bajo la curva (AUC) de 88%, un valor de $p < 0,0001$, y un intervalo de confianza del 95% (del 73,4 al 100%) y una sensibilidad y especificidad del 88,0 y 83,3%, respectivamente.

Tabla 9. Parámetros detallados de la cohorte independiente de 37 pacientes al ingreso en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) con COVID-19 confirmado. Esta tabla muestra variables como la edad, varios parámetros fácilmente detectables en sangre (ferritina, dímero D, C4, número absoluto de linfocitos y el porcentaje de células CD8⁺CD27⁻CD28⁻ y monocitos no clásicos CD14^{low}CD16^{high}), la probabilidad del requerimiento de terapia con oxígeno, y el requerimiento de terapia oxígeno en el modelo de validación y en la vida real.

Pacientes	Edad (años)	Ferritina (ng/mL)	Dímero D (ng/mL)	C4 (mg/dL)	Linfocitos absolutos (cell/ μ L)	CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁻ (%)	Monocitos no clásicos (%CD14 ^{low} CD16 ^{high})	Probabilidad	Requerimiento de O ₂ (modelo)	Requerimiento de O ₂ (vida real)
1	44	181	252	26.2	1012	0.7667	0.0141	0.18034	0	0
2	76	1641	460	25.58	538	0.2110	0.0257	0.834183	1	1
3	64	385	2223	32.22	646	0.5914	0.0096	0.634646	1	1
4	72	966	2023	16.04	1366	0.0728	0.0084	0.53404	1	1
5	53	896	583	38.33	193	0.1085	0.0043	0.692017	1	1
6	79	425	6753	35	1645	0.6610	0.1119	0.84663	1	1
7	92	1244	2150	32.96	1151	0.4806	0.0054	0.879898	1	1
8	85	186	687	27.33	633	0.1377	0.0312	0.628695	1	1
9	35	24	1396	36.42	968	0.0980	-	0.218145	0	0
10	75	346	9061	33.78	1522	0.0133	0.0832	0.900825	1	0
11	58	1074	458	39.67	336	0.1444	0.0071	0.74181	1	1
12	51	1676	184	19.05	1388	0.6018	0.0125	0.408566	1	1
13	44	392	223	28.54	617	0.2115	0.0329	0.298009	0	0
14	94	1263	3940	5.21	558	0.1721	0.0117	0.897028	1	1
15	71	150	285	22.65	1738	0.8523	0.1724	0.223678	0	1
16	102	397	2821	30.82	687	0.8357	0.3187	0.902219	1	1
17	83	903	902	50.3	761	0.9905	0.1411	0.880856	1	1
18	41	376	468	37.86	946	0.9181	0.0908	0.299852	0	0
19	48	240	738	17.87	1724	0.9436	0.0906	0.111857	0	0
20	69	148	843	15.28	805	0.9643	0.1236	0.35644	0	0
21	91	56	620	17.48	875	0.5329	0.0429	0.508285	1	1
22	86	226	6946	34.72	987	0.7611	0.0377	0.914988	1	1
23	62	1621	2847	29.14	268	0.0577	0.0132	0.894929	1	1
24	56	282	2056	26.02	707	0.3155	0.0471	0.461751	1	1
25	22	356	426	26.62	2062	0.1167	-	0.044941	0	0
26	82	190	624	16.54	1493	0.4686	0.0051	0.313619	0	1
27	81	699	2386	31.28	328	-	0.0081	0.858002	1	1
28	69	1260	524	35.39	683	0.5169	0.0063	0.768364	1	1
29	46	1491	2693	26.24	647	0.3607	0.0175	0.716718	1	1

30	54	275	272	27.03	686	0.5761	0.0287	0.329853	0	1
31	88	167	396	31.66	1026	0.6056	0.1152	0.592519	1	0
32	52	1013	476	26.63	528	0.5354	0.0131	0.535491	1	1
33	28	100	661	25.62	1744	0.0509	0.1005	0.062117	0	0
34	64	82	473	15.87	1896	0.2469	0.1510	0.128265	0	0
35	86	421	6319	24.08	767	0.6924	0.0341	0.901145	1	1
36	64	60	275	34.71	1309	0.2100	0.0039	0.295851	0	0
37	76	587	455	39.52	385	0.7451	0.0191	0.766261	1	1

Abreviaturas: C4, componente 4 del complemento; 0, no requerimiento de terapia con oxígeno; 1, requerimiento de terapia con oxígeno.

4.2 COHORTE VACUNAL

La cohorte vacunal corresponde con el segundo grupo principal analizado. Se han realizado estudios de la inmunidad humoral y celular en dos grupos diferentes de participantes: inmunocompetentes (sujetos de personal sanitario) e inmunocomprometidos. Dentro de este último grupo tenemos sujetos inmunosenescentes (sujetos institucionalizados en residencias de ancianos) e inmunosuprimidos farmacológicamente (pacientes receptores de trasplante hepático).

4.2.1 ESTUDIO DE LA INMUNIDAD EN PERSONAL SANITARIO

En este grupo de sujetos se ha estudiado la respuesta inmunitaria de células T, la respuesta celular T específica de antígenos del SARS-CoV-2 y la respuesta de células B y producción de anticuerpos.

4.2.1.1 Respuesta inmunitaria de células T entre dosis y al mes de la vacunación en personal sanitario

Históricamente, la evaluación de la respuesta vacunal se ha basado principalmente en la producción de anticuerpos específicos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las células T específicas deben activarse previamente para inducir la maduración de las células B en los centros germinales. Es por ello que se ha comparado la frecuencia de diferentes subpoblaciones de células Th tras la primera y segunda dosis de la vacuna BNT162b2. La frecuencia de la subpoblación de células Th memoria ($CD3^+CD4^+CD45RO^+$) fue significativamente mayor tras la segunda dosis, $p = 0,008$ (Figura 23 A). A su vez, la proporción del subtipo Th1 de memoria ($CD4^+CD45RO^+CXCR3^+CCR6^-$) ha aumentado también tras la segunda dosis ($p < 0,0001$) (Figura 23 B). Por otro lado, las células Th foliculares o T_{FH} ($CD4^+CXCR5^+PD1^+$) están involucradas en el cambio de clase y maduración de la afinidad de las células B en los centros germinales. Estas células pueden identificarse en sangre periférica y definirse como células pT_{FH} . En los sujetos estudiados se ha observado un aumento significativo en la frecuencia de las células pT_{FH} de memoria ($CD4^+CD45RO^+CXCR5^+PD1^+$) tras la primera y segunda dosis de la vacuna ($p = 0,032$) (Figura 23 C).

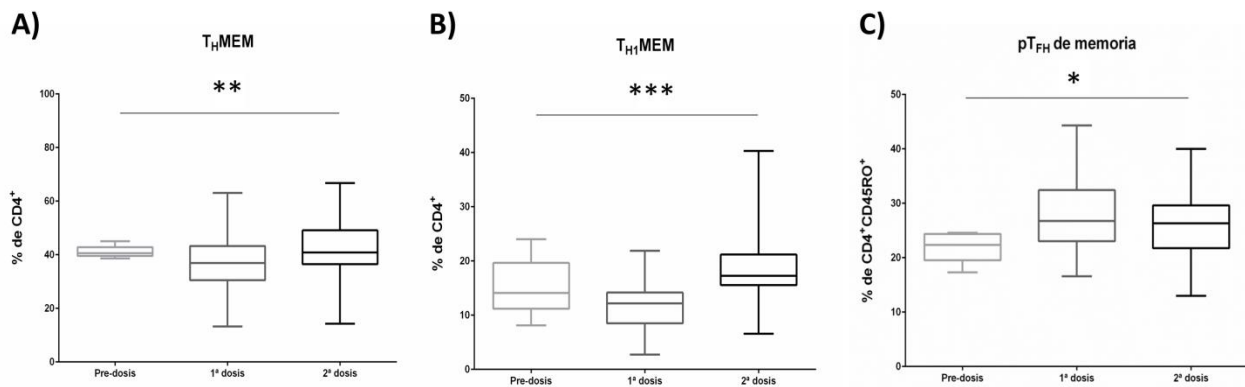


Figura 23. Evaluación de la respuesta inmunitaria de células T *helper* (Th) antes, durante y después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se encuentra representada la frecuencia de células Th de memoria (T_H MEM) (A), Th1 de memoria (T_H1 MEM) (B), y Th foliculares periféricas (pT_{FH}) de memoria (C), antes de la inmunización o pre-dosis (izquierda), y después de la primera (1ª, centro) y segunda dosis (2ª, derecha). Se ha utilizado el test de Kruskal-Wallis para comparar medianas en A-C. Las medianas y rango intercuartílico de las poblaciones en situación de pre-dosis, después de la 1ª y 2ª dosis, respectivamente, han sido: 40,6 (39,6-42,8), 37 (30,5-43,2) y 40,8 (36,5-49,1) (A); 14,1 (11,2-19,7), 12,2 (8,5-14,2) y 17,3 (15,5-21,2) (B); y 22,4 (19,5-24,4), 26,8 (23-32,4) y 26,3 (21,7-29,6) (C). Abreviaturas: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; y ***, $p < 0,0001$.

Además, se ha detectado un aumento significativo en la frecuencia de los subtipos pT_{FH1} y pT_{FH2} de memoria entre la primera y segunda dosis ($p < 0,0001$) (Figura 24 A y Figura 24 B). Por el contrario, se ha observado una notable disminución en de las células pT_{FH17} de memoria tras la primera dosis de la vacuna ($p < 0,0001$) (Figura 24 C).

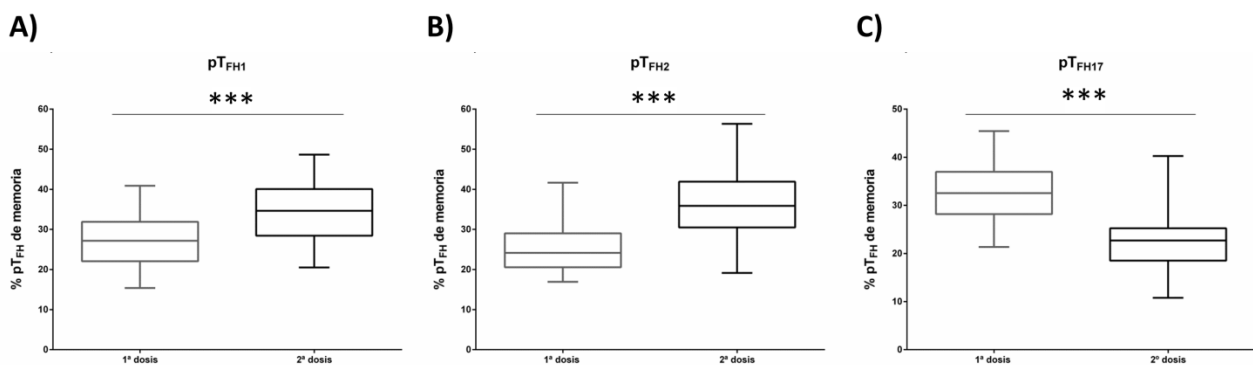


Figura 24. Evaluación de los subtipos de células T *helper* foliculares periféricas (pT_{FH}) de memoria después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se encuentra representada la frecuencia de los subtipos de células de memoria pT_{FH1} (A), pT_{FH2} (B), y pT_{FH17} (C) después de la primera (1ª, izquierda) y segunda dosis (2ª, derecha). Se ha utilizado el test de U-Mann-Whitney para comparar medianas en A-C. Las medianas y rango intercuartílico de las poblaciones después de la 1ª y 2ª dosis, respectivamente, han sido: 27,2 (22-31,9) y 34,6 (28,4-40) (A); 24,2 (20,6-29) y 35,9 (30,5-41,9) (B); y 32,5 (28,2-37) y 22,7 (19-25,3) (C). Abreviaturas: ***, $p < 0,0001$.

4.2.1.2 Respuesta inmunitaria celular T específica de antígenos del SARS-CoV-2 en personal sanitario vacunado

Como se ha descrito previamente en el apartado 3.5.4 de Material y Métodos, para evaluar la respuesta inmunitaria celular T específica, las PBMCs se han incubado con péptidos de SARS-CoV-2 utilizando también un control negativo y *beads* anti-CD3/CD28 como control positivo.

4.2.1.2.1 Entre dosis de la vacunación y un mes después de la segunda dosis

Treinta de cincuenta y dos sujetos (57,7%) presentaron una reacción específica positiva frente al *pool* de péptidos de la proteína S tras la primera dosis de la vacuna. Mientras que, tras la segunda dosis, 45 de 52 (86,6%) desarrollaron una respuesta T específica frente a esta proteína. Tras la primera dosis de la vacuna, la mediana y rango intercuartílico del porcentaje de dobles positivos de los AIMS frente al antígeno S con respecto al control fue 3,3 (2-4,4), y tras la segunda aumentó significativamente hasta 5,0 (3,9-7,2) ($p < 0,0001$). El punto de corte establecido para considerar un resultado positivo fue de 3,0 (100). Como era de esperar, al no estar dirigida la vacuna de la COVID-19 frente a los antígenos N ni M, la respuesta celular T CD4⁺ que se pueda producir frente a estos antígenos no se debe a la vacuna. Los casos positivos frente a alguno de estas proteínas podrían indicar un posible contacto previo al análisis, o entre dosis, con el virus del SARS-CoV-2 (Figura 25).

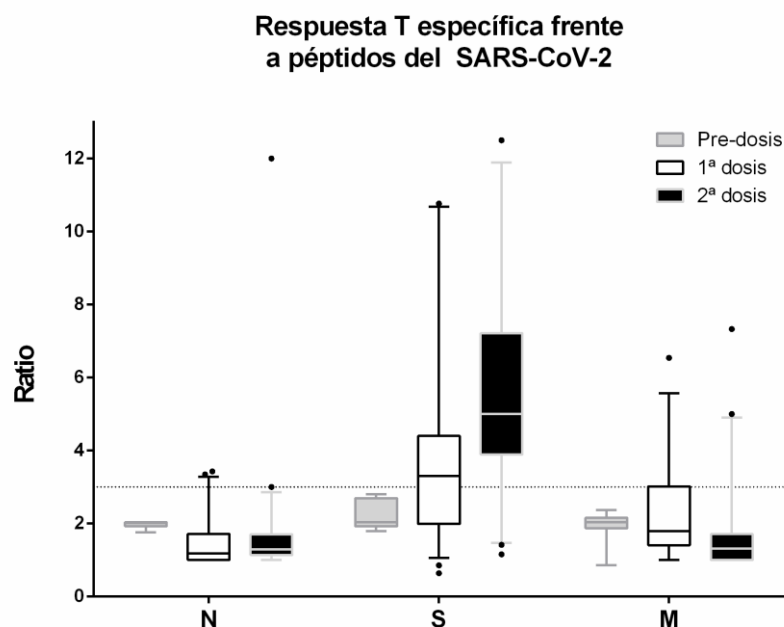


Figura 25. Evaluación de la respuesta celular T específica frente a péptidos del SARS-CoV-2 antes, durante y después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Ratio de las células T CD4⁺ tras la estimulación con el pool de péptidos de la proteína de la nucleocápside (N), de la espícula (S) y de la membrana (M) del SARS-CoV-2 en personal sanitario. En los diagramas de caja, el color gris representa el estado previo a la inmunización, y el blanco y el negro

corresponden al estado después de la primera y segunda dosis, respectivamente. El punto de corte para considerar una respuesta T CD4⁺ específica positiva se ha establecido en un ratio >3 (línea punteada).

En la Figura 26 se puede observar la evolución entre dosis de la respuesta inmunitaria celular T específica frente a cada uno de los péptidos N, S y M del SARS-CoV-2 por separado en los sujetos del personal sanitario.

Al igual que en la Figura 25, la repuesta frente al antígeno S (Figura 26 C) aumenta tras el “*boost*” de la segunda vacuna en la mayoría de los sujetos ($p=0,0001$). La respuesta anti-N (Figura 26 A) no ha resultado tener diferencias significativas, y la correspondiente al antígeno M (Figura 26 B) sufre una disminución significativa ($p=0,0003$) debido probablemente a que con la administración de la segunda dosis de la vacuna se han estimulado células T específicas anti-S más que frente a otros antígenos. El hecho de que, después de la segunda dosis tres sujetos positivicen la respuesta anti-M, se podría explicar por un posible contacto con el virus entre dosis.

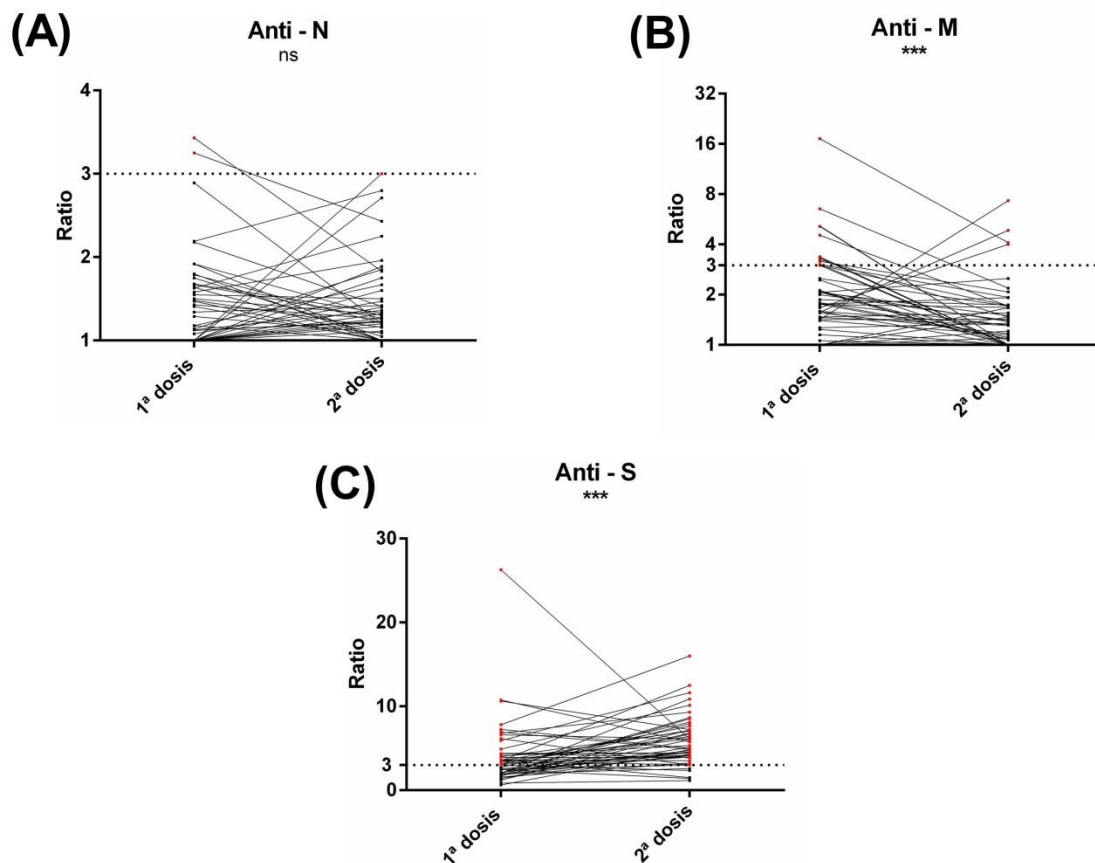


Figura 26. Evolución de la respuesta celular T específica frente a los antígenos S, N y M del SARS-CoV-2 entre la primera y segunda dosis de la vacunación completa en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se representa el ratio de las células T CD4⁺ tras la estimulación con el pool de péptidos del SARS-CoV-2 en personal sanitario. Los puntos conectados por una línea negra representan la evolución de la respuesta celular T específica entre dosis de cada sujeto frente a la proteína de la nucleocápside (N) (A), de la membrana (M) (B), y de la espícula (S) (C). Los puntos de color rojo corresponden a ratios de células CD4⁺ positivos, debido a que el punto de corte para considerar una respuesta T específica positiva se ha establecido en un ratio >3 (línea punteada). Abreviaturas: ns, no significativo; ***, $p < 0,0001$.

4.2.1.2.2 A los nueve meses de la segunda dosis de la vacuna

Nueve meses después de recibir las dos dosis de la vacuna, se ha podido reclutar a 38 de los 52 sujetos totales de personal sanitario.

Dentro de estos 38 sujetos, 34 (89,5 %) han tenido respuesta celular T CD4⁺ significativa frente al antígeno S al mes de la vacunación, mientras que posteriormente el porcentaje de respondedores se ha reducido hasta el 39,5 %: 15 sujetos de 38 han desarrollado una respuesta celular T específica anti-S 9 meses después de recibir la pauta de vacunación completa (Figura 27 A).

El estudio de la respuesta celular T específica frente a los otros dos antígenos del virus (Figura 27 B y Figura 27 C) nos muestra que, una vez pasados 9 meses de la administración de segunda dosis, la respuesta que desarrollan los sujetos frente a estos péptidos parece ser por causa de un contacto con el virus de SARS-

CoV-2 durante ese tiempo previo al análisis. En el caso del antígeno N, encontramos una respuesta celular T específica significativa al mes de la segunda dosis y a los 9 meses.

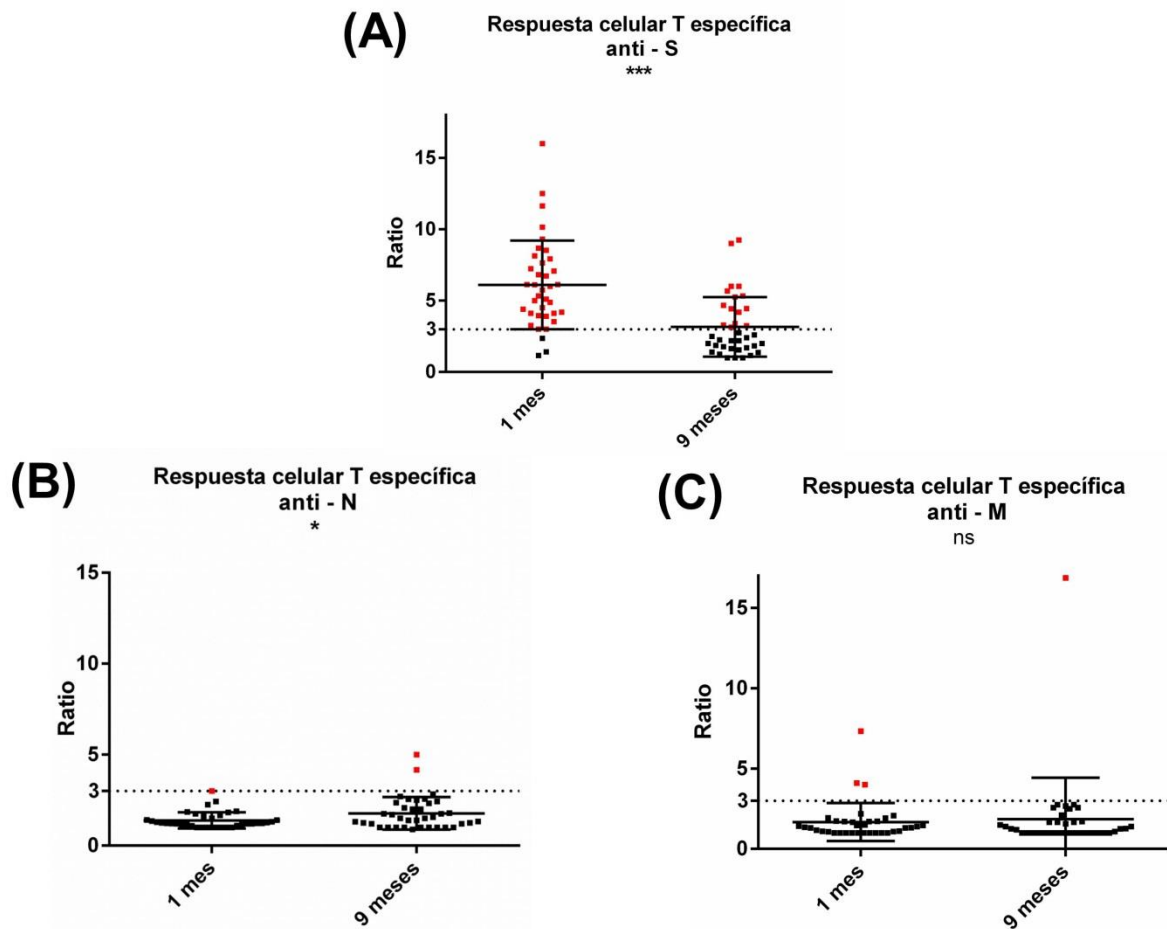


Figura 27. Evaluación de la respuesta celular T específica frente a los antígenos S, N y M del SARS-CoV-2 al mes y a los nueve meses de la segunda dosis en sujetos de personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se representa el ratio de las células T CD4⁺ después de uno y nueve meses de la vacunación completa en 38 sujetos del personal sanitario tras la estimulación con la proteína de la espícula (S) **(A)**; de la nucleocápside (N) **(B)**; y de la membrana (M) **(C)** del SARS-CoV-2. Los puntos de color rojo corresponden a ratios de células CD4⁺ superiores a 3, considerado punto de corte (línea punteada) para que una respuesta T específica sea positiva. Se ha utilizado el test de Wilcoxon para comparar medianas. Las medianas y rango intercuartílico del porcentaje de dobles positivos de los AIMs con respecto al control después de uno y 9 meses de la vacunación completa, respectivamente, han sido: 5,7 (4-7,8) y 2,4 (1,7-4,4) **(A)**; 1,2 (1,1-1,6) y 1,5 (1,0-2,3) **(B)**; y 1,4 (1-1,7) y 1,2 (1-1,7) **(C)**. Abreviaturas: ns, no significativo; *, $p = 0,01$; ***, $p < 0,0001$.

4.2.1.3 Respuesta inmunitaria de células B y anticuerpos en personal sanitario vacunado

Para evaluar la respuesta inmunitaria vacunal humoral B específica frente al SARS-CoV-2, en un primer lugar, se ha estudiado la frecuencia de células B de sangre periférica sin encontrar diferencias significativas entre la frecuencia de células B (CD19⁺) tras la primera y segunda dosis de la vacuna. En un segundo lugar, se ha estudiado el estadio de maduración de células B basado en la expresión del marcador

de superficie CD27 e IgD. Se han cuantificado las células SwM ($CD19^+CD27^+IgD^+$) observando un aumento significativo en su frecuencia después de la segunda dosis comparado con la primera ($p = 0,0054$) (Figura 28).

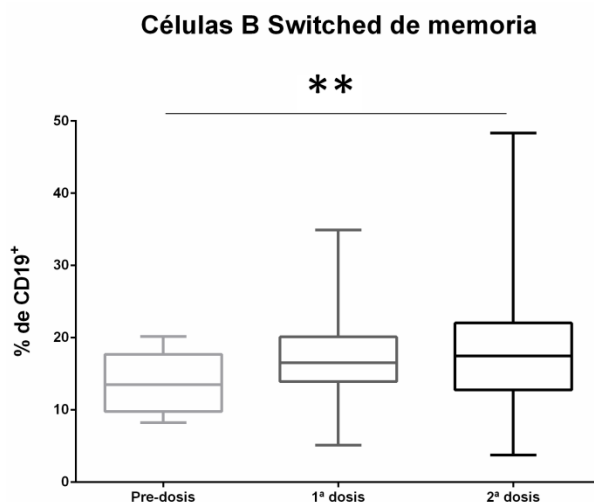


Figura 28. Evaluación de la respuesta vacunal específica de células B frente al SARS-CoV-2 antes, durante y después de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se muestra la frecuencia de las células B de memoria switched $CD19^+$ en sangre periférica antes de la inmunización (pre-dosis), y después de la primera y segunda dosis (1ª y 2ª dosis, respectivamente). Se la utilizado el test de Wilcoxon para comparar medianas. Abreviaturas: **, $p < 0,01$.

Una vez estudiadas las subpoblaciones de células B, se han evaluado los perfiles serológicos específicos (IgG, IgA e IgM) después de la vacunación con BNT162b2. Se han detectado anticuerpos IgG anti-S en 50 (94,34%), IgA anti-S en 10 (18,67%) e IgM anti-S en 13 (24,53%) de los 53 sujetos totales tras la primera dosis. Cabe mencionar que uno de los tres participantes no seroconvirtió a anticuerpos IgG específicos aunque sí produjo anticuerpos IgM. Al mes de la segunda dosis, todos los sujetos de este grupo de personal sanitario desarrollaron anticuerpos IgG (100%), y la frecuencia de los sujetos seropositivos para los otros dos isotipos también aumentó notoriamente: 22 (41,51%) tuvieron anticuerpos IgA y 20 (37,74%) IgM (Figura 29).

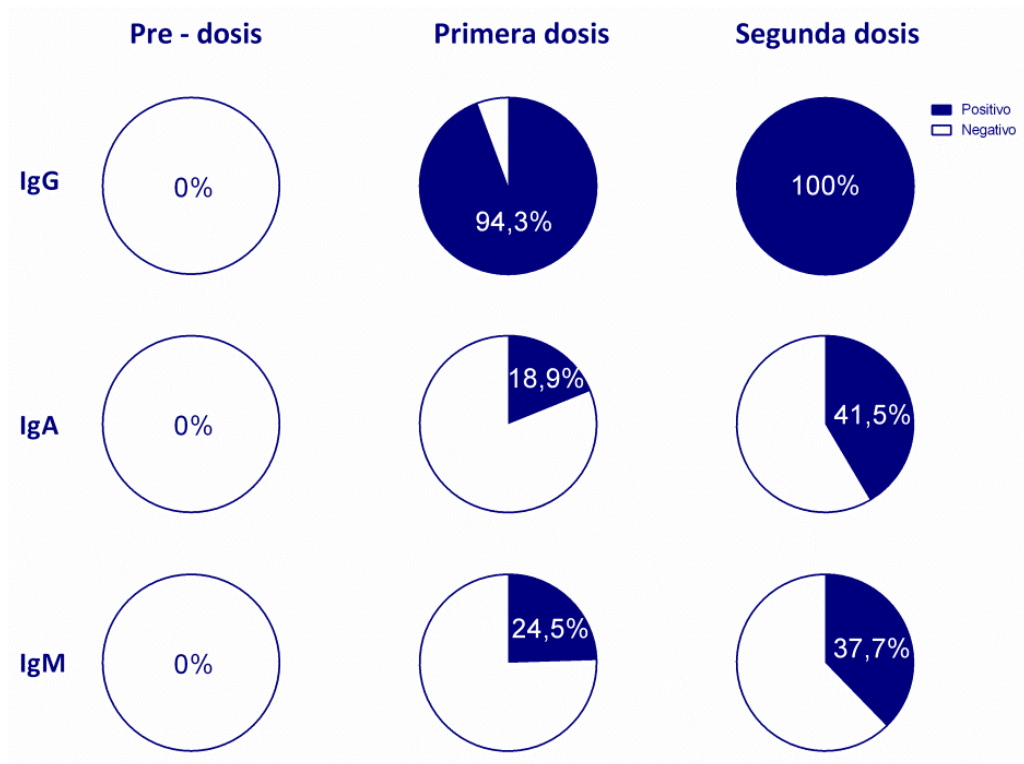


Figura 29. Evaluación de la respuesta vacunal específica de células B frente al SARS-CoV-2 al mes de la vacunación en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se muestra la frecuencia de los anticuerpos IgG, IgA e IgM específicos frente al SARS-CoV-2 antes de la inmunización (pre-dosis), y después de la primera y segunda dosis.

A los 9 meses de la segunda dosis de la vacuna, se evaluaron de nuevo los perfiles serológicos específicos de IgG, IgA e IgM en los 38 sujetos de personal sanitario que se pudieron reclutar de los 52 totales. En un análisis cualitativo, el 97% de los pacientes reclutados mantuvieron una respuesta humoral de anticuerpos IgG, el 8% de ellos tuvieron anticuerpos IgM y un 3% IgA (Figura 30).

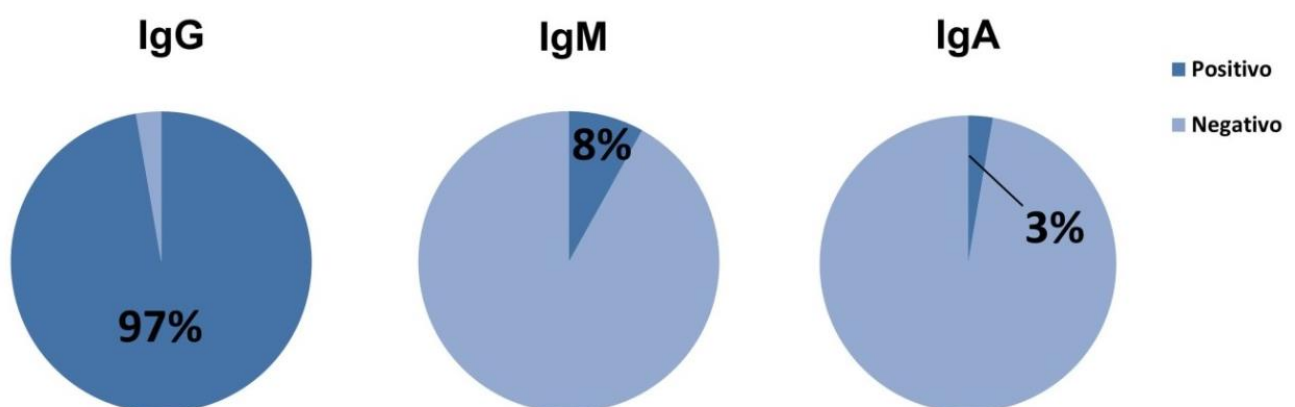


Figura 30. Evaluación de la respuesta vacunal específica de células B frente al SARS-CoV-2 nueve meses después de la segunda dosis de la vacuna en personal sanitario del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Se muestra la frecuencia de los anticuerpos anti-IgG, IgA e IgM específicos frente al SARS-CoV-2. Abreviaturas: IgG, inmunoglobulina G; IgM, inmunoglobulina M; IgA, inmunoglobulina A.

4.2.2 ESTUDIO DE LA INMUNIDAD DE SUJETOS INSTITUCIONALIZADOS EN RESIDENCIAS DE ANCIANOS

Se analizó la evolución de la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2 en un grupo especialmente sensible por su avanzada edad y diversas patologías asociadas: personas institucionalizadas en residencias de ancianos. Para evaluar la respuesta a la vacuna, se descartaron aquellos sujetos que habían tenido contacto previo al análisis con el virus, ya sea por la presencia de anticuerpos IgG anti-N o por haber tenido una PCR positiva.

Estudiamos la inmunidad en estos sujetos dos y seis meses después de la administración de las dos dosis de la vacuna BNT162b2. De los 624 sujetos totales con ambas dosis, se definieron dos grupos diferentes: uno con infección previa por el SARS-CoV-2, compuesto por 152 sujetos y descartado para el estudio de inmunidad; y otro sin infección previa, compuesto por 472 sujetos. De este grupo sin infección previa se estableció a su vez un subgrupo compuesto por 17 personas con PCR positiva después de la segunda dosis: dos de ellos tempranos, con una mediana de 89 días después de la administración de la segunda dosis; y quince tardíos, seis meses después, con una mediana de 209 días.

4.2.2.1 Estudio de la inmunidad de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos a los dos meses de segunda dosis de la vacuna

Dos meses después de la segunda dosis de la vacuna, de los 472 sujetos del grupo sin infección previa por el SARS-CoV-2, 448 (94,9%) desarrollaron respuesta humoral de anticuerpos, mientras que 24 de ellos fueron seronegativos. De estos 24 sujetos sin inmunidad humoral detectable (5,1%), se comprobó que la mitad tenía respuesta celular T específica a pesar de no tener protección humoral, mientras que la otra mitad no disponía de ningún tipo de protección, ni humoral ni celular (Figura 31).

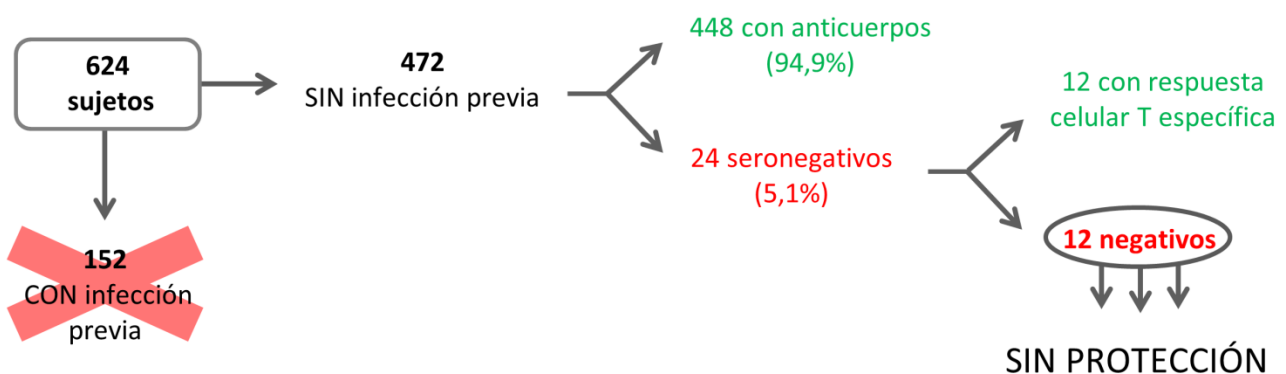


Figura 31. Evaluación de la respuesta inmunitaria a los dos meses de la segunda dosis de la vacuna en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria.

Se ha comprobado que, a los 2 meses de la segunda dosis, el 97,42% de estos sujetos respondieron a la vacuna sin infección previa al análisis por el SARS-CoV-2.

Para caracterizar correctamente los niveles de anticuerpos anti-S1, se definieron diferentes grupos (110): seronegativos, <50; respondedores bajos, 50-1050; moderados, 1050-4160; y respondedores altos, >4160 AU/mL. Adicionalmente, hemos evaluado el riesgo de infección post vacunación, analizando los niveles de anticuerpos anti-S1 a los dos meses en el grupo de sujetos sin infección previa al análisis por el SARS-CoV-2. La mediana y RIC de los niveles de anticuerpos anti-S1 en el grupo de sujetos infectados con PCR positiva tras la vacunación disminuyó en comparación con el grupo total de sujetos sin infección previa ($p = \text{NS}$): 662 (536-3515) y 1611 (570,9-4219), respectivamente. A continuación, después de un análisis de la curva ROC, identificamos 715 AU/mL como un valor por debajo del cual los sujetos podrían estar en riesgo de infección tras la vacunación ($p=0,069$), con una sensibilidad del 70,5% y una especificidad del 66,7%. El grupo de sujetos infectados con PCR positiva tras la vacunación se describe más detalladamente en el apartado 4.2.2.3.

En la Figura 32 se observa un aumento significativo de los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 en el grupo con infección previa al análisis, con una mediana y RIC de 19.669 (8.534-40.000) AU/mL comparado con el grupo sin infección previa con 1.611 (570,9-4.219) AU/mL. Como se refleja en la Figura 35, los niveles de anticuerpos se mantienen también elevados a los 6 meses de la vacunación.

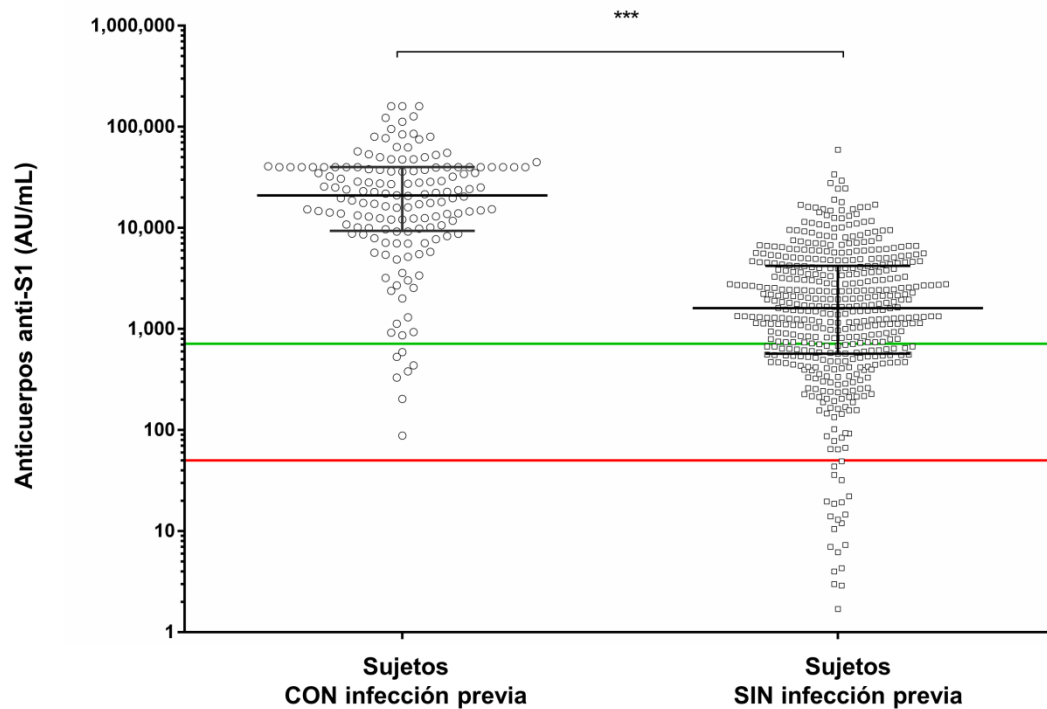


Figura 32. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los dos meses de la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria. Los círculos representan el grupo de sujetos con infección previa al análisis por SARS-CoV-2 y los cuadrados el grupo sin infección previa. Los niveles de anticuerpos anti-S1 por debajo de la línea roja (50 AU/mL) indican los sujetos identificados como seronegativos, mientras que aquellos por debajo la línea verde (715 AU/mL) podrían encontrarse en riesgo de infección. Abreviaturas: ***, $p < 0,0001$; AU, unidades arbitrarias.

4.2.2.2 Estudio de la inmunidad de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna

A los 6 meses de la segunda dosis de la vacuna, se reclutaron 558 sujetos de los 624 totales. De ellos, 137 tuvieron infección previa por el SARS-CoV-2, mientras que 421 no la presentaron. De estos 421 sujetos, 371 (88,12%) tuvieron respuesta humoral frente a la vacunación, mientras que 50 fueron seronegativos (11,88%). Dentro de los sujetos seronegativos sin anticuerpos detectables, se comprobó que 17 de ellos (34%) desarrollaron respuesta celular T específica y 33 fueron negativos (Figura 33).

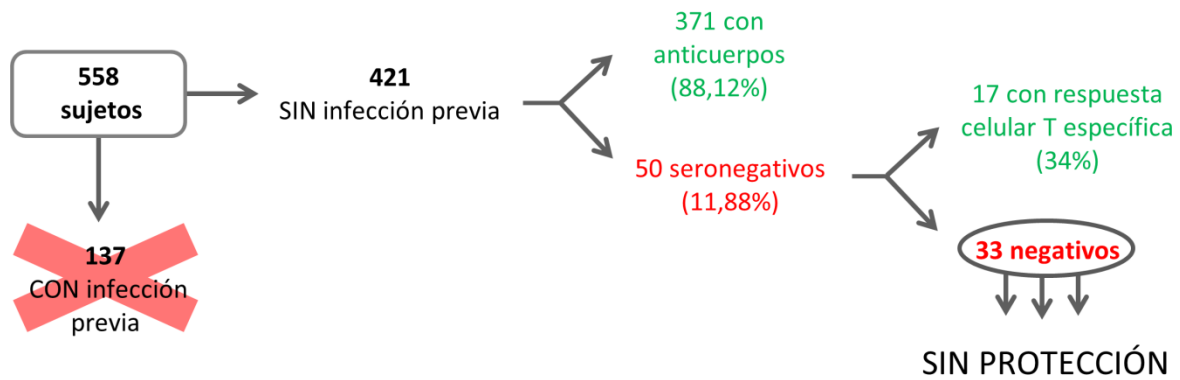


Figura 33. Evaluación de la respuesta inmunitaria a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria.

Se ha comprobado que a los a los 6 meses de la segunda dosis, el 92,16% de los sujetos de residencias respondieron a la vacuna sin infección previa al análisis por el SARS-CoV-2.

Comparando los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los 2 y 6 meses de la segunda dosis con BNT162b2, se ha comprobado que los niveles de estos disminuyen significativamente en el grupo de sujetos sin infección previa una vez pasados 6 meses, con una mediana y RIC de 252 (101,3-560) AU/mL (Figura 34 y Figura 35), mientras que el grupo de sujetos con infección previa al análisis siguen manteniendo niveles elevados de anticuerpos IgG anti-S1 con una mediana y RIC de 3.964 (1.721-12.910) AU/mL (Figura 35).

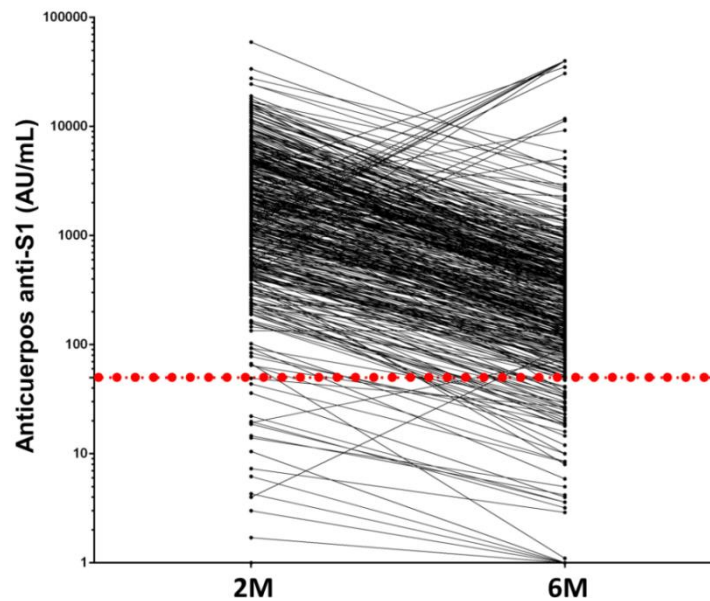


Figura 34. Comparación de los niveles de anticuerpos anti-S1 a los dos y seis meses (2M y 6M, respectivamente) en el grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria con las dos dosis de la vacuna BNT162b2 sin infección previa al análisis por el SARS-CoV-2. La línea roja punteada representa un nivel de anticuerpos anti-S1 de 50 AU/mL que se ha establecido como punto de corte mínimo para considerar anticuerpos IgG anti-S1 detectables, de manera que los sujetos con niveles de anti-S1 por debajo de este valor se han identificado como seronegativos. Abreviaturas: AU, unidades arbitrarias; 2M, 2 meses; 6M, 6 meses.

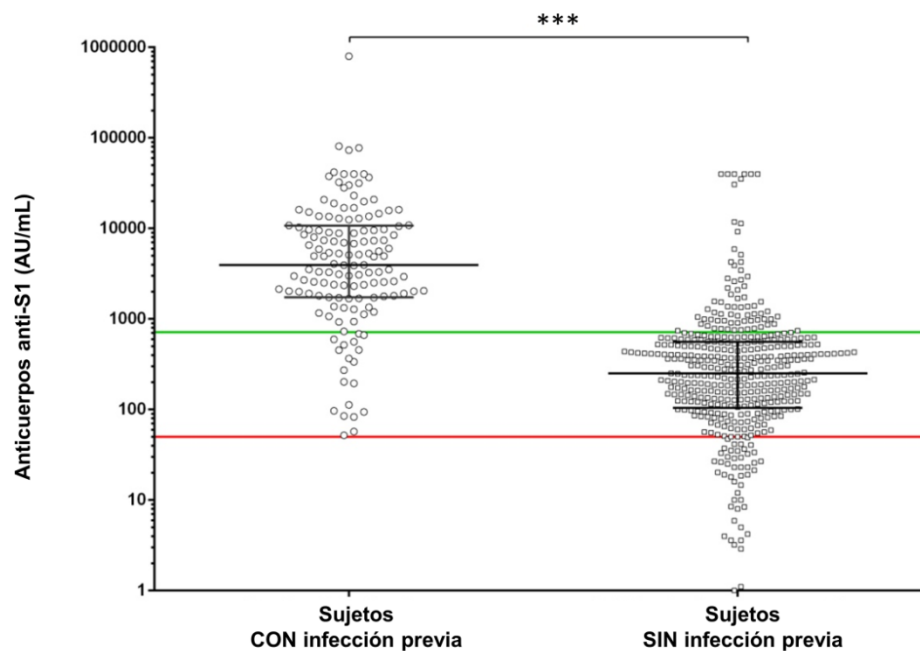


Figura 35. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 en sujetos de residencias de ancianos de Cantabria. Los círculos representan el grupo de sujetos con infección previa por SARS-CoV-2 (PI) y los cuadrados aquel con una evaluación completa de la vacunación (FVA). Los niveles de anticuerpos anti-S1 por debajo de la línea roja (50 AU/mL) indican los sujetos de residencias identificados como seronegativos, mientras que aquellos por debajo la línea verde (715 AU/mL) podrían encontrarse en riesgo de infección. Abreviaturas: ***, $p < 0,0001$; AU, unidades arbitrarias.

A los sujetos seronegativos a los seis meses, como se muestra en la Figura 33, se les ha realizado una evaluación de la respuesta celular T específica (Figura 36).

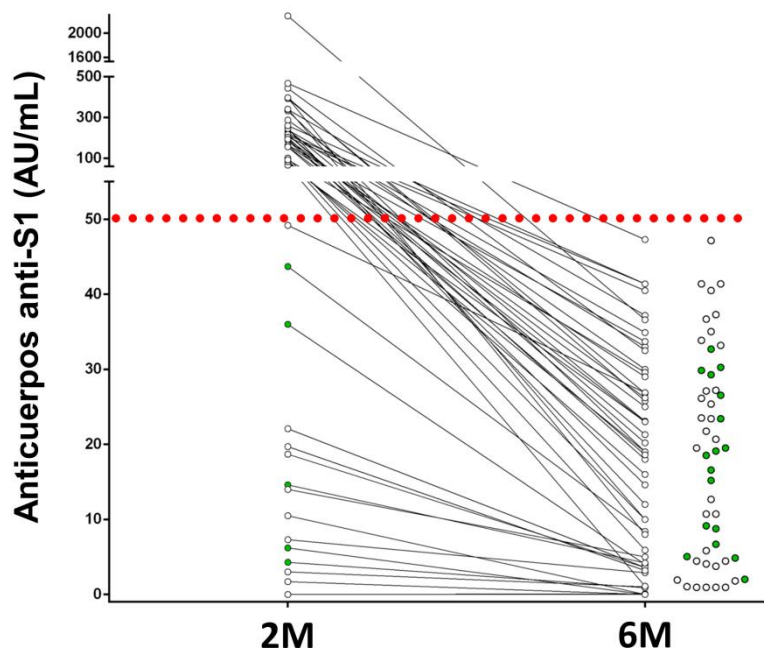


Figura 36. Niveles de anticuerpos IgG anti-S1 a los dos y seis meses en el grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria con las dos dosis de la vacuna BNT162b2 sin infección previa por el SARS-CoV-2 que han resultado ser seronegativos a los seis meses, y evaluación de su inmunidad celular T CD4⁺ específica (derecha). La línea roja punteada representa un nivel de anticuerpos anti-S1 de 50 AU/mL que se ha establecido como punto de corte mínimo para considerar anticuerpos IgG anti-S1 detectables, de manera que los sujetos con niveles de anti-S1 por debajo de este valor se han identificado como seronegativos. A continuación, a los sujetos seronegativos a los seis meses se les ha evaluado inmunidad celular T CD4⁺ específica. Los círculos verdes representan una respuesta celular T específica positiva, mientras que los círculos blancos muestran a aquellos sujetos sin inmunidad celular T CD4⁺ específica a la vacunación. Abreviaturas: AU, unidades arbitrarias; 2M, dos meses; 6M, seis meses.

Para comprobar esta disminución de los valores de los anticuerpos anti-S1 entre los dos y seis meses después de la vacunación, se ha realizado un análisis de regresión logística. El punto de corte obtenido con el índice de Youden para clasificar a los sujetos según su nivel de anticuerpos anti-S1 como seronegativos o no, ha sido 469,9 AU/mL. Es decir, aquellos sujetos con niveles inferiores a este valor a los dos meses tienen un riesgo muy elevado de ser seronegativos (<50 AU/mL) a los seis.

Finalmente, este modelo ha conseguido predecir correctamente, en un **96,8%** de los sujetos institucionalizados en residencias de ancianos a los dos meses de la segunda dosis de la vacuna sin infección previa, la ausencia o presencia de seronegatividad en los niveles de anticuerpos anti-S1 a los seis meses, con una sensibilidad y especificidad del 91,6% y 94,3% respectivamente (Figura 37).

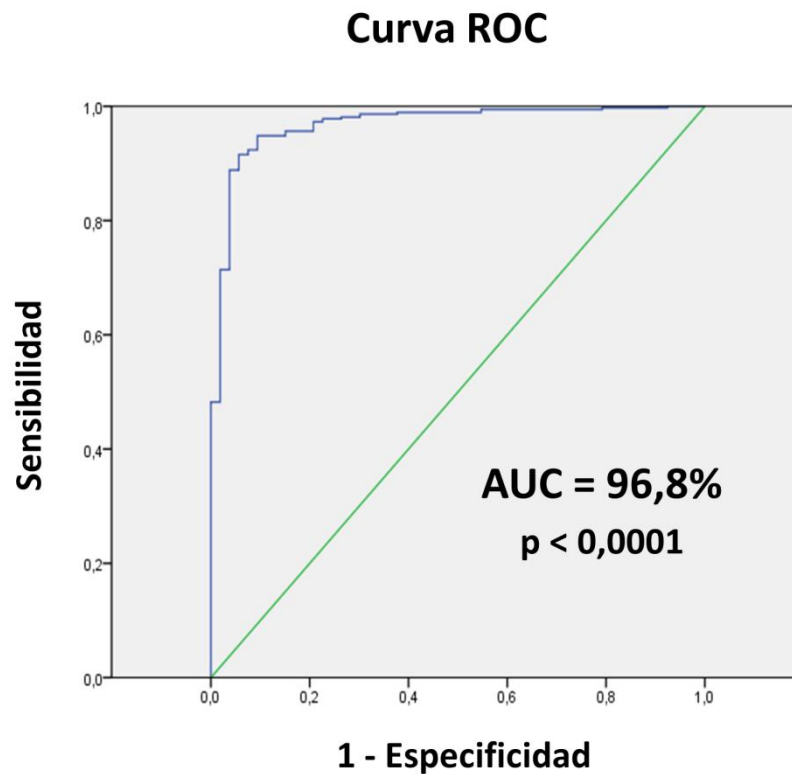


Figura 37. Análisis de la curva ROC para evaluar el riesgo de seronegativizar los niveles de anticuerpos anti-S1 a los seis meses de la segunda dosis de la vacuna en los sujetos institucionalizados en residencias de Cantabria. El punto de corte obtenido con el índice de Youden ha sido 469,9 AU/mL. La significación (p) ha sido $< 0,0001$, con un intervalo de confianza del 95% (del 94,4 al 99,1%) y una sensibilidad y especificidad del 91,6% y 94,3%, respectivamente. Abreviaturas: AUC, área bajo la curva.

4.2.2.3 Riesgo de infección por el SARS-CoV-2 en sujetos institucionalizados en residencias de ancianos tras la segunda dosis de la vacuna

De los 472 sujetos totales del grupo sin infección previa, diecisiete tuvieron una PCR positiva: dos de ellos entre los dos y seis meses de la segunda dosis, y el resto después de los seis meses. De estos diecisiete, doce fueron asintomáticos, mientras que cinco tuvieron síntomas y fueron hospitalizados. Sin embargo, cuatro de estos cinco sujetos con sintomatología se recuperaron, mientras que uno de ellos falleció por otras patologías ajenas a la COVID-19 (Figura 38).

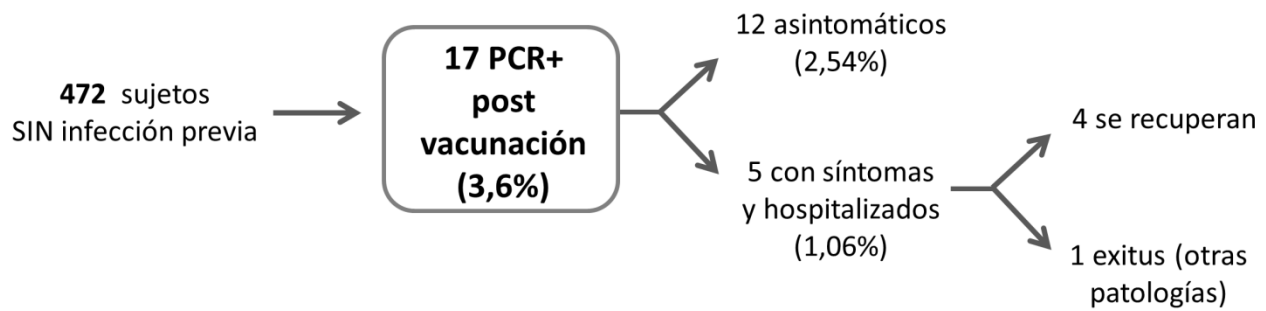


Figura 38. Esquema explicativo del grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria sin infección previa con PCR positiva posterior a la segunda dosis de la vacuna BNT162b2. Abreviaturas: PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

Como se ha detallado en el apartado 4.2.2.1, después de un análisis de la curva ROC, identificamos 715 AU/mL como un valor por debajo del cual los sujetos podrían estar en riesgo de infección.

Los niveles de anticuerpos anti-S1 a los dos meses de la segunda dosis de la vacuna que tenían estos diecisiete sujetos con PCR positiva del grupo sin infección previa, se muestran en la Figura 39, con una mediana y RIC de 1250 (543,2-2451).

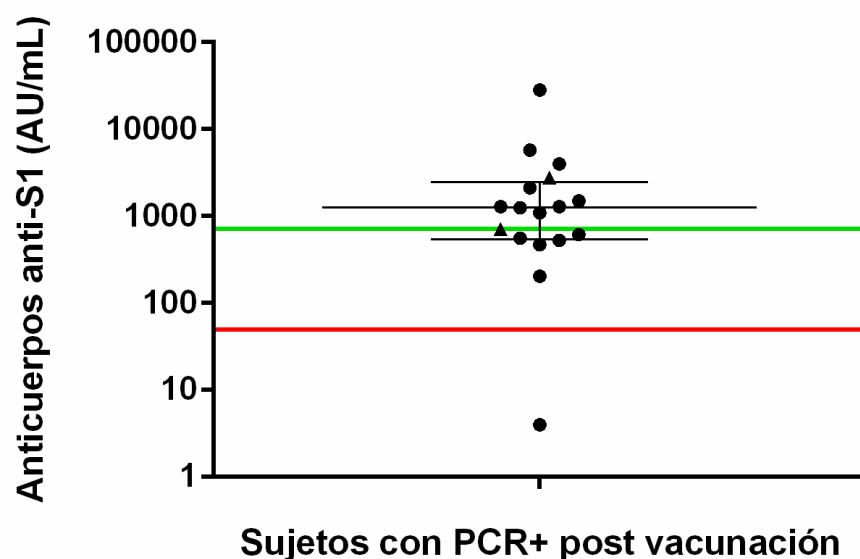


Figura 39. Niveles de anticuerpos anti-S1 a los dos meses de la segunda dosis del grupo de sujetos institucionalizados en residencias de ancianos de Cantabria sin infección previa por el SARS-CoV-2 con PCR positiva posterior a la vacuna BNT162b2. Los triángulos corresponden a los sujetos con PCR positiva entre dos y seis meses de la segunda dosis, mientras que los cuadrados representan aquellos con PCR positiva tras seis meses de la segunda dosis. Los niveles de anticuerpos anti-S1 por debajo de la línea roja (50 AU/mL) indican los sujetos de residencias identificados como seronegativos, mientras que aquellos sujetos por debajo la línea verde (715 AU/mL) podrían encontrarse en riesgo de infección. Abreviaturas: PCR, reacción en cadena de la polimerasa; AU, unidades arbitrarias.

4.2.3 ESTUDIO DE LA INMUNIDAD EN RECEPTORES DE TRASPLANTE HEPÁTICO

Otro grupo sensible a la vacunación frente al SARS-CoV-2 son los trasplantados de órgano sólido. Este tipo de pacientes se encuentran en una posición delicada debido a la medicación inmunosupresora que reciben para evitar el rechazo del órgano trasplantado. En este trabajo se han reclutado 129 pacientes receptores de trasplante hepático de la Unidad de Trasplante de Hígado del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Son pacientes que tienen un nivel de inmunosupresión más bajo que otros trasplantados de riñón o de pulmón de forma habitual. En estos pacientes se ha comprobado que tras dos dosis de la vacuna mRNA-1273 SARS-CoV-2 la mediana y RIC de IgG anti-S1 es de 3594 (644–11.515) AU/mL, mientras que tras la tercera dosis aumentó hasta 29.783 (10.726,5–40.287,5) AU/mL (Figura 40 A).

En esta cohorte se quiso evaluar el efecto de una tercera dosis de la vacuna. Para ello se establecieron grupos en función de la respuesta a la segunda dosis a partir de los niveles de anti-S1 antes de la tercera dosis: respondedores altos (niveles ≥ 4160 AU/mL), respondedores bajos (niveles entre 50 - 4159 AU/mL) y seronegativos (niveles < 50 AU/mL) (Figura 40 A). Tras dos dosis de la vacuna, dieciséis receptores de trasplante hepático fueron seronegativos (12,4%); cincuenta y uno, respondedores bajos (39,6%); y sesenta y dos, respondedores altos (48%). Tras la tercera dosis se encontraron solo cuatro seronegativos (3,1%) y ocho respondedores bajos (6,2%), mientras que fueron ciento diecisiete los que tuvieron una respuesta alta (90,7%) (Figura 40 B). Dentro de los cuatro pacientes seronegativos, uno de ellos (25%) desarrolló una respuesta celular T específica frente a la vacuna tras recibir la tercera dosis.

Después de la tercera dosis, se detectó una respuesta inmunitaria funcional en 126 de los 129 receptores de trasplante hepático totales (97,67%).

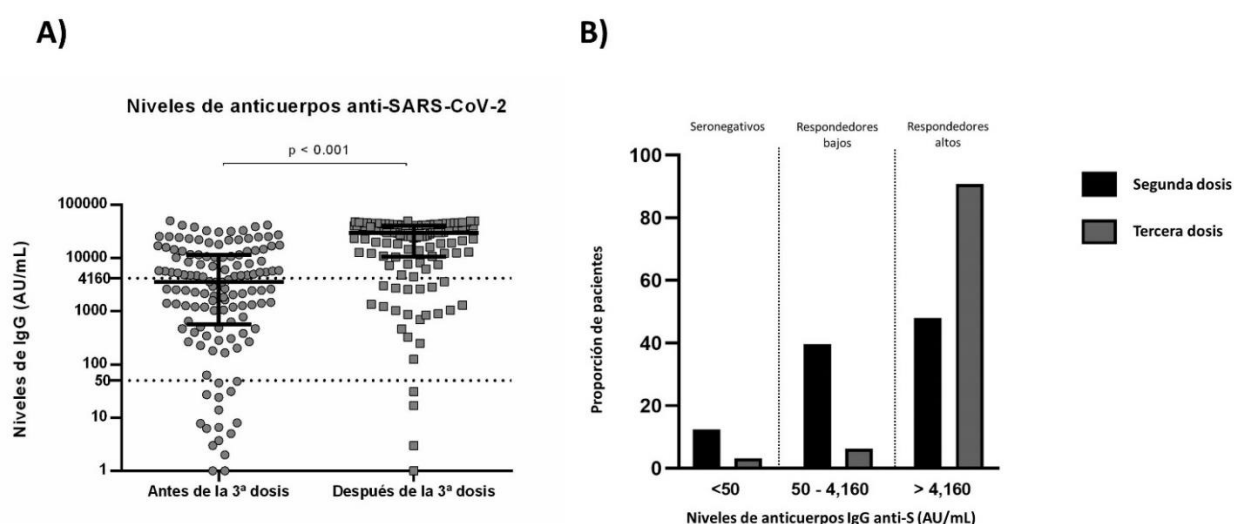


Figura 40. Respuesta humoral después de la tercera dosis de vacunación en receptores de trasplante hepático del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Se representa el nivel de anticuerpos IgG anti-S1 tras la segunda y tercera dosis de la vacuna mRNA-1273 SARS-CoV-2 en la cohorte de receptores de trasplante hepático. Las líneas punteadas horizontales representan los

distintos niveles de respuesta: bajo la línea inferior estarían los seronegativos, entre las dos líneas los respondedores bajos, y por encima de la línea superior los respondedores altos (**A**). En la figura **B** se representa el porcentaje de receptores de trasplante hepático según la respuesta después de la segunda y tercera dosis de la vacuna mRNA-1273 SARS-CoV-2.

Tras la tercera dosis seroconvirtieron el 75% de los casos seronegativos para la segunda dosis. También, los pacientes con respuesta baja aumentaron sus niveles de anticuerpos significativamente, aunque algunos de ellos se mantuvieron por debajo del umbral que se ha definido como estado de respondedor alto. Los respondedores altos también aumentaron sus niveles de anticuerpos de manera significativa. Adicionalmente, uno de los cuatro sin respuesta humoral, tuvo respuesta inmunitaria celular T específica tras la tercera dosis (Figura 41).

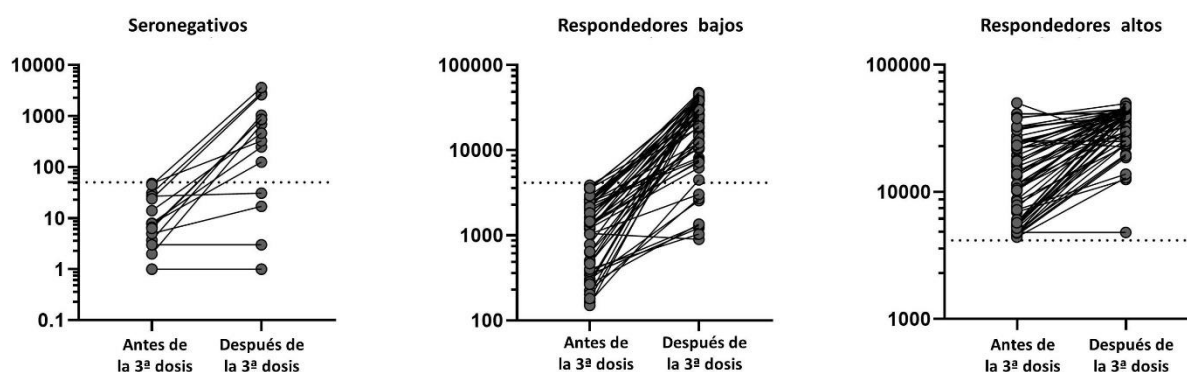


Figura 41. Niveles de anticuerpos IgG anti-S1 tras la segunda y tercera dosis de la vacuna mRNA-1273 SARS-CoV-2 en receptores trasplante hepático del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Estos pacientes se encuentran divididos en diferentes niveles de respuesta humoral: seronegativos (izquierda), respondedores bajos (centro) y respondedores altos (derecha). Cada paciente está representado por 2 círculos con una línea que los conecta. La línea punteada representa el límite de anticuerpos anti-S1 por debajo de la cual los pacientes son seronegativos.

Los receptores de trasplante hepático que no han desarrollado una respuesta humoral de anticuerpos tras la tercera dosis, recibieron una dosis mayor de micofenolato mofetil y tenían una filtración glomerular inferior.

5. DISCUSIÓN

Una respuesta inmunitaria adecuada frente al SARS-CoV-2 es determinante en el aclaramiento de la infección y en la ausencia de complicaciones. Precisamente, el estado hiper-inflamatorio que caracteriza a los casos más graves de COVID-19 puede conllevar consecuencias fatales. Así, poco después del comienzo del estado pandémico declarado por la OMS, ya se habían identificado diferentes parámetros pronósticos de muerte, como la edad avanzada, y otros asociados a inflamación, como la linfopenia y la elevación de los niveles del dímero D, IL-6, troponina, ferritina y lactato deshidrogenasa (LDH) (20). La neutrofilia (111) y el aumento de subpoblaciones de monocitos (112) también se han observado en pacientes ingresados por COVID-19. Por otro lado, se han visto alteradas en estos pacientes con síntomas graves otras poblaciones celulares del sistema inmunitario adaptativo, como las células T citotóxicas activadas y exhaustas (113), así como un aumento de la población de plasmablastos (106).

Al analizar el perfil inmunológico completo de los pacientes de la cohorte de infección del presente estudio, se han obtenido resultados comparables a investigaciones previas (112, 113) (Tabla 4 y Tabla 6). Dentro de las diferencias encontradas en el sistema inmunitario innato entre pacientes con COVID-19 leves y graves, se encuentra un sesgo disfuncional en la población de neutrófilos descrita por Schulte-Schrepping *et al* (114). En nuestra cohorte encontramos una marcada **neutrofilia** en el grupo de pacientes con mal pronóstico que podría relacionarse con un proceso denominado “mielopoyesis de emergencia”. Este proceso parece ser propio de infecciones complicadas en donde se reponen granulocitos funcionales y otras células hematopoyéticas movilizando células mieloides inmaduras que, a su vez, se relacionan con funciones inmunosupresoras favoreciendo un curso más grave de la infección (114). Por otro lado, en una infección de este calibre cabría esperar que estos pacientes se caracterizaran por una linfocitosis para combatir al patógeno, sin embargo, lo que hemos observado ha sido una marcada **linfopenia** ya descrita en pacientes con COVID-19 grave. En las infecciones virales existen varios mecanismos para desencadenar esta reducción linfocitaria en sangre. En el caso concreto de la infección por SARS-CoV-2 parece que la infección viral podría inducir linfopenia mediante procesos de muerte celular, inhibiendo la linfopoyesis dañando órganos linfoides, “secuestrando” este tipo de células en órganos diana específicos (alveolos pulmonares, tracto gastrointestinal u órganos linfoides), aumentando moléculas co-inhibidoras, provocando desórdenes metabólicos como el aumento de ácido láctico, y aumentando citocinas (IL-6), quimiocinas y otros factores de crecimiento (115, 116). Sin embargo, la **IL-6** es una citocina que merece más investigación, ya que aunque para la infección grave por SARS-CoV-2 tiene propiedades pro-inflamatorias, también tiene otras características de carácter anti-inflamatorio promoviendo la diferenciación y maduración de las células T y B y estimulando la producción de inmunoglobulinas por parte de estos últimos (117). La IL-6 parece tener una función protectora en distintos pronósticos de COVID-19: durante las infecciones asintomáticas, combatiendo la replicación viral; durante infecciones leves o moderadas, modulando la liberación de granzimas y citocinas; y en casos críticos de la enfermedad, aportando propiedades homeostáticas para

facilitar la reparación tisular (118). De hecho, se ha observado que la IL-6 se encuentra aumentada en monocitos de pacientes críticos que han sobrevivido a la infección (119). De este modo, los inhibidores de esta citocina, en concreto los anticuerpos monoclonales frente al receptor de la IL-6 (IL-6R) como el tocilizumab, solo serían efectivos en casos graves de COVID-19 (118).

Por otro lado, encontramos una frecuencia aumentada de los **monocitos no clásicos** en el grupo de los pacientes leves comparado con el de los graves (120), lo cual podría indicar que estos sujetos se encuentran en un proceso de eliminación viral: este subtipo de monocitos está relacionado con la restauración del equilibrio inflamatorio y recuperación tisular (121). De hecho, el marcador CD16, específico de los monocitos no clásicos, se ha identificado como predictor de mortalidad en pacientes críticos de COVID-19 (119).

El papel de las ILCs en la respuesta inmunitaria antiviral, en concreto el de las ILC1, se encuentra descrito en estudios previos (58, 122), y aunque la reducción de ILC1 que observamos en los pacientes con peor pronóstico de la cohorte inicial no es significativa, coincide con lo descrito por García *et al.* (122) donde se describe a este subtipo celular como importante a la hora de la eliminación del citomegalovirus en ratones. Adicionalmente, a pesar de no encontrar tampoco diferencias significativas en las ILC2, valores bajos de este subtipo celular sugieren un pronóstico más grave de la enfermedad COVID-19; de hecho, desempeñan un papel importante en la reparación tisular pulmonar durante la infección por influenza A en ratones. Ambos subtipos de ILC requieren más investigaciones en humanos para esclarecer su papel en la infección por SARS-CoV-2 (122). En comparación con estos subtipos celulares, las **ILC3** existen principalmente en tejido mucoso intestinal, y actúan manteniendo la homeostasis y contribuyendo a las respuestas inflamatorias. Aunque su papel en la mucosa respiratoria no está del todo claro y nuestros hallazgos son en sangre periférica, hemos observado una reducción de esta población en los pacientes graves al ingreso con COVID-19. Adicionalmente, la relación entre la ILC3 tisular y sanguínea no está establecida por el momento y requiere más investigación (123).

La función de los **TLRs** ha sido estudiada extensamente en las infecciones virales. En concreto, TLR3 y TLR7 se han visto implicados en la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2 (108, 109), siendo clave en las infecciones por los virus de tipo ARN (124). El TLR4 se ha visto implicado en la hiperinflamación propia de la COVID-19, ya que el SARS-CoV-2 se une a este receptor para activarlo y aumentar la expresión de ACE2 para facilitar la entrada del virus a la célula (125). También, se han estudiado variantes del TLR7 con pérdida de función (126). Cabe decir que nuestro grupo de pacientes con COVID-19 grave, a pesar de no tener diferencias significativas con el grupo de los leves en la expresión de los receptores TLR, se compone de

pacientes con una edad avanzada con comorbilidades asociadas que pueden no haberse detectado, como podría ser una pérdida de función de uno de estos receptores.

Tanto el **IFN** de tipo I como el de tipo II tienen actividad antiviral y un papel importante a la hora de combatir la infección. El IFN-I juega un papel importante en la activación de la respuesta mediada por IFN II, de hecho, hay evidencias que muestran que el IFN-I y otras interleucinas son capaces de inducir la producción de IFN- γ (IFN-II) por parte de las células NK, lo cual explica que la administración de IFN-I sea una estrategia para el tratamiento del COVID-19 temprano (127). En línea con estas observaciones, Ruetsch, C. *et al.* (128) ha comprobado también que en casos de COVID-19 moderado y grave las células inmunitarias innatas producían menos IFN I, y en consecuencia las células NK producían menos IFN II. De hecho, estas deficiencias en la producción de IFN-I están casualmente ligadas al menos al 13,7% de las infecciones con riesgo de muerte en infecciones agudas de SARS-CoV-2 según Bastard *et al.* (129).

Meckiff *et al.* (130) ha estudiado el papel que pueden tener los subtipos celulares reguladores en la COVID-19, y han observado en pacientes con mal pronóstico un sesgo en el patrón de expresión de las células T CD4⁺ específicas del SARS-CoV-2, con un desequilibrio en las células Treg. Las células Treg son capaces de regular o suprimir la respuesta inmunitaria y de inducir la reparación tisular, es por ello que ejercen una función antiviral esencial en los infectados por SARS-CoV-2 (131). En nuestros resultados hemos observado en el grupo de pacientes graves una reducción de la frecuencia de las células **Treg**, y de otras poblaciones como las células **NK con fenotipo regulador o NK bright** en comparación con el grupo leve, lo que podría explicar que estos pacientes fracasen a la hora de formar una respuesta inmunitaria adecuada, incapaces de controlar la replicación viral y la inflamación (132). Adicionalmente, en las células **T_{FH}**, identificadas como un subtipo de células T CD4⁺ independiente y caracterizado por la expresión constitutiva del receptor del folículo de células B (CXCR5), se ha descrito una disminución en los pacientes con un pronóstico más grave, coincidiendo con los resultados de nuestra cohorte inicial a pesar de no encontrar diferencias significativas. También encontramos relación entre la falta de respuesta de las células **T_{FH}** de pacientes con COVID-19 grave y la disminución de los centros germinales observada en los nódulos linfáticos de estos pacientes. Esto podría explicarse porque las **T_{FH}** están involucradas en la diferenciación de células B a células plasmáticas para dar lugar a anticuerpos neutralizantes de alta afinidad y combatir el virus, en línea con esto, estudios relacionan directamente el fenotipo de estas células con la producción anticuerpos de memoria de larga duración (133). Por ello, la pérdida de función de estas células es posible que resulte en una inmunidad humoral desregulada en la infección por SARS-CoV-2 (134).

En cuanto a las respuestas de los subtipos de células Th, encontramos que en nuestra cohorte inicial de infectados por COVID-19 las subpoblaciones **Th1** y **Th1 de memoria** se encuentra aumentadas en el grupo

de pacientes leves en comparación con el grupo moderado-grave, lo que podría indicar una activación temprana de este subtipo celular productor de IFN- γ implicado en la inmunidad celular. Esto coincide con lo comentado anteriormente en el apartado 1.3.1.2 de la Introducción: una respuesta al IFN temprana favorece un desarrollo leve de la enfermedad COVID-19. Adicionalmente, estudios previos en subpoblaciones Th en COVID-19 han mostrado que pacientes con subtipos Th sin diferenciar (135), o con subtipo Th2 (136), se asociaban a pronósticos más graves.

Dentro de la respuesta inmunitaria adaptativa anti-viral, las células T citotóxicas son las principales implicadas. Tras realizar el inmunofenotipado, las células CD8⁺ han sido clasificadas por su estado de maduración y también de activación. El fenotipo de activación temprano de las células CD8⁺ se define por la expresión de CD38 y HLA-DR (137), de hecho, se ha confirmado recientemente un aumento de la frecuencia de las células **CD8⁺CD38⁺HLADR⁺** en pacientes con pronósticos graves de COVID-19 (138, 139). Esto coincide con nuestros resultados, donde la frecuencia de este subtipo celular se encuentra aumentada en el grupo de pacientes moderados-graves respecto a los leves. Por otro lado, para determinar el fenotipo exhausto o inmunosenescente de estas células, se ha analizado la expresión de los marcadores CD27 y CD28 (113). De acuerdo con esto, hemos observado que los pacientes moderados-graves de nuestra cohorte inicial tenían aumentada la frecuencia de estas células **CD8⁺CD27⁺CD28⁺**, al igual que lo descrito en la bibliografía (140).

Por último, en los casos graves y críticos de COVID-19 también nos encontramos una frecuencia aumentada de **plasmablastos** (119, 141). El aumento de estas células B inmaduras en el grupo de pacientes con peor pronóstico coincide con nuestros resultados. De hecho, análisis post-mortem del ganglio linfático y el bazo de casos muy graves de COVID-19 han revelado casi una completa ausencia de centros germinales, lo que hace muy complicado que estos pacientes desarrollen respuestas humorales efectivas con anticuerpos de memoria de larga duración (133). Por ello, tiene sentido que se encuentren aumentados los plasmablastos con el objetivo de proporcionar una protección inmediata, la cual, desgraciadamente, será poco duradera debido a la producción por estas células de anticuerpos tempranos y débiles, IgM en su mayoría (142). Adicionalmente, varios estudios muestran que pacientes con COVID-19 grave que han sobrevivido a la infección presentan expresión de ISGs en los plasmablastos, coincidiendo con la respuesta tardía a IFN que caracteriza a los pacientes con este tipo de pronóstico (10, 119).

CASOS MODERADOS-GRAVES DE COVID-19

- Linfopenia
 - Neutrofilia

 - Monocitos no clásicos
 - ILC3
 - T reguladoras
 - NK reguladoras (CD3⁺CD56⁺⁺CD16⁻)
 - Th1 y Th1 de memoria

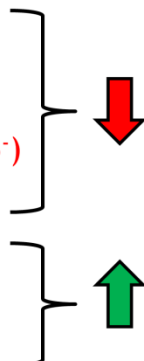
 - CD8⁺CD38⁺HLADR⁻ (activadas)
 - CD8⁺CD27⁻CD28⁻ (exhaustas)
 - Plasmablastos
- 

Figura 42. Poblaciones celulares inmunitarias innatas y adaptativas desreguladas en pacientes de la cohorte inicial con COVID-19 grave. Se muestran las poblaciones celulares con diferencias significativas entre los grupos de pacientes leves y moderados-graves.

Las células inmunitarias circulantes y componentes inmunitarios solubles pueden ser detectados en sangre periférica y ser consecuencia directa de la infección por el SARS-CoV-2 o biomarcadores de patología tisular en la enfermedad de COVID-19. La utilización de un modelo que incluya parámetros inmunológicos fácilmente cuantificables en sangre periférica para predecir el pronóstico de los pacientes más graves, podría servir de ayuda a los clínicos a la hora de gestionar diferentes opciones terapéuticas (20). Es por ello, que hemos realizado un modelo de predicción para identificar a los casos más graves de COVID-19.

Las siete variables incluidas finalmente en nuestro modelo predictivo han sido las siguientes: edad, ferritina, dímero D, C4, número de linfocitos absolutos, monocitos no clásicos (CD14^{low}CD16^{high}) y las células citotóxicas exhaustas (CD8⁺CD27⁻CD28⁻) (Figura 21). Dentro de ellas, hemos comprobado que dos variables mejoraban especialmente la capacidad predictiva del modelo: los monocitos no clásicos y las células citotóxicas exhaustas (CD8⁺CD27⁻CD28⁻). También cabe decir que hay otros parámetros descritos que se asocian a mal pronóstico en la enfermedad de COVID-19, como es la carga viral (143). Sin embargo, una limitación de este estudio ha sido la ausencia de datos de la carga viral o del umbral de ciclos (Ct) en nuestro modelo.

Finalmente, hemos comprobado que nuestro modelo predictivo mejora con estas siete variables en conjunto más que con cada una por separado, demostrando que los parámetros innatos y adaptativos podrían ayudar a determinar el requerimiento de terapia con oxígeno del 78% de los pacientes y mejorando la gestión terapéutica de los mismos al momento del ingreso.

Posteriormente, los datos obtenidos mediante el análisis de la cohorte inicial se han validado en una cohorte independiente de pacientes. De este modo, hemos podido comprobar que nuestro modelo predice

correctamente el requerimiento de oxígeno del 88% de los pacientes, permitiendo incluso calcular un *score* de gravedad que ha ayudado a estratificar el riesgo de los mismos. Este modelo podría ser fácilmente transferible a aquellos hospitales que tengan las herramientas para estudiar los parámetros incluidos. La identificación de pacientes con un pronóstico favorable que no tengan requerimiento de oxígeno en el momento del ingreso en el hospital, podría ayudar a los clínicos a anticiparse a los síntomas que pudiera tener el paciente en los próximos días, y de este modo prevenir la saturación hospitalaria en futuras olas de COVID-19. Sin embargo, es necesario especificar que aplicar este modelo de predicción sería posible en futuras olas de COVID-19 con la variante específica que abundaba en marzo de 2020, la 20e (EU1), la más mortífera hasta el momento, que pudo originarse en España y extenderse rápidamente por Europa a partir de junio tras la apertura de fronteras y reanudación de los viajes (144). En aquel momento, la variante de la COVID-19 era diferente a las que están activas hoy en día. Además, es posible que el efecto beneficioso demostrado por las vacunas influya en la gravedad de la COVID-19 (145).

La eficacia de las **vacunas** en los ensayos clínicos ha sido definida según la frecuencia de los casos infectados y sobre todo, la hospitalización de esas personas tras ser vacunadas (146). Sin embargo, todavía no hay una evaluación detallada de la respuesta inmunitaria, y en concreto, los datos sobre las células específicas del centro germinal reactivo son todavía escasos en la bibliografía.

De manera similar a nuestro estudio en el **personal sanitario** del Hospital Marqués de Valdecilla, otros autores también han estudiado las respuestas humoral y celular post vacunación, como es el caso de la vacuna de la gripe estacional (147), donde tras la administración de las dos dosis de la vacuna también aumentaban las células T_{FH} , y Bentebibel *et al.* observó que este aumento se encontraba relacionado con el desarrollo de anticuerpos específicos. Ambas respuestas inmunitarias tras la vacunación frente al SARS-CoV-2 se encuentran más interconectadas de lo que parece: las respuestas coordinadas de tipo T y B generan conjuntamente una inmunidad adaptativa superior que cada una por separado, produciendo respuestas fuertes y duraderas (148). La diferenciación de las células Th al subtipo Th1, permite estimular fagocitos, células T $CD8^+$ citotóxicas y células T_{FH} para promover respuestas de anticuerpos de alta afinidad y larga duración en las reacciones del centro germinal (133).

En este grupo de trabajadores sanitarios hemos observado que los niveles de **células B SwM**, **T_{FH} periféricas**, **Th de memoria** y en concreto las **Th1 de memoria** estaban aumentados. Como se ha comentado anteriormente, una activación temprana de las células Th1 de memoria es esencial para combatir la infección sin complicaciones. Hemos observado también que las subclases T_{FH1} y T_{FH2} , a expensas de T_{FH17} , aumentan tras la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 en el personal sanitario estudiado. Está documentado que aunque las células de memoria pT_{FH1} no son capaces de ayudar a las células B naïve *in vitro*, pueden inducir que las células B memoria se diferencien en células plasmáticas; y que las células de memoria pT_{FH2} , a través de la producción de IL-21, sean capaces de ayudar a las células B

de memoria a producir anticuerpos y a realizar el cambio de clase induciendo la reacción del centro germinal (147, 149). Todos estos hallazgos nos confirman que la respuesta celular experimenta un *boost* tras la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 frente a la COVID-19, resultando esencial para combatir la infección. Por otro lado, pacientes inmunosuprimidos por enfermedades, con inmunodeficiencias o personas con edad avanzada como pacientes de residencias, pueden no desarrollar de manera adecuada las respuestas inmunitarias humoral y celular debido a un sistema inmunitario deteriorado, es por ello que estos grupos de riesgo deberían priorizarse a la hora de recibir la pauta de vacunación (104, 150, 151).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en donde las células periféricas T_{FH} de memoria se han descrito como subpoblaciones relevantes implicadas en el desarrollo de una respuesta inmunitaria tras la vacunación frente al SARS-CoV-2. Un aumento en el nivel de estas células tras la segunda dosis de la vacuna podría ayudar a demostrar una vacunación efectiva en personas en riesgo de desarrollar naturalmente una respuesta inmunitaria debilitada. Sin embargo, si hubiera una falta de respuesta después de administración de dos dosis de la vacuna, podría tratarse de una señal de alarma por falta de protección frente al virus, y habría que considerar la administración de dosis adicionales para obtener una respuesta efectiva.

Como se ha mencionado anteriormente, las vacunas de ARNm no se han utilizado en la población hasta la llegada de la COVID-19. Sin embargo, sí que se había empleado anteriormente para modelos primates una vacuna de la gripe basada en ARNm para estudiar las respuestas inmunitarias celular y humoral, donde también se confirmaba el aumento en sangre periférica de las células T_{FH} tras la administración de la vacuna completa (152). El desarrollo de anticuerpos específicos post vacunación es la manera más clara de poder demostrar una sensibilización vacunal en este tipo nuevo de vacunas, y en concreto la producción de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 que es en lo que se basan algunos estudios. Teniendo esto en cuenta, sabemos que una de las limitaciones de este estudio es que no medimos específicamente anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, al detectar mediante el método ELISA anticuerpos anti-S2 y anti-RBD, se podría asumir que la mayoría de los anticuerpos desarrollados por estos pacientes son neutralizantes (153).

La mayor parte de los sujetos incluidos en el grupo de personal sanitario (94%) desarrollaron anticuerpos específicos anti-S 20 días después de la primera dosis. La diferencia en la producción de anticuerpos con el ensayo clínico de la vacuna BNT162b2 donde la eficacia fue de un 52%, puede deberse a las diferencias en la edad de los sujetos estudiados. Como se menciona en el apartado de Material y Métodos, nuestros sujetos del personal sanitario tenían una mediana de edad de 42,5 años (30,5-54,2), por lo que la respuesta inmunitaria frente a una primera dosis de la vacuna se espera que sea más fuerte que en un estudio en el que se incluyan sujetos de mayor edad.

A pesar de que el curso natural de una respuesta inmunitaria es una primera respuesta celular T y B para generar células específicas implicadas en la producción de anticuerpos, la respuesta humoral ha sido detectada de manera previa a la respuesta celular. Esto puede explicarse porque este estudio no está basado en la detección de subpoblaciones de células T en los órganos linfoides secundarios, si no en sangre periférica, lo cual puede generar un sesgo a la hora de evaluar esta respuesta por el mayor tiempo de detección. Por otro lado, aunque la producción de la mayoría de anticuerpos depende de las células plasmáticas que han sufrido hipermutación somática y maduración de la afinidad en el centro germinal, no se debe pasar por alto la posibilidad de que parte de la respuesta humoral haya sido a causa de respuestas extrafoliculares de células B, los cuales se diferencian y activan muy rápidamente secretando grandes cantidades de IgM y en ocasiones de IgG, son poco específicos y tienen una vida media corta sin sufrir cambio de isotipo ni generar memoria inmunológica. Este tipo de células tienen la finalidad de contener la replicación de los microorganismos y eliminarlos, si es posible, mediante la activación del complemento y otros procesos (154, 155).

Entre otras limitaciones que nos podemos encontrar está la ausencia de marcadores que permiten diferenciar las células pT_{FH} activadas y quiescentes, como son PD1 y CCR7. También, el hecho de que se haya considerado la detección de anticuerpos específicos de SARS-CoV-2 como una variable dicotómica en este grupo de personal sanitario, no nos ha permitido establecer una relación entre la presencia de estos anticuerpos y el nivel de las subpoblaciones de células T.

Adicionalmente, el mayor porcentaje de sujetos con inmunidad humoral a los nueve meses comparado con aproximadamente el 40% que mantienen inmunidad celular, no solo se podría justificar por limitaciones en el método de detección empelado para evaluar la respuesta de células T, si no que la técnica de ELISA para medir respuesta humoral en sujetos de personal sanitario tiene una sensibilidad especialmente elevada al detectar anticuerpos no solo frente a la región S1 y RBD de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2, si no también frente a la S2.

Los sujetos institucionalizados en residencias de ancianos fueron uno de los primeros grupos en recibir la vacuna frente al SARS-CoV-2 al ser un grupo especialmente vulnerable por su avanzada edad y posibles comorbilidades asociadas. Algunos países utilizaron sus propias estrategias de vacunación, como el Reino Unido que administró una primera dosis a toda la población aumentando el tiempo entre las dosis para lograr una mayor inmunización en menor tiempo. Sin embargo, meses después se comprobó que la inmunidad celular y humoral en estos sujetos mostraba una respuesta de anticuerpos retrasada, sugiriendo que una administración más temprana de la segunda dosis de la vacuna BNT162b2 sería más adecuado (156).

En esta cohorte de pacientes inmunosenescentes, los individuos con contacto previo con el SARS-CoV-2 tenían niveles aumentados de anticuerpos anti-S1 a los dos meses de recibir la segunda dosis de la vacuna BNT162b2, coincidiendo con los resultados de otros estudios a pesar de la diferencia en la media de edad;

80 años en este estudio frente a 41,9 (157). A medida que ha ido avanzando la pandemia la inmunidad de rebaño ha ido perdiendo sentido: las nuevas oleadas de transmisión, las reinfecciones y otras causas han llevado a los especialistas a plantearse el papel de la inmunidad híbrida, aquella que se adquiere al vacunarse e infectarse. De hecho, nuestros resultados van en línea con esto, ya que los niveles de anticuerpos de los sujetos de residencias con infección previa se mantienen elevados incluso a los seis meses post vacunación.

El 96,16% de los sujetos de residencias de ancianos de Cantabria analizados en este estudio han desarrollado una respuesta humoral, ya sea por infección previa o por recibir dos dosis de la vacuna, lo que mejora incluso el 93% de la tasa de respuesta humoral de otro estudio a las 5-6 semanas de la vacunación (158).

Al igual que en el grupo de personal sanitario, una limitación en la evaluación de la respuesta inmunitaria en los sujetos de residencias es la falta de un ensayo de neutralización. Sin embargo, se ha identificado 4160 AU como un nivel de anticuerpos con capacidad neutralizante (159), lo que puede aportar información adicional a nuestros resultados. Por otro lado, en otros trabajos no se ha realizado una evaluación del riesgo de infección post-vacunación. Sin embargo, en este estudio hemos identificado 715 AU/mL como un valor por debajo del cual los sujetos de residencias estarían en **riesgo de infección** por el SARS-CoV-2. Adicionalmente, comparando los niveles de anticuerpos anti-S1 entre los dos y los seis meses tras la segunda dosis de la vacuna, hemos observado que por debajo de un nivel de 470 AU/mL a los dos meses, existe un **riesgo alto de seronegativizar** a los seis. De este modo, niveles de anticuerpos anti-S1 por debajo de estos valores podrían sugerir una tercera dosis de la vacuna, tanto para minimizar el riesgo de infección post vacunación, como para evitar que los niveles decaigan y el sujeto se vuelva seronegativo. Cabe destacar la dificultad de comparación de unidades de anticuerpos para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. Se ha intentado estandarizar la unidad de medida "unidades de unión a anticuerpo por mililitro" (BAU/mL, de sus siglas en inglés), un estándar internacional propuesto por la OMS que se utiliza para ensayos serológicos que detectan anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2. Sin embargo, aun no queda clara su utilidad clínica porque este estándar internacional no define un valor de corte claro de protección ante una infección natural o vacunal (160, 161). Por lo tanto, los valores que proponemos son los propios de nuestro método (AU/mL) y en ningún caso extrapolables a otras unidades de medida.

Aun así, hasta ahora hemos hablado en este grupo solo de la inmunidad humoral, lo cual podría ser una limitación. La inmunidad celular T específica se desarrolla con anterioridad ante una infección y tendría sentido que fuera evaluada previamente antes de decidir administrar una dosis adicional a estos sujetos de residencias. Para ello se ha realizado una evaluación de la inmunidad celular a los dos y seis meses en los pacientes que carecían de una respuesta de anticuerpos mínima para considerar una respuesta humoral, en la que la tasa de respuesta a la vacuna BNT162b2 sin infección previa aumentó hasta el 97,42% y

92,16%, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que aunque algunos sujetos no desarrollen inmunidad humoral de anticuerpos IgG frente al SARS-CoV-2, pueden estar protegidos por una inmunidad celular previamente desarrollada y posiblemente no detectada con una serología de rutina (110, 162). De hecho, solo 17 personas tuvieron una PCR positiva post-vacunación, con un 1,06% de pacientes hospitalizados, lo cual confirma la reducción de las infecciones, hospitalizaciones y muertes en pacientes con la pauta de vacunación completa.

Los sujetos que no llegaron a desarrollar ningún tipo de inmunidad detectable, humoral ni celular, es posible que estuvieran en riesgo de infección al no contar con protección frente al virus. Sin embargo, este grupo de personas con edad avanzada y comorbilidades asociadas tiene una respuesta vacunal particularmente heterogénea (162), es por ello también que el tener niveles altos de anticuerpos no tendría por qué eximirles de una infección. Todo ello, les convierte en un grupo candidato para futuros estudios de la respuesta inmunitaria a nivel global.

Teniendo todo esto en cuenta, consideramos que aquellos sujetos con anticuerpos IgG anti-S1 ya tenían la inmunidad celular específica de células T necesaria para producir IgG en el centro germinal, por ello solo en aquellos que fueron seronegativos se realizó una evaluación de la respuesta celular T CD4+ específica. A pesar de todo, en este estudio no podemos confirmar en este estudio la evaluación de la respuesta celular como una técnica para identificar sujetos de residencias en riesgo de infección post vacunación debido a que no hemos encontrado diferencias significativas en la incidencia de COVID-19 entre respondedores celulares y no respondedores.

Por último, cabe decir que otra limitación en el estudio de este grupo de sujetos de residencias ha sido no haber evaluado la respuesta celular de aquellos respondedores bajos con niveles de anticuerpos inferiores a 715 AU/mL, debido a que durante el estudio fijamos como punto de corte para realizar el ensayo celular 50 AU/mL, valor establecido en la rutina del laboratorio que reflejaba el nivel de anticuerpos mínimo para considerar respuesta humoral.

Finalmente, en el último grupo estudiado en la cohorte de respuesta vacunal nos encontramos a pacientes trasplantados hepáticos, que al igual que los sujetos de residencias, se encuentran con un sistema inmune comprometido, aunque en este caso, por inmunosupresión farmacológica. Para otros receptores de trasplante de órgano sólido, se han documentado los beneficios de una tercera dosis de la vacuna en la inmunogenicidad y la seroconversión, sin embargo, pocos de estos sujetos eran trasplantados hepáticos (163). De hecho, en estos pacientes, el 75% de los casos seronegativos tras dos dosis de la vacuna mRNA-1273 seroconvirtieron después de que se les administrase una tercera dosis. Adicionalmente, aquellos con una respuesta baja de anticuerpos también aumentaron sus niveles, aunque no a un nivel tan alto como para llegar a ser altos respondedores (4160 AU/mL). Estos niveles, como se mencionado anteriormente en este apartado, se encuentran relacionados en la bibliografía con la presencia de anticuerpos neutralizantes

(159). A los pacientes que seguían siendo seronegativos tras tres dosis de la vacuna se les realizó una evaluación de la respuesta celular T específica, y un 25 % de estos (1/4) obtuvo respuesta, siendo un total del 97,67% los pacientes que desarrollaron respuesta inmunitaria detectable frente al SARS-CoV-2 después de tres dosis de la vacuna mRNA-1273.

Dentro de las limitaciones en el estudio de este grupo de receptores de trasplante hepático, nos encontramos un número de pacientes pequeño, la ausencia de un estudio de estos pacientes entre las dosis de la vacuna y, al igual que en otros grupos, la falta de evaluación de anticuerpos neutralizantes. Y aunque finalmente no se pueda corroborar solo con este estudio que la inmunidad humoral mejorada en estos pacientes esté en relación con protección clínica, los datos obtenidos sugieren que una tercera dosis homóloga de la vacuna refuerza la respuesta inmune específica frente al SARS-CoV-2 en casi el 98% de los pacientes con un sistema inmune comprometido por inmunosupresión farmacológica.

Todo esto lleva a tener en gran consideración la evaluación de la respuesta celular T específica en cualquier paciente con niveles de anticuerpos insuficientes para desencadenar una respuesta humoral, esto no exime de tener la capacidad de desarrollar una respuesta T específica competente que provoque una respuesta inmune eficaz contra el virus. Aun a pesar de contar con limitaciones en la evaluación de la respuesta celular, como el haberla analizado solo en células CD4⁺ y en sangre periférica, hemos encontrado porcentajes significativos de pacientes sin inmunidad humoral pero con protección T CD4⁺ específica, lo cual corrobora el valor de este tipo de análisis a la hora de determinar la inmunidad protectora frente a un patógeno viral. La evaluación de este tipo de respuesta únicamente por el resultado de estimulación de los AIMs en las células CD4⁺ no significa que el paciente no tenga células T citotóxicas CD8⁺ específicas del virus. Sin embargo, decidimos centrarnos en las células CD4⁺ porque la sensibilidad que se ha obtenido al estudiar estos AIMs en las células citotóxicas ha sido muy baja y proporcionaban muy pocos positivos.

La cuantificación de anticuerpos anti-S específicos del SARS-CoV-2 es una forma objetiva y directa de evaluar la eficacia de la vacuna, sin embargo, aunque el estudio de componentes de la respuesta de células T no esté todavía implementado en la rutina diagnóstica, sería una herramienta muy valiosa que podría aportar mucha información, sobre todo en grupos de riesgo específicos como usuarios de residencias o pacientes inmunodeprimidos por distintas enfermedades o tratamientos. La dificultad principal en estudiar esta respuesta es la falta de medios para analizar de forma masiva respuesta de células T. Sin embargo, recientemente se han desarrollado métodos que lo permiten basados en una combinación de incubación con péptidos del SARS-CoV-2 y PCR cuantitativa (qPCR, de sus siglas en inglés), para cuantificar producción de quimiocinas como IP-10 (164).

La conclusión general de la presente tesis doctoral se puede resumir en que la valoración de la respuesta inmunitaria tiene una gran utilidad, tanto a nivel fenotípico como a nivel funcional, para determinar el pronóstico de la infección por el SARS-CoV-2 causante de la COVID-19, así como a la hora de tomar decisiones de Salud Pública en campañas de vacunación, y en la frecuencia y necesidad de la administración de dosis de refuerzo.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este estudio han sido las siguientes:

1. La evaluación de los componentes de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa en sangre en pacientes con infección activa por SARS-CoV-2 permiten obtener biomarcadores pronósticos de la enfermedad COVID-19.
2. Nuestro modelo pronóstico puede ayudar a la gestión de los pacientes al ingreso: los parámetros humorales y celulares de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa podrían ayudar a determinar una patología más grave al ingreso en el hospital, mejorando su gestión y categorizando el pronóstico de los pacientes.
3. Sujetos inmunocompetentes desarrollan respuesta inmunitaria completa tras dos dosis de la vacuna que se mantiene a los 9 meses, especialmente la humoral.
4. Hay una alta tasa de respuesta vacunal en sujetos inmunosenescentes de residencias: y la mayor parte la mantuvo a los 6 meses.
5. Una tercera dosis homóloga de la vacuna refuerza la respuesta inmunitaria específica frente al SARS-CoV-2 en pacientes con un sistema inmunitario comprometido con inmunosupresión farmacológica, como son los receptores de trasplante hepático.
6. Sujetos sin inmunidad humoral pueden estar protegidos por inmunidad celular: la evaluación de la respuesta celular específica podría ser usada como herramienta para testar la respuesta inmunitaria a la vacuna en aquellos sujetos con defecto de inmunidad humoral.

7. REFERENCIAS

1. Carvalho T, Krammer F, Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):245-56.
2. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 2021;13(2).
3. Ferrer R. [COVID-19 Pandemic: the greatest challenge in the history of critical care]. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 2020;44(6):323-4.
4. Data Owi. Daily new confirmed COVID-19 deaths per million people [Available from: <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer>]
5. Kwon S, Joshi AD, Lo CH, Drew DA, Nguyen LH, Guo CG, et al. Association of social distancing and face mask use with risk of COVID-19. *Nat Commun*. 2021;12(1):3737.
6. Yokoyama WM, Hogquist KA, O'Shea JJ. Immunology Lessons from the SARS-CoV-2 Pandemic. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:v-vii.
7. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181-92.
8. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2022;23(2):165-76.
9. Li T, Liu D, Yang Y, Guo J, Feng Y, Zhang X, et al. Phylogenetic supertree reveals detailed evolution of SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 2020;10(1):22366.
10. Wong LR, Perlman S. Immune dysregulation and immunopathology induced by SARS-CoV-2 and related coronaviruses - are we our own worst enemy? *Nat Rev Immunol*. 2022;22(1):47-56.
11. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(9):e238-e44.
12. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. 2021;184(7):1671-92.
13. Mahida RY, Chotalia M, Alderman J, Patel C, Hayden A, Desai R, et al. Characterisation and outcomes of ARDS secondary to pneumonia in patients with and without SARS-CoV-2: a single-centre experience. *BMJ Open Respir Res*. 2020;7(1).
14. Da Rosa Mesquita R, Francelino Silva Junior LC, Santos Santana FM, Farias de Oliveira T, Campos Alcântara R, Monteiro Arnozo G, et al. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wien Klin Wochenschr*. 2021;133(7-8):377-82.
15. Fuentes-Prior P. Priming of SARS-CoV-2 S protein by several membrane-bound serine proteinases could explain enhanced viral infectivity and systemic COVID-19 infection. *J Biol Chem*. 2021;296:100135.

16. Bridwell R, Long B, Gottlieb M. Neurologic complications of COVID-19. *Am J Emerg Med*. 2020;38(7):1549.e3-.e7.
17. Afzali B, Noris M, Lambrecht BN, Kemper C. The state of complement in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(2):77-84.
18. Zhou Y, Yang Q, Chi J, Dong B, Lv W, Shen L, et al. Comorbidities and the risk of severe or fatal outcomes associated with coronavirus disease 2019: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2020;99:47-56.
19. Chen Y, Klein SL, Garibaldi BT, Li H, Wu C, Osevala NM, et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Res Rev*. 2021;65:101205.
20. San Segundo D, Arnáiz de Las Revillas F, 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*. 2021;9(8).
21. Al Balushi A, AlShekaili J, Al Kindi M, Ansari Z, Al-Khabori M, Khamis F, et al. Immunological predictors of disease severity in patients with COVID-19. *Int J Infect Dis*. 2021;110:83-92.
22. Davidescu EI, Odajiu I, Tulbă D, Sandu CD, Bunea T, Sandu G, et al. Prognostic Factors in COVID-19 Patients With New Neurological Manifestations: A Retrospective Cohort Study in a Romanian Neurology Department. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:645611.
23. Az A, Sogut O, Akdemir T, Ergenc H, Dogan Y, Cakirca M. Impacts of Demographic and Clinical Characteristics on Disease Severity and Mortality in Patients with Confirmed COVID-19. *Int J Gen Med*. 2021;14:2989-3000.
24. Zhong P, Wang Z, Du Z. Serum triglyceride levels and related factors as prognostic indicators in COVID-19 patients: A retrospective study. *Immun Inflamm Dis*. 2021;9(3):1055-60.
25. Lok J, Gess M. Liver dysfunction in COVID-19: a useful prognostic marker of severe disease? *Frontline Gastroenterol*. 2021;12(4):293-8.
26. Jurado A, Martín MC, Abad-Molina C, Orduña A, Martínez A, Ocaña E, et al. COVID-19: age, Interleukin-6, C-reactive protein, and lymphocytes as key clues from a multicentre retrospective study. *Immun Ageing*. 2020;17:22.
27. Li MY, Li L, Zhang Y, Wang XS. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1):45.
28. Medina-Enríquez MM, Lopez-León S, Carlos-Escalante JA, Aponte-Torres Z, Cuapio A, Wegman-Ostrosky T. ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. *Cell Biosci*. 2020;10(1):148.
29. Jaimes J, Millet J, Whittaker G. Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site. *SSRN*. 2020:3581359.

30. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? JAMA. 2021;325(6):529-31.
31. Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2 2022 [Available from: <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>]
32. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn S, Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment of Coronavirus (COVID-19). Treasure Island (FL): StatPearls publishing; 2022.
33. Ahmed MH, Hassan A. Dexamethasone for the Treatment of Coronavirus Disease (COVID-19): a Review. SN Compr Clin Med. 2020:1-10.
34. Wen W, Chen C, Tang J, Wang C, Zhou M, Cheng Y, et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19: a meta-analysis. Ann Med. 2022;54(1):516-23.
35. Najjar-Debbiny R, Gronich N, Weber G, Khoury J, Amar M, Stein N, et al. Effectiveness of Paxlovid in Reducing Severe COVID-19 and Mortality in High Risk Patients. Clin Infect Dis. 2022.
36. Xing K, Tu XY, Liu M, Liang ZW, Chen JN, Li JJ, et al. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines: a systematic review. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2021;23(3):221-8.
37. San Segundo D, 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. 2021;9(8).
38. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. Lancet. 2021;397(10269):99-111.
39. 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. 2021;21(2):e26-e35.
40. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. N Engl J Med. 2021;384(5):403-16.
41. Vitiello A, Ferrara F. Brief review of the mRNA vaccines COVID-19. Inflammopharmacology. 2021;29(3):645-9.
42. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19): Vacunas. Organización Mundial de la Salud; 2022 [Available from: <https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>]
43. Moderna. Moderna announces first participant dosed in NIH-LED phase I study of mRNA vaccine (mRNA-1273) against novel coronavirus. 2020 [Available from: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2020/Moderna-Announces-First->

- Participant-Dosed-in-NIH-led-Phase-1-Study-of-mRNA-Vaccine-mRNA-1273-Against-Novel-Coronavirus-03-16-2020/default.aspx]
44. Pfizer&BioNTech. Pfizer and BioNTech dose first participants in the U.S. as part of global COVID-19 mRNA vaccine development program: Pfizer & BioNTech; 2020 [Available from: https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer_and_biontech_dose_first_participants_in_the_u_s_as_part_of_global_covid_19_mrna_vaccine_development_program]
 45. Pfizer&BioNTech. Pfizer and BioNTech Announce Vaccine Candidate Against COVID-19 Achieved Success in First Interim Analysis from Phase 3 Study 2020 [Available from: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-announce-vaccine-candidate-against>].
 46. Moderna. Moderna and Lonza announce worldwide strategic collaboration to manufacture Moderna's vaccine (mRNA-1273) against novel coronavirus 2020 [Available from: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2020/Moderna-and-Lonza-Announce-Worldwide-Strategic-Collaboration-to-Manufacture-Modernas-Vaccine-mRNA-1273-Against-Novel-Coronavirus-05-01-2020/default.aspx>]
 47. Johnson&Johnson. Johnson & Johnson COVID-19 Vaccine Authorized by U.S. FDA For Emergency Use - First Single-Shot Vaccine in Fight Against Global Pandemic 2021 [Available from: <https://www.jnj.com/johnson-johnson-covid-19-vaccine-authorized-by-u-s-fda-for-emergency-usefirst-single-shot-vaccine-in-fight-against-global-pandemic>].
 48. Novavax. Novavax COVID-19 vaccine demonstrates 89.3% efficacy in UK phase 3 trial. 2021. [Available from: <https://ir.novavax.com/press-releases>]
 49. Callaway E. Russia's fast-track coronavirus vaccine draws outrage over safety. *Nature*. 2020;584(7821):334-5.
 50. Reuters. CanSino's COVID-19 vaccine candidate approved for military use in China Reuters [Available from: <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-china-vaccine/cansinos-covid-19-vaccine-candidate-approved-for-military-use-in-china-idUSKBN2400DZ>].
 51. Piechotta V, Iannizzi C, Chai KL, Valk SJ, Kimber C, Dorando E, et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;5:CD013600.
 52. Freise NF, Gliga S, Fischer J, Lübke N, Lutterbeck M, Schöler M, et al. Convalescent plasma treatment for SARS-CoV-2 infected high-risk patients: a matched pair analysis to the LEOSS cohort. *Sci Rep*. 2022;12(1):19035.
 53. Focosi D, Casadevall A. A Critical Analysis of the Use of Cilgavimab plus Tixagevimab Monoclonal Antibody Cocktail (Evusheld™) for COVID-19 Prophylaxis and Treatment. *Viruses*. 2022;14(9).
 54. Heo YA. Sotrovimab: First Approval. *Drugs*. 2022;82(4):477-84.

55. Deeks ED. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs*. 2021;81(17):2047-55.
56. Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2008;10 Suppl 1:S3.
57. Fontana MF, Vance RE. Two signal models in innate immunity. *Immunol Rev*. 2011;243(1):26-39.
58. Silverstein NJ, Wang Y, Manickas-Hill Z, Carbone C, Dauphin A, Boribong BP, et al. Innate lymphoid cells and disease tolerance in SARS-CoV-2 infection. *medRxiv*. 2021.
59. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
60. Zheng M, Karki R, Williams EP, Yang D, Fitzpatrick E, Vogel P, et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol*. 2021;22(7):829-38.
61. Choudhury A, Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J Med Virol*. 2020;92(10):2105-13.
62. Dyavar SR, Singh R, Emani R, Pawar GP, Chaudhari VD, Podany AT, et al. Role of toll-like receptor 7/8 pathways in regulation of interferon response and inflammatory mediators during SARS-CoV2 infection and potential therapeutic options. *Biomed Pharmacother*. 2021;141:111794.
63. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
64. Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012;36(4):503-14.
65. Loo YM, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. 2011;34(5):680-92.
66. Yin X, Riva L, Pu Y, Martin-Sancho L, Kanamune J, Yamamoto Y, et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep*. 2021;34(2):108628.
67. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Muhammad J, Khan A, Sule AA, Tirupathi R, et al. Role of Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients: A Review on Molecular Mechanisms, Immune Functions, Immunopathology and Immunomodulatory Drugs to Counter Cytokine Storm. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(5).
68. Nguyen LN, Kanneganti TD. PANoptosis in Viral Infection: The Missing Puzzle Piece in the Cell Death Field. *J Mol Biol*. 2022;434(4):167249.
69. Zohar T, Loos C, Fischinger S, Atyeo C, Wang C, Slein MD, et al. Compromised Humoral Functional Evolution Tracks with SARS-CoV-2 Mortality. *Cell*. 2020;183(6):1508-19.e12.
70. Alcamí Pertejo J. La respuesta inmune frente a SARS-CoV-2, ¿un arma de doble filo? *Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud*. 2020;5(1):2530-787.

71. Kim YM, Shin EC. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med*. 2021;53(5):750-60.
72. Eskandarian Boroujeni M, Sekrecka A, Antonczyk A, Hassani S, Sekrecki M, Nowicka H, et al. Dysregulated Interferon Response and Immune Hyperactivation in Severe COVID-19: Targeting STATs as a Novel Therapeutic Strategy. *Front Immunol*. 2022;13:888897.
73. Zhang Q, Bastard P, Cobat A, Casanova JL, Effort CHG. Human genetic and immunological determinants of critical COVID-19 pneumonia. *Nature*. 2022;603(7902):587-98.
74. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515).
75. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 2016;19(2):181-93.
76. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):479-92.
77. Sinkovits G, Mező B, Réti M, Müller V, Iványi Z, Gál J, et al. Complement Overactivation and Consumption Predicts In-Hospital Mortality in SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol*. 2021;12:663187.
78. Holter JC, Pischke SE, de Boer E, Lind A, Jenum S, Holten AR, et al. Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(40):25018-25.
79. Ali YM, Ferrari M, Lynch NJ, Yaseen S, Dudler T, Gragerov S, et al. Lectin Pathway Mediates Complement Activation by SARS-CoV-2 Proteins. *Front Immunol*. 2021;12:714511.
80. Yu J, Gerber GF, Chen H, Yuan X, Chaturvedi S, Braunstein EM, et al. Complement dysregulation is associated with severe COVID-19 illness. *Haematologica*. 2021.
81. Annane D, Heming N, Grimaldi-Bensouda L, Frémeaux-Bacchi V, Vigan M, Roux AL, et al. Eculizumab as an emergency treatment for adult patients with severe COVID-19 in the intensive care unit: A proof-of-concept study. *EClinicalMedicine*. 2020;28:100590.
82. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S33-40.
83. Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, Hanson AL, Kotagiri P, Dunmore BJ, et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity*. 2021;54(6):1257-75.e8.
84. Laidlaw BJ, Ellebedy AH. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(1):7-18.

85. Marsán Suárez V, Casado Hernández I, Hernández Ramos E. Respuesta inmune adaptativa en la infección por SARS-CoV-2. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*; 2020.
86. (ISCI) IdSCI. Anticuerpos neutralizantes frente a SARS-CoV-2 2020 [Available from: <https://www.conprueba.es/sites/default/files/informes/202007/ANTICUERPOS%20NEUTRALIZANTES%20FRENTE%20A%20SARS%20CoV-2.pdf>]
87. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med*. 2021;13(577).
88. Garcia-Beltran WF, Lam EC, Astudillo MG, Yang D, Miller TE, Feldman J, et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*. 2021;184(2):476-88.e11.
89. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):47-59.
90. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight*. 2019;4(4).
91. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584(7821):457-62.
92. Hall VJ, Foulkes S, Charlett A, Atti A, Monk EJM, Simmons R, et al. SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *Lancet*. 2021;397(10283):1459-69.
93. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2022;23(2):186-93.
94. Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, Selva KJ, Reynaldi A, Tan HX, et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun*. 2021;12(1):1162.
95. Adamo S, Michler J, Zurbuchen Y, Cervia C, Taeschler P, Raeber ME, et al. Signature of long-lived memory CD8. *Nature*. 2022;602(7895):148-55.
96. Kundu R, Narean JS, Wang L, Fenn J, Pillay T, Fernandez ND, et al. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat Commun*. 2022;13(1):80.
97. Mueller YM, Schrama TJ, Ruijten R, Schreurs MWJ, Grashof DGB, van de Werken HJG, et al. Stratification of hospitalized COVID-19 patients into clinical severity progression groups by immuno-phenotyping and machine learning. *Nat Commun*. 2022;13(1):915.
98. Malik P, Patel U, Mehta D, Patel N, Kelkar R, Akrmah M, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med*. 2021;26(3):107-8.

99. Carrillo J. Detection of SARS-CoV-2 antibodies by ELISA. Protocol by IrsiCaixa: IrsiCaixa; 2020 [Available from: https://www.irsicaixa.es/sites/default/files/detection_of_sars-cov-2_antibodies_by_elisa_-_protocol_by_irsicaixa_protected.pdf].
100. 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*. 2020;181(7):1489-501.e15.
101. 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)*. 2021;2(3):313-20.e4.
102. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX, ProQuest. *Applied logistic regression*. 3rd ed. Hoboken, N.J: Wiley; 2013.
103. Hilbe JM. *Logistic Regression Models*. London: Taylor & Francis Ltd; 2017.
104. San Segundo D, Comins-Boo A, Lamadrid-Perojo P, Irure-Ventura J, Castillo-Otí JM, Wallman R, et al. COVID-19 mRNA Based Vaccine Immune-Response Assessment in Nursing Home Residents for Public Health Decision. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(12).
105. Odrizola A, Lamadrid-Perojo P, Cuadrado A, San Segundo D, Del Barrio M, Fortea JL, et al. Immune Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Liver Transplant Recipients. *Transplantation*. 2022.
106. 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*. 2021;131(3).
107. Mann ER, Menon M, Knight SB, Konkel JE, Jagger C, Shaw TN, et al. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;5(51).
108. Totura AL, Whitmore A, Agnihothram S, Schäfer A, Katze MG, Heise MT, et al. Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *mBio*. 2015;6(3):e00638-15.
109. Hu W, Yen YT, Singh S, Kao CL, Wu-Hsieh BA. SARS-CoV regulates immune function-related gene expression in human monocytic cells. *Viral Immunol*. 2012;25(4):277-88.
110. Malipiero G, Moratto A, Infantino M, D'Agaro P, Piscianz E, Manfredi M, et al. Assessment of humoral and cellular immunity induced by the BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccine in healthcare workers, elderly people, and immunosuppressed patients with autoimmune disease. *Immunol Res*. 2021;69(6):576-83.
111. Reusch N, De Domenico E, Bonaguro L, Schulte-Schrepping J, Baßler K, Schultze JL, et al. Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol*. 2021;12:652470.

112. 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*. 2020;369(6508).
113. 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*. 2020;11(1):3434.
114. 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*. 2020;182(6):1419-40.e23.
115. Guo Z, Zhang Z, Prajapati M, Li Y. Lymphopenia Caused by Virus Infections and the Mechanisms Beyond. *Viruses*. 2021;13(9).
116. Huang I, Pranata R. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care*. 2020;8:36.
117. Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2009;206(1):69-78.
118. Zizzo G, Tamburello A, Castelnovo L, Laria A, Mumoli N, Faggioli PM, et al. Immunotherapy of COVID-19: Inside and Beyond IL-6 Signalling. *Front Immunol*. 2022;13:795315.
119. Amrute JM, Perry AM, Anand G, Cruchaga C, Hock KG, Farnsworth CW, et al. Cell specific peripheral immune responses predict survival in critical COVID-19 patients. *Nat Commun*. 2022;13(1):882.
120. Chevrier S, Zurbuchen Y, Cervia C, Adamo S, Raeber ME, de Souza N, et al. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell Rep Med*. 2021;2(1):100166.
121. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:439-56.
122. 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*. 2020;9(12):e1224.
123. 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*. 2019;10(4):315.
124. Thompson JM, Iwasaki A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(7):786-94.
125. Aboudounya MM, Heads RJ. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:8874339.

126. van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, et al. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA*. 2020;324(7):663-73.
127. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol*. 2018;9:2061.
128. Ruetsch C, Brglez V, Crémoni M, Zorzi K, Fernandez C, Boyer-Suavet S, et al. Functional Exhaustion of Type I and II Interferons Production in Severe COVID-19 Patients. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:603961.
129. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515).
130. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4. *Cell*. 2020;183(5):1340-53.e16.
131. Liu Y, Qi G, Bellanti JA, Moser R, Ryffel B, Zheng SG. Regulatory T cells: A potential weapon to combat COVID-19? *MedComm (2020)*. 2020;1(2):157-64.
132. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8. *Front Immunol*. 2020;11:580237.
133. Nelson RW, Chen Y, Venezia OL, Majerus RM, Shin DS, Carrington MN, et al. SARS-CoV-2 epitope-specific CD4. *Sci Immunol*. 2022;7(73):eabl9464.
134. Cui D, Tang Y, Jiang Q, Jiang D, Zhang Y, Lv Y, et al. Follicular Helper T Cells in the Immunopathogenesis of SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol*. 2021;12:731100.
135. Gutiérrez-Bautista JF, Rodríguez-Nicolas A, Rosales-Castillo A, Jiménez P, Garrido F, Anderson P, et al. Negative Clinical Evolution in COVID-19 Patients Is Frequently Accompanied With an Increased Proportion of Undifferentiated Th Cells and a Strong Underrepresentation of the Th1 Subset. *Front Immunol*. 2020;11:596553.
136. Gil-Etayo FJ, Suárez-Fernández P, Cabrera-Marante O, Arroyo D, Garcinuño S, Naranjo L, et al. T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:624483.
137. Schwenk R, Banania G, Epstein J, Kim Y, Peters B, Belmonte M, et al. Ex vivo tetramer staining and cell surface phenotyping for early activation markers CD38 and HLA-DR to enumerate and characterize malaria antigen-specific CD8⁺ T-cells induced in human volunteers immunized with a Plasmodium falciparum adenovirus-vectored malaria vaccine expressing AMA1. *Malar J*. 2013;12:376.
138. 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*. 2021;182(3):254-62.

139. 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*. 2021;11:646688.
140. Yaqinuddin A, Kashir J. Innate immunity in COVID-19 patients mediated by NKG2A receptors, and potential treatment using Monalizumab, Cholroquine, and antiviral agents. *Med Hypotheses*. 2020;140:109777.
141. Beran O, Matuskova K, Bartovska Z, Bartos O, Holub M. Acute phase of COVID-19 is associated with elevated plasmablasts in the blood. *Bratisl Lek Listy*. 2022;123(4):244-7.
142. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zúñiga E, et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev*. 2003;194:8-18.
143. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther*. 2020;9(3):573-86.
144. EFE. Verano de 2020: el viaje de la variante que se identificó primero en España [Available from: <https://www.efe.com/efe/espana/sociedad/verano-de-2020-el-viaje-la-variante-que-se-identifico-primero-en-espana/10004-4556078>]
145. Moss P, Berenbaum F, Curigliano G, Grupper A, Berg T, Pather S. Benefit-risk evaluation of COVID-19 vaccination in special population groups of interest. *Vaccine*. 2022;40(32):4348-60.
146. Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021;397(10287):1819-29.
147. 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*. 2013;5(176):176ra32.
148. Newell KL, Waldran MJ, Thomas SJ, Endy TP, Waickman AT. Simultaneous analysis of antigen-specific B and T cells after SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cytometry A*. 2022;101(6):474-82.
149. 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*. 2011;34(1):108-21.
150. Brockman MA, Mwimanzi F, Sang Y, Ng K, Agafitei O, Ennis S, et al. Weak humoral immune reactivity among residents of long-term care facilities following one dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *medRxiv*. 2021.
151. Lee ARYB, Wong SY, Chai LYA, Lee SC, Lee MX, Muthiah MD, et al. Efficacy of covid-19 vaccines in immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2022;376:e068632.

152. Lindgren G, Ols S, Liang F, Thompson EA, Lin A, Hellgren F, et al. Induction of Robust B Cell Responses after Influenza mRNA Vaccination Is Accompanied by Circulating Hemagglutinin-Specific ICOS⁺ PD-1⁺ CXCR3⁺ T Follicular Helper Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1539.
153. 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.* 2021;538:187-91.
154. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, Goss CW, Rauseo AM, Schmitz AJ, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature.* 2021;595(7867):421-5.
155. Sanz JM, Gómez Lahoz AM, Martín RO. [Role of the immune system in SARS-CoV-2 infection: immunopathology of COVID-19]. *Medicine (Madr).* 2021;13(33):1917-31.
156. Tut G, Lancaster T, Krutikov M, Sylla P, Bone D, Kaur N, et al. Profile of humoral and cellular immune responses to single doses of BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 vaccines in residents and staff within residential care homes (VIVALDI): an observational study. *Lancet Healthy Longev.* 2021;2(9):e544-e53.
157. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, Wu M, Sun N, Prostko JC, et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2021;27(6):981-4.
158. Parry H, Bruton R, Tut G, Ali M, Stephens C, Greenwood D, et al. Immunogenicity of single vaccination with BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 at 5-6 weeks post vaccine in participants aged 80 years or older: an exploratory analysis. *Lancet Healthy Longev.* 2021;2(9):e554-e60.
159. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finkin S, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature.* 2021;592(7855):616-22.
160. Cilla Eguiluz G, Navarro Mari J, Galán Montemayor J, Folgueira López M, Pumarola Suñé T. Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2021.
161. Knezevic I, Mattiuzzo G, Page M, Minor P, Griffiths E, Nuebling M, et al. WHO International Standard for evaluation of the antibody response to COVID-19 vaccines: call for urgent action by the scientific community. *Lancet Microbe.* 2022;3(3):e235-e40.
162. Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P, Datir RP, Lim EY, Touizer E, et al. Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature.* 2021;596(7872):417-22.
163. Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A. Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2021;385(7):661-2.
164. Schwarz M, Torre D, Lozano-Ojalvo D, Tan AT, Tabaglio T, Mzoughi S, et al. Rapid, scalable assessment of SARS-CoV-2 cellular immunity by whole-blood PCR. *Nat Biotechnol.* 2022;40(11):1680-9.

ANEXO I: Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis



Innate and Adaptive Immunity Alterations in Metabolic Associated Fatty Liver Disease and Its Implication in COVID-19 Severity

Patricia Lamadrid^{1†}, Marta Alonso-Peña^{2†}, David San Segundo^{1,3}, Mayte Arias-Loste^{2,4}, Javier Crespo^{2,4} and Marcos Lopez-Hoyos^{1,3*}

¹ Transplant and Autoimmunity Group, Research Institute Marques de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ² Clinical and Translational Research in Digestive Pathology Group, Research Institute Marques de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ³ Immunology Department, Marques de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain, ⁴ Gastroenterology and Hepatology Department, Marques de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Hai Huang,
The Ohio State University,
United States

Reviewed by:

Tomas Meroño,
Universitat de Barcelona, Spain
Ka Man Law,
University of California, Los Angeles,
United States

*Correspondence:

Marcos Lopez-Hoyos
marcos.lopez@scsalud.es

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 10 January 2021

Accepted: 08 March 2021

Published: 30 March 2021

Citation:

Lamadrid P, Alonso-Peña M,
San Segundo D, Arias-Loste M,
Crespo J and Lopez-Hoyos M (2021)
Innate and Adaptive Immunity
Alterations in Metabolic Associated
Fatty Liver Disease and Its Implication
in COVID-19 Severity.
Front. Immunol. 12:651728.
doi: 10.3389/fimmu.2021.651728

The coronavirus infectious disease 2019 (COVID-19) pandemic has hit the world, affecting health, medical care, economies and our society as a whole. Furthermore, COVID-19 pandemic joins the increasing prevalence of metabolic syndrome in western countries. Patients suffering from obesity, type II diabetes mellitus, cardiac involvement and metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) have enhanced risk of suffering severe COVID-19 and mortality. Importantly, up to 25% of the population in western countries is susceptible of suffering from both MAFLD and COVID-19, while none approved treatment is currently available for any of them. Moreover, it is well known that exacerbated innate immune responses are key in the development of the most severe stages of MAFLD and COVID-19. In this review, we focus on the role of the immune system in the establishment and progression of MAFLD and discuss its potential implication in the development of severe COVID-19 in MAFLD patients. As a result, we hope to clarify their common pathology, but also uncover new potential therapeutic targets and prognostic biomarkers for further research.

Keywords: MAFLD, NASH, COVID-19, SARS-CoV-2, innate immunity, adaptive immunity

INTRODUCTION

The coronavirus infectious disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has emerged as a global challenge, affecting health and medical care but also economies and society. In an unprecedented way, researchers have unraveled its main clinical and epidemiological features, its pathogenesis and the mayor ways of transmission in record time. Knowledge and improved diagnostics and treatments are increasing day by day. It is not the aim of this review to summarize all these data, available elsewhere (1, 2), but we should highlight that SARS-CoV-2 infection is determined by the interaction of its spike protein with angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and further needs of transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) to initiate fusion and cell infection (3), although other receptors and proteases have

been also involved (3–9). From here on, COVID-19 pathogenesis could evolve in several ways resulting in a wide range of symptoms and severity - from fully asymptomatic to death - (1). Host immune response is key in the course of the disease: immunodeficiency states can facilitate a more aggressive course with progression to severe COVID-19 characterized by a deregulated immune response resulting in the so-called “cytokine storm” (10) and complement-induced coagulopathy (2). Moreover, accumulating data are pointing out that COVID-19 is not just a respiratory disease, but a multi-organ dysfunction (11), in which a “bradykinin storm” starting in the lungs may have a pivotal role (12).

Regarding the digestive system, it is noteworthy that both adult and pediatric COVID-19 patients reported gastrointestinal symptoms including diarrhea, vomiting and abdominal pain during course of the disease. The gut symptoms correlate with markers of liver damage (13). Liver injury in patients with COVID-19 is frequent, although mild in nature, with a hepatocellular rather than cholestatic pattern (14). However, severe COVID-19 is accompanied by higher serum transaminases levels (15). In addition to the respiratory system, the gastrointestinal tract is a major infection site of SARS-CoV-2, as ACE2 is highly expressed in proximal and distal enterocytes (16) and viral nucleocapsid protein has been visualized in the

cytoplasm of gastric, duodenal, and rectum glandular epithelial cells from a COVID-19 patient (17). Hepatocytes also express detectable amounts of both ACE2 and TMPRSS2, thus they are susceptible of SARS-CoV-2 infection (18). Furthermore, the liver is constantly exposed to foreign antigens entering the bloodstream from the gut and keeps a fine balance between the activation of the immune cells for the detection and clearance of pathogens and tolerance towards non-damaging antigens. Due to this reason, the liver has special immune functions and contains the largest number of permanent macrophages, the well-known Kupffer cells (KC). Among their functions, KC are in charge of the clearance of senescent neutrophils and other activated host cells, thus limiting the potential of these cells to produce inflammatory mediators (19).

Older age, male sex, type II diabetes mellitus (DM2) and obesity are mayor risk factors for the development of critically ill COVID-19 (20). Most patients suffering from metabolic associated fatty liver disease - MAFLD, previously known as non-alcoholic fatty liver disease (21) - have all these characteristics (22, 23). Although full description of the mechanisms accounting for DM2 and obesity implication in COVID-19 development have been discussed already (24, 25), **Figure 1** summarizes main contributions of MAFLD, obesity, DM2 and COVID-19 to the overall pathogenesis observed in

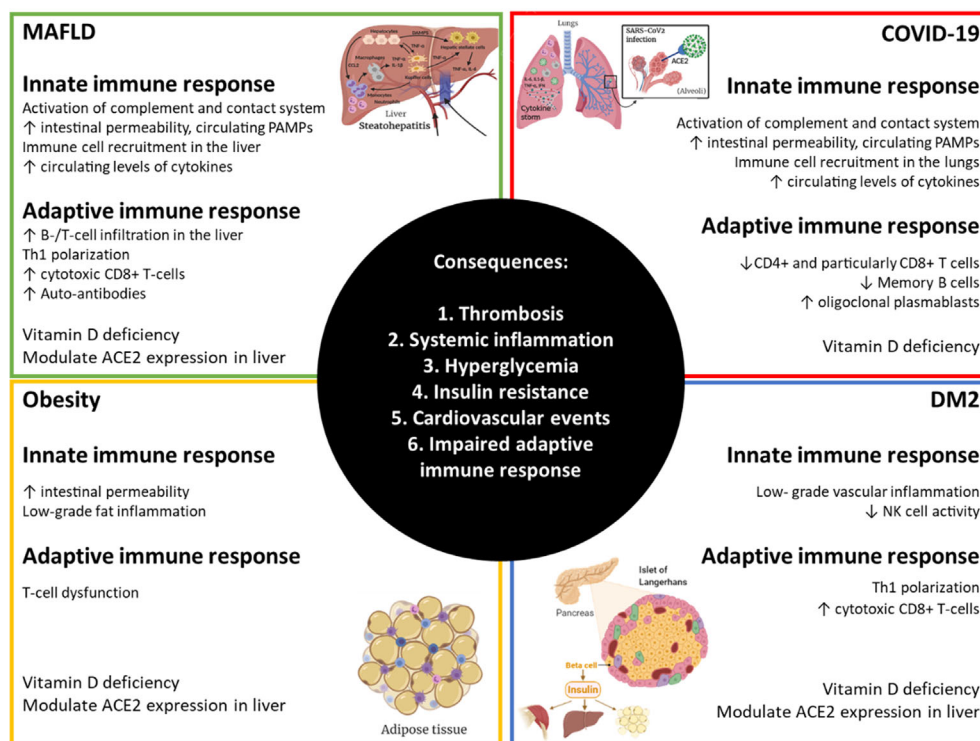


FIGURE 1 | Alterations in immunity that amplify responses to SARS-CoV-2 in MAFLD, obese and DM2 patients. Obesity, diabetes mellitus type 2 (DM2) and metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) are very common comorbidities. Each of them has broad effects on the immune system resulting in impairments in normal homeostasis that can lead to more severe COVID-19. Created with BioRender.com.

severe COVID-19 patients. MAFLD includes a spectrum of liver disease defined by an excessive accumulation of fat in hepatocytes, ranging from hepatic steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). Whereas steatosis is reversible, later stages cannot be cured and current treatment is limited to lifestyle interventions. Disease progression is characterized by increasing lymphocyte infiltration and inflammation in the liver together with fibrosis and reduced liver function. Recently, new factors contributing to MAFLD have been described, such as gut microbiome alterations, changes in intestinal permeability and bacterial antigen translocation (26, 27). MAFLD prevalence is increasing worldwide together with the pandemic of obesity and metabolic syndrome, affecting already 25% of the adult population globally (23). Moreover, it has been shown that liver fat content is determinant of higher risk of severe COVID-19 in obese patients (28) and the risk of obesity to COVID-19 severity is greater in those with MAFLD than in obese patients without MAFLD (29). Increasing evidence is supporting that MAFLD patients are at risk of developing severe COVID-19 (30–32), even in the absence of its common comorbidities (33) and especially in younger patients (34). Patients with MAFLD had a higher risk of disease progression, higher likelihood of abnormal liver function and longer viral shedding time compared to patients without MAFLD (30). Meta-analysis further confirmed that a high percentage of patients with COVID-19 had MAFLD, and MAFLD increased the risk of disease progression among patients with COVID-19 (35, 36). Liver fibrosis by itself has emerged as a risk factor for severe COVID-19 illness (32, 37) and patients with cirrhosis+COVID-19 had a higher mortality rate compared with those with COVID-19 alone (38, 39). Therefore, we want to focus attention on the high percentage of the population who will suffer from both MAFLD and severe COVID-19 without treatment for any of the diseases and the need to prioritize vaccination of these patients. This review is aimed at summarizing current knowledge about the role of the immune system in the establishment and progression of MAFLD and to discuss its potential implication in the development of severe COVID-19 in MAFLD patients. As a result, we hope to clarify their common pathology, but also uncover new potential therapeutic targets and prognostic biomarkers for further research.

ALTERATIONS OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE

Role of Innate Immune Response in MAFLD

There are many components of the innate immune response implicated in the MAFLD pathogenesis and development. Inflammation is an important factor to look out for, due to its capacity to go further and develop HCC, among other tumors (40, 41). Due to the relevant role of innate immunity in MAFLD, in the following sections we will discuss the implication of its different components in MAFLD progression.

Complement and Contact Systems

The complement system is activated, among other stimuli, after liver injury, contributing to the development of NASH and HCC (42). Thus, this liver damage reduces the majority of soluble complement proteins levels which lead to an increase of activation markers, and finally, inflammation. Moreover, some complement proteins, like C3 and C4, can act as acute-phase reactants, increasing the systemic inflammation response by 50% (43).

The synthesis of C3 is clearly enhanced in liver pathogenesis (44) and C1q has also been involved in HCC development (45). Other complement proteins that accumulate around hepatocytes with steatosis, such as iC3b, C3d, C4d and C5b-9, are related to some proinflammatory signals such as neutrophils recruitment and cytokine release (46). Therefore, it can be concluded that the inhibition of a permanently activated complement system may ameliorate the liver damage in NASH disease (47).

The contact system is composed of coagulation factors XI (FXI) and XII (FXII), plasma prekallikrein, and high molecular weight kininogen. The final product of the contact system activation cascade is bradykinin, which has vasodilator and pro-inflammatory properties (48). Because of the majority of coagulation factors are formed in the liver and MAFLD has important metabolic implications, a study showed MAFLD patients seem to have increased coagulation factors levels. It suggested a link between the liver fat content and insulin resistance which may be related to FIX and FXI activities. The increase of FXII in murine models could trigger FIX and FXI, which favors thrombosis appearance and propagation in MAFLD (49).

Pattern Recognition Receptors (PRR)

The Toll-Like Receptor family (TLR) is an important and well characterized class of cell surface or intracellular PRRs, which are highly expressed in many liver cells under metabolic stress, such as KC, hepatic stellate cells, biliary epithelial cells and sinusoidal endothelial cells (40, 41). Some members of the TLR family (TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 and TLR9) have been associated to MAFLD pathogenesis. The TLR signal triggers inflammatory pathways in fat tissue and liver, activating transcription factors such as NF- κ B and IRFs (Interferon Regulatory Factors) and also several inflammatory cytokines (40, 50, 51). TLR4 is remarkably associated to MAFLD. It binds to the Myeloid Differentiation factor 2 protein (MD-2), and this association confers responsiveness to LPS (52). Actually, both animal models and clinical studies have noticed increased levels of circulating LPS in MAFLD due to the intrinsic endotoxemia caused by factors such as intestinal microbiota, intestinal permeability and high fat and/or sugar diet (HFD) (53–55). This last factor could explain the reason why free fatty acids regulate TLR4 positively in presence of high glucose levels (56). In addition, the TLR4-LPS pathway has also been implicated in MAFLD progression to HCC (57). In HFD, gut microbiota is enriched with gram positive bacteria (58, 59). Taking into account that TLR2 recognizes peptidoglycan, a gram positive bacterial component, its blockade in animal models has also a

protective effect in developing insulin resistance, closely related to MAFLD pathogenesis. Actually, some studies have shown that mice with TLR2 deficiency express decreased proinflammatory cytokines by unchaining the inflammasome in KC (50). TLR2 usually forms heterodimers with TLR6, another extracellular receptor increased in NASH patient's hepatocytes. This heterodimer is also present in lobular inflammation. Therefore, TLR6 has been proposed as a potential biomarker in the development of NASH in MAFLD obese patients (60). TLR7 has also been associated with liver fibrosis (61), although its role in MAFLD is not completely elucidated. According to a study, the presence of TLR7 or its agonists can avoid experimental MAFLD development. An autophagy activation marker seems to be regulated by TLR7 and this process can improve steatosis in MAFLD by stimulating lipid degradation. TLR7 stimulation could be a potential therapeutic target to prevent the consequences of MAFLD, but as it is mentioned before, further investigation is required to clarify TLR7 function in this disease (51). Finally, it should be said that TLR9 is the only intracellular receptor involved in MAFLD pathogenesis. Animal model studies have shown that its activation results in IL-1 β production so, along with TLR2 and TLR4, it is strongly involved in NASH and liver fibrosis (50).

The NOD-Like Receptors (NLRs) can form inflammasomes and lead to cell death. NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) is an intracellular protein complex which plays a key role in the innate immune system triggering several inflammatory components. It has been demonstrated that the lack of NLRP3 inflammasome reduces hepatocyte pyroptosis and, in consequence, inflammation and fibrosis in animal models with NASH. Also, some studies in humans and murine models with liver damage have shown increased levels of NLRP3, caspase 1, IL-1 β and IL-18. These facts could play a part in terms of NASH pathogenesis (40, 62).

Innate Immune Cells

Signals stimulate several cellular receptors which can activate different cells types in the liver. Around 15% of them are KC (40). After activation, KC can polarize into two phenotypically different forms or also express both at the same time: one more pro-inflammatory (M1) and other mostly characterized by its immunoregulatory properties (M2). Some studies have shown in mice that a HFD benefits the presence of M1 phenotype and the inflammatory response, while the up-regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) induces the M1 phenotype polarization to a M2 immunoregulatory phenotype. This fact could prevent the progression of MAFLD disease (63). LPS and other bacterial products activate KC recognition by TLRs and trigger M1 phenotype, which produces several pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-12), chemokines (CCL2 and CCL5) and damage-associated molecular patterns (DAMPs). These DAMPs promote liver damage through KC activation by TLR pathway, repeating this inflammation process and leading to hepatocyte injury. The accumulation of other products like several free fatty acids, oxidized lipoproteins and other lipids is

a very important fact to take into account in experimental MAFLD/NASH pathogenesis because of its involvement in KC activation, causing a bigger response to LPS and therefore, disease progression (40).

Alteration in antigen presenting cells, like dendritic cells (DC), is also relevant in NASH, but its role in this disease is complex and not entirely defined. This could be due to the fact that the two subtypes of conventional DC have opposite roles in terms of NASH activity. A recent study showed that, in patients, cDC2 were positively associated with NASH, and both HLA-DR+CD123-CD11c+CD141+ cDC1 and HLA-DR+CD123+ plasmacytoid DC were inversely correlated with NASH and glucose levels (64).

Natural Killer (NK) cells have a controversial function in NASH pathogenesis: some studies link its activation by different cytokines and ligands to MAFLD/NASH, while others show a reduction in its cytotoxic activity in NASH (65, 66). Additionally, NK T cells (NKT) include two distinct subtypes of cells. Thus, type I NKT is activated by lipid accumulation and may play a pro-inflammatory role in MAFLD, while type II NKT could have an opposite function protecting against liver damage (67, 68). Actually, another study performed on patients showed that the level of liver NKT cells was positively associated with disease stage (69).

These apparently opposite effects of innate immune cells could be due to the plasticity of the immune response and it highlights the need to evaluate changes in phenotype and function longitudinally during liver injury.

Cytokines and Other Immune Cells Inflammatory Products

Studies in animal models have shown the involvement of several cytokines in MAFLD, including IL-1 β (70), IL-6 (71), TNF- α (71–73) and IFN- α (74). These results are further supported by clinical findings, although some controversy is still present. IL-1 β and IL-6 levels were significantly higher in patients with NASH compared with MAFLD and control group, but this study failed in detecting increased levels of TNF- α (75). Serum IL-6 levels were increased in patients with advanced fibrosis compared to patients with mild/no fibrosis (76) and they predict the development of DM2 in women (77). TNF mRNA expression was found increased in hepatic and adipose tissue of NASH patients (78). For instance, TNF- α , among others, featured a clear correlation with transaminase levels and histological severity of MAFLD patients and has been proposed as biomarker of disease progression (79). In contrast, early studies in humans exploring TNF- α blockade as a therapeutic target in metabolic diseases did not show beneficial effects. However, those trials were not well conducted and the clinical designs had some drawbacks such as dosing, duration or presence of confounding factors, among others (80). A recent study has found that levels of circulating pro-inflammatory cytokines were variable in MAFLD patients with or without obesity, but when patients were distributed by the presence of circulating bacterial antigens, a statistically significant increase was observed in serum TNF- α and IL-6 levels in MAFLD patients (26).

Several nuclear transcription factors and some intracellular signaling pathways are involved in MAFLD pathogenesis, but Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) are especially remarkable in NASH pro-inflammatory pathways (81, 82). NF- κ B is activated by TLRs and triggers the transduction of IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α (83). JNK overactivation is highly involved in the development of MAFLD and the subsequent liver damage (84). Furthermore, the activation of these pathways links MAFLD and extra-hepatic comorbidities such as insulin resistance and cardiovascular disease (85, 86).

Innate Immunity and COVID-19 Severity in MAFLD Patients

At this point in the research on COVID-19, it is clear that dysregulated and excessive innate immune responses towards SARS-CoV-2 cause immune damage to the human body. Siddiqi et al. elegantly defined COVID-19 pathogenesis in three phases: early infection, pulmonary phase, and hyperinflammation phase (87). The third and most severe phase is defined by a cytokine storm, which results from a sudden acute increase in circulating levels of different pro-inflammatory cytokines and other related proteins including IL-1 β , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1A, MIP1-B, PDGF, TNF- α , VEGF, C-reactive protein, ferritin and D-dimer (87, 88). MAFLD is associated with chronic, low-grade inflammation in the liver that causes systemic effects, detectable by alterations in circulating immune cells and humoral factors (85). Thus, this precondition would ease the progression of COVID-19 into its severe manifestations, as described hereafter.

Complement and Contact Systems

As we already mentioned, the complement system is crucial to trigger an innate immune response to several microorganisms (89) and thus to COVID-19. Actually, some soluble complement proteins, such as C3a and C5a, have proinflammatory functions and they are in charge of immune cell recruitment which can contribute to lung damage in COVID-19 pathogenesis. Although the complement action is not entirely clear about its protection or pathogenicity, a recent study proved the efficacy of a monoclonal antibody against C5/C5a, called eculizumab, in order to ameliorate the pulmonary dysfunction due to COVID-19 (90). Additionally, it has been noticed increased levels of C5a in bronchioalveolar fluid of COVID-19 patients with the most severe symptoms, pointing out the role of this protein in the enhanced inflammation developed in severe COVID-19 patients. Taking this into account, and due to the fact that C5a receptor 1 (C5aR1) levels are also increased in lung neutrophils of severe COVID-19 patients, a study showed anti-C5aR1 therapeutic monoclonal antibodies can fight against C5a action and avoid the infiltration of human myeloid cells in damaged organs, preventing the inflammation developed in severe COVID-19 patients (91). Another study also proved that C3 knockout mice showed lower levels of inflammatory immune innate cells, such as neutrophils and monocytes, leading to reduced SARS-CoV pulmonary injury and suggesting that this virus may activate the complement system (92). As mentioned

before, liver injury induces complement activation markers in MAFLD, and due to the fact that this liver damage pattern is also present in COVID-19 (93), MAFLD patients coexisting with COVID-19 infection could have an increased complement function exacerbating the inflammation. The contact system is also an important part of the innate immune defense against viruses. Actually, it has been shown that SARS-CoV-2 penetrates the cell *via* ACE2. Thus, it has been suggested a target therapy consisting of ACE2 direct activation, which avoid SARS-CoV-2 protein S binding to ACE2 (94–96). Moreover, ACE2 has the capacity of degrading des-Arg bradykinin, which is the ligand of the bradykinin receptor type 1 (B1). Once activated, B1 signaling leads to pulmonary angioedema. SARS-CoV-2 infection impairs ACE2 function; therefore, des-Arg bradykinin is accumulated, producing pulmonary angioedema in COVID-19 patients (97). B1 blocking is also a potential strategy to ameliorate pulmonary complications in COVID-19. The complement system, as well as the contact system, seems to be important player in the progression of COVID-19 and, as we mentioned before, their function is altered in MAFLD patients. Although eculizumab is the only approved treatment for humans that inhibits complement cascade at the moment (96), anti-C5aR1 monoclonal antibodies blocking this receptor are a promising and more specific treatment in severe COVID-19 patients due to the fact that C5a is a chemoattractant factor that facilitates the adherence of leukocytes to the endothelium (91).

Pattern Recognition Receptors (PRR)

One of the first mechanisms linking COVID-19 severity and MAFLD affects the most basic elements of innate immunity: physical barriers. Several authors suggest that the increased risk observed in MAFLD patients is driven by SARS-CoV-2 infection of the gut, which exacerbates an existing state of intestinal permeability and mucosal inflammation, increasing the transmission of pathogen-associated molecular patterns to the liver and affecting systemic immune response (98–101). Supporting data is preliminary, but some authors have already shown that COVID-19 patients have altered fecal microbiota (102–105) and plasma markers of gut leakage and inflammasome activation are increased in COVID-19 patients, especially in those with cardiac involvement (106).

Some evidence also pointed out at TLR signaling as possible impaired mechanisms in severe COVID-19. On one hand, bioinformatics studies have shown that SARS-CoV-2 genome possess multiple single-stranded RNA sequences probably recognized by TLR7 and 8 (107). A case-series article identified four young men from two families carrying rare and inactivating mutations in TLR7 who suffered from severe COVID-19 in the absence of common comorbidities (108). Although these mutations are unlikely to be an explanation for severe COVID-19 in the general population, other mechanisms accounting for TLR7 signaling impairment could result in a similar situation. Accordingly, some authors hypothesize that chronic stimulation of TLR7 by intrinsic substrates could lead to a desensitization of TLR7 signalling. Therefore, the immune response in those patients will be delayed upon viral infection, but when resensitization finally

occurs, it leads to an overwhelming TLR7 response (109). As mentioned before, TLR7 seems to perform a protective role in liver injury (61) and MAFLD (51), but it has been also described that liver injury can promote pulmonary inflammation through the activation of TLR7/8 in alveolar macrophages. Based in human samples and animal models, authors found that injured hepatocytes release miRNA-122, which is preferentially transported to the lungs where it triggers TLR7/8 signaling eliciting macrophage inflammatory responses (110). On the other hand, TLR3 and TLR4 knock-out mice have shown its relevance in preventing SARS-CoV lethal infection, in which TRIF adaptor protein has a central role (111). In this sense, a small study analyzed PBMCs transcriptomics in patients with COVID-19 and observed that the expression of TLR4 and downstream signaling molecules were significantly upregulated. These authors also showed that SARS-CoV-2 proteins increased the expression of the TLR4 ligand S100A8/A9 in PBMCs *in vitro*, proposing that SARS-CoV-2 infection can product a feed-forward loop through TLR4 activation that sustained the inflammation in COVID-19 patients (112). As mention before, MAFLD patients have increased intestinal permeability, resulting in increased circulating levels of LPS (113). In conclusion, patients suffering from MAFLD could suffer a chronic stimulation of TLR7/8 and TLR4 in the alveolar macrophages, which make them more vulnerable to severe COVID-19.

Finally, SARS-CoV-2 is able to induce NRPL3 inflammasome (114–116), which is also a major contributor to hepatocyte death in NASH. Recently, it has been shown that the magnitude and course of NRPL3 activation has an important role in the clinical outcome of COVID-19 patients during their hospitalization period. NRPL3 presence in PBMCs of these patients, together with high levels of casp1p20, among others, support this statement and suggest inflammasome can act not only as a marker of severity, but also prognosis and even as a therapeutic target (117).

Innate Immune Cells

The innate immune system appears to have an opposite role to adaptive responses in SARS-COV2 infections; several innate immune cells sometimes contribute to the progression of the disease (118). Actually, lung inflammation caused by COVID-19 can be aggravated because of macrophage activation syndrome and its production of several inflammatory cytokines (IL-6, IL-7, TNF), chemokines (CCL2, CCL3, CXCL10) and the soluble form of α -chain of the IL-2 receptor (119, 120). In COVID-19 patients, hepatocellular liver damage is apparently frequent, and knowing that liver macrophages are able to produce a great variety of cytokines, it could be suggested a leaning towards M1 macrophages polarization of these immune cells thus contributing to the development of COVID-19 in MAFLD (93). Not only macrophages take part in COVID-19 pathogenesis, other immune innate cells such as monocytes and neutrophils are involved, and their levels in COVID-19 patients were found increased (121). Severe COVID-19 patients showed high levels of two essential monocyte recruitment chemokines: CCL2 and CCL7 (122). In another study of COVID-19 patients who needed ICU hospitalization, a remarkable CD14+CD16+ monocyte levels that

also produce IL-6 were noticed (120). The inflammatory environment induced by these cells cause an excessive inflammation which could be even more dangerous than the virus infection itself (121). Additionally, the sex differences in COVID-19 patients are an interesting fact because they could be related to hormonal dependency: some immune innate cells such as neutrophils, macrophages, DC and NKs depend on estrogen and testosterone to mature and differentiate, without forgetting they can be modulated by individual variability and genetic background (123). Interestingly, a recent published study reported that MAFLD could also have sex specific preferences: several metabolic pathways and other inflammatory processes in the liver are regulated by estrogen receptors (124).

Cytokines and Other Immune Cells Inflammatory Products

As already mentioned, cytokines emerged as key players in severe COVID-19, correlating directly with lung injury and multiorgan failure. Actually, serum IL-6 level has been widely accepted as prognostic marker in COVID-19 as its elevation is the most frequently reported (88). For this reason, tocilizumab, a humanized anti-IL-6-receptor monoclonal antibody, has been proposed as a treatment for severe COVID-19 and used as an emergency and compassionate treatment (125, 126). It is currently under evaluation in clinical trials, with promising preliminary results (127, 128). Several clinical trials are also evaluating the efficacy of IL-1 β inhibitors, such as anakinra and canakinumab, in preventing COVID-19 pneumonia and its associated cytokine storm; but, for now, the only evidence came from CAN-COVID interim analysis, in which canakinumab has failed to meet primary endpoints (129). Nonetheless, the cytokine storm involves lots of different pro-inflammatory cytokines; therefore, general immunosuppression could be even more effective. At this regard, corticosteroids have also been evaluated for the treatment of severe COVID-19 and, although earlier meta-analysis conclude with negative results (130), CoDEX clinical trial showed increased ventilator-free days in treated patients (131) and the WHO REACT Working Group further support lower 28-day all-cause mortality in critically ill COVID-19 patients receiving systemic corticosteroids (132). An important issue in the context of cytokine inhibition is to determine the right timing for treatments. For instance, IFN has been recommended as first-line antiviral in SARS-CoV-2 infection, although evidence is weak for now (133). Taking into consideration that MAFLD patients have increased basal levels of circulating cytokines, these patients may benefit for early intervention with immunosuppressive therapy. However, liver functions may be compromised in MAFLD patients and, accordingly, any therapeutic intervention should consider that drug metabolism could be impaired and further result in liver injury (134, 135). On the other hand, as mentioned previously, the immune response is dynamic and it is possible that many of the failed anti-cytokine therapies in COVID-19 may relate to the time of introduction of the treatment in the course of the disease.

Figure 2 summarizes the main concepts discussed in this section.

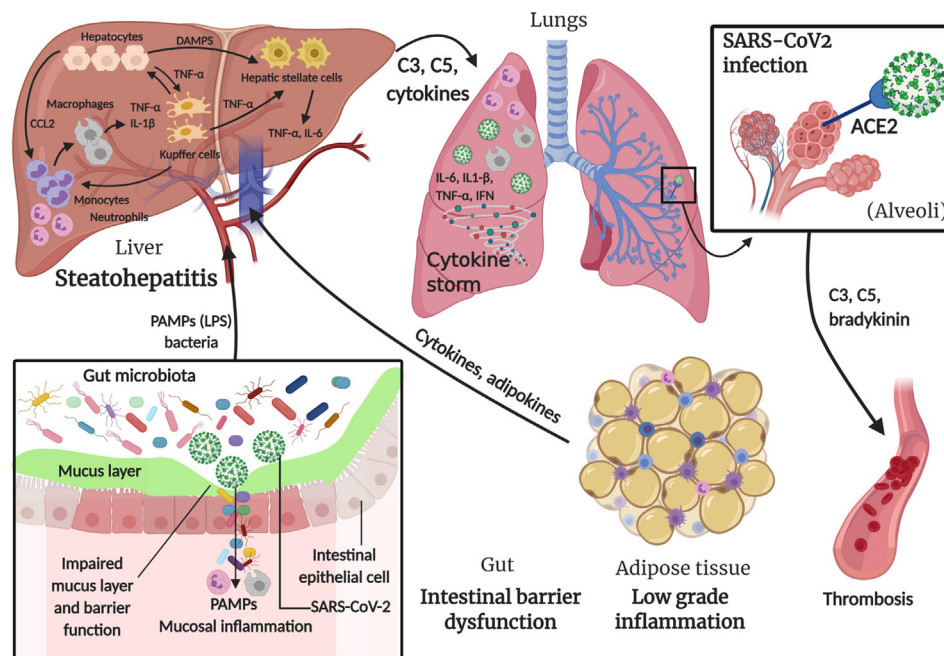


FIGURE 2 | Involvement of innate immune system in MAFLD and SARS-CoV-2 infection. In metabolic associated fatty liver disease (MAFLD), intestinal barrier dysfunction caused by intrinsic endotoxemia due to alterations in gut microbiota, adipose tissue low grade inflammation and the excess of fat in hepatocytes, lead to a series of events triggering the innate immune response in order to restore the perturbed environment. SARS-CoV-2 infection also contributes to intestinal mucosal inflammation, in addition to main lung inflammation caused by the virus entry through angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in alveoli, which can also lead to thrombosis through a “bradykinin storm”. All these triggers lead to a massive “cytokine storm” with multiorgan effect. Created with BioRender.com.

ALTERATIONS OF THE ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE

Role of Adaptive Immune Responses and Innate-Adaptive Interplay in MAFLD

Although the implication of innate immune response and inflammation in MAFLD progression seems clear, recent findings have also uncovered a role of adaptive immune responses. As stated before, lipid accumulation in hepatocytes is an early finding in MAFLD and ROS generation is considered one of the main drivers of the diseases. In this sense, oxidized phospholipids and reactive aldehydes generated during lipid peroxidation form antigenic adducts with cellular macromolecules known as oxidative stress derived epitopes (OSEs) (136). These epitopes trigger both humoral and cellular adaptive immune responses. Much of the role of adaptive immunity in MAFLD is supported by the results obtained from different experimental models, including obesity related MAFLD (mice under different types of HFD) and NASH development in lean individuals (such as mice in methionine and choline deficient diet or similar diets, MCD). In this sense, comparison between mice living in specific pathogen-free (SPF) conditions with those housed on non-SPF showed that the latter had higher memory and effector T cells both under normal and HFD. These results were also observed in the liver: more than 95 and 85% of CD4+ and CD8+ T cells, respectively, expressed the

effector memory T cell phenotype in non-SPF mice on HFD, which was accompanied by severe steatosis, lobular inflammation, hepatocellular ballooning and destroyed lobule structure while only some SPF mice displayed a mild fat accumulation in the liver (137). On the other hand, mice following a HFD showed reduced antigen-specific humoral and cellular immune responses after receiving hepatitis B vaccine due to diminish antigen processing and presentation (138). Recently, it has been also reported that follicular T helper cells are impaired in patients with advanced liver cirrhosis due to increased IL-2 signaling (139). These results give an early notion that adaptive immunity activation directly impact on MAFLD severity and, at the same time, MAFLD and cirrhosis result in impaired adaptive immunity activation towards other antigens. In this sense, exploring the immune response to SARS-CoV-2 vaccination seems mandatory in MAFLD and comparison between obese and non-obese patients.

Elevated titers of IgG anti-OSEs such as malondialdehyde adduct with human serum albumin (MDA-HSA), arachidonic acid hydroperoxide adduct with human serum albumin (AAHP-HSA) and oxidized cardiolipin (Ox-CL) have been found in MAFLD patients compared with controls. Moreover, 29–39% of total MAFLD patients had anti-OSEs IgG titers above the 97.5th percentile in controls, which defines a positive titer. MAFLD patients with positive anti-MDA-HSA antibodies had a threefold higher risk of having advanced fibrosis or cirrhosis compared with

patients whose antibody titers were within the control range (140). Similar results were observed in pediatric MAFLD patients; in this case, authors found that 63% of patients had circulating IgG against anti-MDA-HSA above the control threshold. At the histology, patients with elevated anti-MDA-HSA antibodies showed higher scores of lobular inflammation than subjects with antibodies within control range (141). In an independent and more recent study, humoral immunity against OSE was confirmed by measuring circulating IgG anti-MDA adducts. They found that 43% of MAFLD/NASH patients had titers of anti-OSE IgG above the control threshold. The prevalence of advanced fibrosis or cirrhosis was higher among the subjects with elevated anti-OSE IgG (142). In this line, studies with MCD fed mice showed that the extension of liver injury and lobular inflammation paralleled the development of anti-MDA IgG antibodies and CD4+ and CD8+ T-lymphocytes responsive to the same antigens. Besides, further treatment with MDA-adducted bovine serum albumin stimulated transaminase release, lobular inflammation, and the hepatic expression of proinflammatory cytokines in MCD-fed mice, involving liver recruitment of the Th1 cells (143). These studies point out the early implication of humoral immunity in the recruitment of immune cells to the liver in MAFLD and the sustained autoimmune response as a factor contributing to disease progression. On the contrary, in a smaller cohort, Hendriks et al. described no differences in plasma IgG anti-OSEs titers in MAFLD patients and healthy controls. Besides, they found decreased IgM anti-OSEs titers in MAFLD patients, although only IgM titers towards the specific malondialdehydeacetaldehyde P1 mimotope remained significant after adjusting for total IgM levels. They also showed that IgM titers against P1 mimotope inversely correlate with markers of obesity, systemic inflammation and liver damage, gaining a protective role (144). Moreover, low anti-adipocyte IgG antibodies have been observed in MAFLD patients in comparison to controls, whereas anti-adipocyte IgM antibodies were increased and correlated with portal inflammation (145). Finally, autoimmune hepatitis and common autoantibodies are more prevalent in MAFLD patients than in the general population (146–149), although its relevance in disease progression is unclear (149, 150). Thus, humoral response in human MAFLD is still controversial and deserves further research.

Cellular adaptive responses have been also described in MAFLD patients. 63% of MAFLD/NASH patients showed CD20+ B-cell and CD3+ T-cell aggregates in liver biopsies as determined by immunostaining (151). B and T lymphocyte infiltration in the liver of experimental models of MAFLD has been widely described (152–157). Patients with high B-/T-cell infiltration had elevated anti-OSE IgG titers as well as higher scores of lobular inflammation and fibrosis than the subjects with low/mild infiltration. The number and size of lymphocyte aggregates positively correlated with circulating IFN- γ levels, lobular inflammation score and fibrosis staging (142). NASH patients showed increased serum B-cell Activating Factor (BAFF) (158). Although little is known about the role of B lymphocytes in MAFLD pathogenesis, in mice receiving the MCD diet, hepatic B2-lymphocytes significantly declined in parallel with the onset of steatohepatitis and increasing titers of

circulating anti-OSE IgG, accompanied by increased markers of lymphocyte activation and plasmablasts and cells expansion. Selective depletion of B2-lymphocytes resulted in reduced liver plasma cell maturation, anti-OSE IgG production, impaired liver recruitment of T lymphocytes, ameliorated lobular inflammation score and the prevalence of necrotic foci without affecting the extension of steatosis upon the induction of NASH. B-cell responses in NASH were associated to the up-regulation in the liver of BAFF. Thus, BAFF neutralization also ameliorated histological scores for steatosis and lobular inflammation as well as ALT release, liver triglycerides and hepatic expression of pro-inflammatory mediators (142). Moreover, B lymphocytes seemed to infiltrate earlier in the liver of HFD mice than T cells (159).

On the contrary, T cell alterations both in peripheral blood and intrahepatic infiltrates from MAFLD patients have been widely described. In this sense, several lines of evidence suggest that NASH should be considered a Th1-polarized disease (64, 74, 160–164). Circulating CD4+ cells rose in adult NASH patients (160, 162), together with an increased proportion of memory CD45RO+ cells and decreased of naïve CD45RA+ (151, 160). Similarly, CD8+CD45RO+ subpopulation was increased while CD8+CD45RA+ declined (151, 160). In pediatric NASH, whereas CD45RO and CD45RA subpopulations were similarly distributed among circulating CD4+, CD8+CD45RO and CD8+CD45RA subpopulations were found simultaneously increased in patients, which refers to a greater pool of CD8 T cells undergoing activation (161). Moreover, a higher frequency of IFN- γ -producing Th1 lymphocytes was observed as well as CD8+ cells retaining a cytotoxic phenotype (160, 161). In liver biopsies, IFN- γ -producing CD8+ cells were also increased both in adult and pediatric NASH (64, 160, 161). CD8+ T lymphocytes localized within inflammatory foci in close proximity to steatotic and ballooned hepatocytes and showed associations with lobular inflammation, ballooning and hepatic genes related to cytotoxic and IFN- γ responses, T helper differentiation and TNF- α signaling, strongly suggesting the presence of a local cytotoxic response in the liver (64). Other authors have observed that also the frequency of IL-4+ Th2 cells among CD4+ T cells was significantly elevated in patients with MAFLD and NASH in comparison with controls (151, 162). Moreover, analysis of intrahepatic lymphocytes showed significantly higher frequencies of intrahepatic IL-17, IL-4, and IFN- γ -producing T cells compared with peripheral blood. The greatest difference between intrahepatic and peripheral T cells was seen for the frequency of IFN- γ + cells among CD4+ T cells both for MAFLD and NASH. In livers from MAFLD and NASH groups, up to 44% of CD4+ T cells expressed the activation marker HLA-DR, thus contributing actively to pathogenesis *in situ*. However, Th17 cells were more frequent in the liver of patients with NASH in comparison with hepatic tissue from patients with MAFLD, which could differentiate disease stage (162). Regarding regulatory T-cells (Tregs), MAFLD patients showed a significantly lower frequency of naïve Tregs (CD4+CD45RA+CD25++) among CD4+ T cells in peripheral blood in comparison with controls, while NASH patients had an even lower frequency of these cells. The opposite was true for activated Tregs (CD4+CD45RA-CD25+++), suggesting

increased turnover/consumption of Tregs in patients as a result of increased activation of the naïve Tregs (162). Another study reported that Foxp3+ Tregs are increased in the liver of NASH patients and its frequency among T cells correlated to higher NASScore (165). Moreover, oral treatment with anti-CD3 monoclonal antibodies improved serum transaminases and fasting plasma glucose in a small cohort of NASH patients through increasing circulatory Tregs (166). Although evidence is still scarce, we can hypothesize that Tregs may get activated and infiltrate to the liver in MAFLD patients as a compensatory mechanism for the enhanced local immune response, which in the context of sustained liver damage could favor the development of liver cancer (167). On the contrary, studies in the liver of HFD fed mice have shown that percentages of CD4+IFN- γ + Th1 cells and CD4+IL-17+ Th17 cells were increased remarkably, while CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells were decreased significantly (168, 169), which parallels the imbalance in T cell activation in the mesenteric lymph node. Chemotaxis of CD4+ from mesenteric lymph nodes to the liver was demonstrated, thus linking gut immunity alterations and MAFLD (168, 170). In this sense, although lymphocyte infiltration in the liver is mainly associated with bad prognosis in MAFLD, several studies in experimental models have shown that CD4+ T cell depletion could increase the risk of HCC development (171–173). On the contrary, maintained CD8+ cytotoxic responses seem to favor carcinogenesis (156, 157).

On the other hand, conflicting results have been reported. For instance, no differences between control, MAFLD and NASH in B cell or T cell populations have been described (174). Other studies have shown a reduction of circulating CD8+ T cells in MAFLD patients in comparison to control healthy subjects (151) or between steatosis stages (175). Moreover, circulating Th2 cells were observed increased while Th1 cells, Th17 cells and Tregs cells had similar frequencies in MAFLD patients compared to healthy controls (151). These contradictory results could be due to the common comorbidities associated to MAFLD, namely DM2 and obesity, and its different representation in the cohorts. Thus, several authors have analyzed the different immune response in MAFLD, DM2 and obese patients. Regarding the humoral response, MAFLD patients diagnosed with diabetes or hyperlipidemia were found to have significantly lower levels of anti-adipocytes IgG antibodies when compared with MAFLD patients with none of the comorbidities. Furthermore, anti-adipocytes IgM correlated positively and significantly with body-mass index while the contrary was true for anti-adipocytes IgG (145). After multiplex determination of cytokines in obese patients, Vonghia et al. concluded that DM2 patients showed a disturbed Th1/Th2 balance towards Th1 polarization, but, at the intrahepatic level, a mixed Th1 and Th2 impairment occurred and Th2 response was common to DM2 and NASH. Moreover, patients with advanced fibrosis showed higher intrahepatic INF- γ and IL-1 β , which can stimulate the cells towards a pro-inflammatory Th1 phenotype (176). Besides, other authors stated that the hepatic expression levels of several mediators of the immune response are modified in all morbidly obese patients, regardless steatosis or

inflammation, while NASH appears preferentially associated with a better antigen presentation and a Th1 response, highlighting again the relevance of adaptive immunity in MAFLD progression (163). Finally, authors analyzed the association of differentially expressed genes and immune cell populations in a large cohort of obese patients showing common metabolic comorbidities. IL-10+ CD4 T lymphocytes and cytotoxic CD8 T were positively associated with lobular inflammation, ballooning and glucose levels, thus linking NASH activity and DM2. Th2 lymphocytes and Tregs were mostly negatively associated with NASH and glucose parameters (64).

Adaptive Immunity and COVID-19 Severity in MAFLD Patients

Lymphopenia is a common feature of severe COVID-19, characterized by drastically reduced absolute numbers of CD4+ and particularly CD8+ T cells which correlates with COVID-19 severity and associated mortality (177, 178). Levels of T cell surface molecules (CD4, CD8 and CD2), T cell migration stimulators (DDP4), TCR signaling kinases (ZAP70, LCK and FYN) and MHC class II molecules (HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB4 and HLA-DRB5) were also significantly lower in patients with severe disease (179). Peripheral CD8+ T cells from patients with COVID-19 express high levels of exhaustion markers, including programmed cell death protein 1 (PD1) and T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM3); of note, this expression pattern was more pronounced among patients who required intensive care than in patients with mild disease (180). Analyses of circulating B cells showed expansion of oligoclonal plasmablasts and reduced memory B cell frequencies in patients with severe COVID-19 compared with responses in patients with mild disease or healthy individuals (181, 182). Taking all together, severe COVID-19 patients show a global impairment in the adaptive immune response. As stated before, adaptive immune responses towards auto-antigens in NASH result in lymphocyte infiltration in the liver, with a pro-inflammatory Th1 phenotype and increased consumption of Tregs. These mean a basal increased exhaustion of the adaptive immune system in NASH patients in comparison with healthy people, which could lead to a worse adaptive response towards SARS-CoV-2 infection. Th1 phenotype is also observed in lungs during SARS-CoV-2 infection, as macrophage phagocytosis of infected alveolar epithelial cells stimulate T cells to secrete IFN- γ and favors alveoli inflammation, forming a detrimental positive loop for severe COVID-19 (134). Moreover, a preliminary study with a Chinese cohort of COVID-19 patients showed that patients with MAFLD and increased neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission are at substantially higher risk of severe COVID-19, irrespective of age, sex and metabolic comorbidities, indicating that the inability to transit from innate immune responses to adaptive ones is determinant in the progression of COVID-19 in MAFLD patients (183). Nonetheless, evidence is still very scarce and mechanisms underlying the pathophysiological links between metabolic syndrome and COVID-19 are mainly unproven. **Figure 3** summarizes the main concepts discussed in this section.

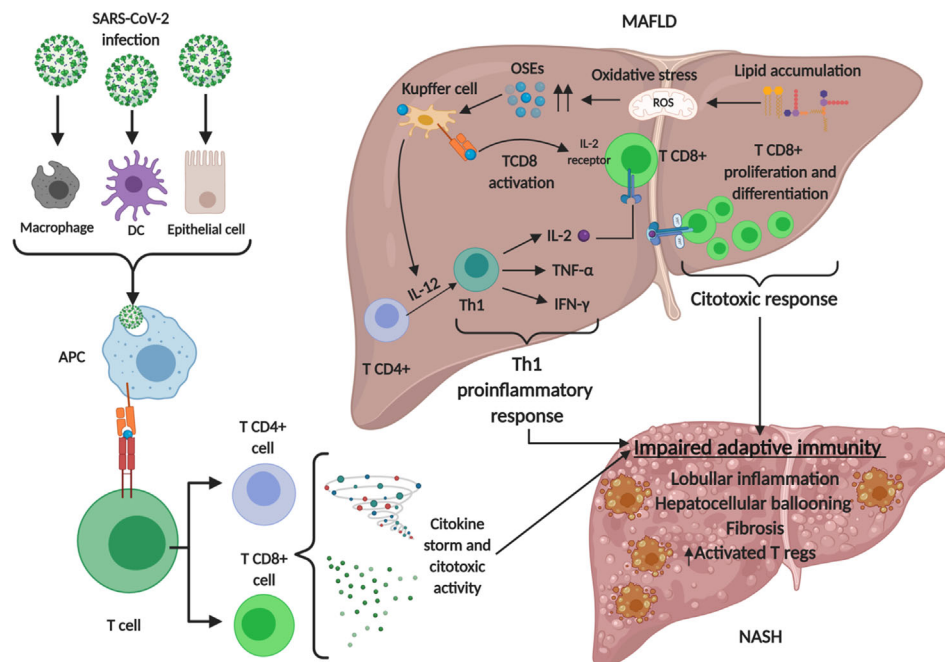


FIGURE 3 | Involvement of adaptive immune system in MAFLD and SARS-CoV-2 infection. Lipid accumulation in metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) causes oxidative stress and lipid peroxidation, generating oxidative stress derived epitopes (OSEs). These products lead to adaptive immune stimulating T cells toward Th1 proinflammatory phenotype and activating T CD8 cells which express interleukin 2 (IL-2) receptor to develop a cytotoxic response. These events, together with SARS-CoV-2 infection lead to an impaired adaptive immune response. Regulatory T cells (Tregs) infiltrate to the liver as a compensatory mechanism for the enhanced local immune response. Created with BioRender.com.

OTHER FACTORS INVOLVED IN MAFLD AND COVID-19 PATHOPHYSIOLOGY

Other factors could be responsible for the high incidence of severe COVID-19 in MAFLD patients. For instance, ACE2 is normally expressed in low amounts in cholangiocytes and hepatocytes, but it is increased in chronic liver damage and in experimental set-ups of diet-induced MAFLD, where it may exert anti-obesity and anti-inflammatory effects. Therefore, liver injury could lead to increased viral load and worsened effects of COVID-19 (184). In this line of research, SARS-CoV-2 entry factors are differently affected by DM2 and MAFLD in the liver of obese patients. While obese women with DM2 have lower expression of ACE2 and TMPRSS2 than obese normoglycemic women, obese men with NASH show markedly higher levels of these genes (18), which may explain the higher risk of severe COVID-19 in these patients (29). Very preliminary data suggest that liver injury in COVID-19 is more likely due to the exacerbated immune responses than for direct viral infection, but, to affirm this, postmortem liver biopsy was only performed in one patient (30).

Furthermore, it has been shown that COVID-19 severe patients also have downregulation of some classes of metabolites as well as dysfunctional metabolic processes, leading to a loss of important circulating nutrients. This fact, together with high cytokine levels and a proinflammatory

environment, contribute to a possible hepatic dysfunction worsening the patient condition (185).

As mentioned before, the liver has special immune characteristics. Besides, its role as a secretory organ, particularly with respect the regulation of coagulation and hemostasis, makes it indispensable for intertissue communication. The steatotic and injured liver could therefore produce hepatokines that may alter the function of other systems, making MAFLD a multi-systemic disease. These molecules have been implicated in the development of increased adiposity, kidney injury, DM2 and cardiovascular disease (186). All these comorbidities are risk factors for severe COVID-19, and therefore evaluating the role of hepatokines in the progression of COVID-19 would be reasonable, but no attempts have been performed until day.

CONCLUSION

Increasing evidence is confirming an enhanced risk of severe COVID-19 in MAFLD patients, together with other common comorbidities of this disease such as DM2 and obesity. In this sense, a well-established paradigm in MAFLD pathogenesis is the chronic low-grade inflammation, which is the perfect niche for the development of a cytokine storm upon SARS-CoV-2 infection. As discussed along the text, TLR signaling might be sustained in MAFLD and COVID-19, leading to a

hyperactivation of neutrophils and macrophages that produce large systemic levels of proinflammatory molecules. Not only regarding cytokines, the dysfunction of the innate immune response is key in both diseases, affecting the integrity of physical barriers, especially in the intestine; and the complement and contact systems, which are also responsible for the severe and long-lasting manifestations of COVID-19. Furthermore, the needed transition between innate and adaptive immune responses seems to be impaired in severe COVID-19. The dysregulation of adaptive responses is already present in MAFLD patients, who also have a proinflammatory T cell response and exhaustion of Tregs. Besides, humoral responses are activated towards auto-antigens in some cases. In this setting, proper adaptive immunity could not be expected.

Taking into consideration all these pathological mechanisms, several therapeutic approaches have been proposed. ACE2 direct activation has been considered to prevent SARS-CoV2 infection. Additionally, the efficacy of anakinra and canakinumab (IL-1 β inhibitors) in preventing COVID-19 pneumonia and its associated cytokine storm is also being tested in several clinical trials; but, for now, canakinumab has failed to meet primary endpoints. To keep combating the inflammation, eculizumab is at the moment the only medication approved for humans to prevent the complement cascade in order to ameliorate the

pulmonary dysfunction due to COVID-19, but also specific C5aR1 blockade is a very promising therapy to fight against severe COVID-19. General immunosuppression, through inhibition of NF- κ B or treatment with corticoids reduces the cytokine storm, helping to diminish the inflammatory environment created by both MAFLD and COVID-19 diseases.

Last of all, immune independent mechanisms can also account for the increased risk of severe COVID-19 in MAFLD patients, but current studies are very limited.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, JC and ML-H. Writing—original draft preparation, PL and MA-P. Writing—review and editing, DS, MA-L, JC, and ML-H. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research received funding by the ISCIII (COV20/0170 and PI19/01509) and Cantabria Government (2020 UIC22-PUB-0019) to ML-H.

REFERENCES

- Machhi J, Herskovitz J, Senan AM, Dutta D, Nath B, Oleynikov MD, et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J Neuroimmune Pharmacol* (2020) 15(3):359–86. doi: 10.1007/s11481-020-09944-5
- Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* (2021) 17:46–64. doi: 10.1038/s41581-020-00357-4
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* (2020) 181(2):271–80.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
- Amraie R, Napoleon MA, Yin W, Berrigan J, Suder E, Zhao G, et al. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2 and are differentially expressed in lung and kidney epithelial and endothelial cells. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.06.22.165803
- Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, Zeng Q, Rothlauf PW, Sonnek NM, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol* (2020) 5(47):eabc3582. doi: 10.1126/sciimmunol.abc3582
- Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* (2020) 11(1):1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9
- Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(33):11876–81. doi: 10.1073/pnas.0505577102
- Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* (2020) 370(6518):856–60. doi: 10.1126/science.abd2985
- Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2020) 117(13):7001–3. doi: 10.1073/pnas.2002589117
- Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect* (2020) 80(6):607–13. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037
- Wu T, Zuo Z, Kang S, Jiang L, Luo X, Xia Z, et al. Multi-organ Dysfunction in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *Aging Dis* (2020) 11(4):874–94. doi: 10.14336/AD.2020.0520
- Garvin MR, Alvarez C, Miller JJ, Prates ET, Walker AM, Amos BK, et al. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm. *Elife* (2020) 9:e59177. doi: 10.7554/eLife.59177
- Pan L, Mu M, Yang P, Sun Y, Wang R, Yan J, et al. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. *Am J Gastroenterol* (2020) 115(5):766–73. doi: 10.14309/ajg.0000000000000620
- Xie H, Zhao J, Lian N, Lin S, Xie Q, Zhuo H. Clinical characteristics of non-ICU hospitalized patients with coronavirus disease 2019 and liver injury: A retrospective study. *Liver Int* (2020) 40(6):1321–6. doi: 10.1111/liv.14449
- Xu L, Liu J, Lu M, Yang D, Zheng X. Liver injury during highly pathogenic human coronavirus infections. *Liver Int* (2020) 40(5):998–1004. doi: 10.1111/liv.14435
- Liang W, Feng Z, Rao S, Xiao C, Xue X, Lin Z, et al. Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. *Gut* (2020) 69(6):1141–3. doi: 10.1136/gutjnl-2020-320832
- Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* (2020) 158(6):1831–3.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.055
- Fondevila MF, Mercado-Gómez M, Rodríguez A, Gonzalez-Rellan MJ, Iruzueta P, Valentí V, et al. Obese patients with NASH have increased hepatic expression of SARS-CoV-2 critical entry points. *J Hepatol* (2020) 73(3):717–18. doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.027
- Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:247–77. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052415
- Maffetone PB, Laursen PB. The Perfect Storm: Coronavirus (Covid-19) Pandemic Meets Overfat Pandemic. *Front Public Health* (2020) 8:135. doi: 10.3389/fpubh.2020.00135

21. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Panel IC. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* (2020) 158(7):1999–2014.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312
22. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* (2020) 73(1):202–9. doi: 10.1016/j.jhep.2020.07.045
23. O'Hara J, Finnegan A, Dhillon H, Ruiz-Casas L, Pedra G, Franks B, et al. Cost of non-alcoholic steatohepatitis in Europe and the USA: The GAIN study. *JHEP Rep* (2020) 2(5):100142. doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100142
24. O'Rourke RW, Lumeng CN. Pathways to Severe COVID-19 for People with Obesity. *Obesity (Silver Spring)* (2020). doi: 10.1002/oby.23099
25. Lim S, Bae JH, Kwon HS, Nauck MA. COVID-19 and diabetes mellitus: from pathophysiology to clinical management. *Nat Rev Endocrinol* (2021) 17(1):11–30. doi: 10.1038/s41574-020-00435-4
26. Gómez-Hurtado I, Gallego-Durán R, Zapater P, Ampuero J, Aller R, Crespo J, et al. Bacterial antigen translocation and age as BMI-independent contributing factors on systemic inflammation in NAFLD patients. *Liver Int* (2020) 40(9):2182–93. doi: 10.1111/liv.14571
27. Sookoian S, Salatin A, Castaño GO, Landa MS, Fijalkowky C, Garaycochea M, et al. Intrahepatic bacterial metatranscriptomic signature in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* (2020) 69(8):1483–91. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318811
28. Roca-Fernandez A, Dennis A, Nicolls R, McGonigle J, Kelly M, Banerjee R. High Liver Fat Associates With Higher Risk Of Developing Symptomatic COVID-19 Infection - Initial UK Biobank Observations. *medRxiv* (2020). 2020.06.04.20122457. doi: 10.1101/2020.06.04.20122457
29. Zheng KI, Gao F, Wang XB, Sun QF, Pan KH, Wang TY, et al. Letter to the Editor: Obesity as a risk factor for greater severity of COVID-19 in patients with metabolic associated fatty liver disease. *Metabolism* (2020) 108:154244. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154244
30. Ji D, Qin E, Xu J, Zhang D, Cheng G, Wang Y, et al. Non-alcoholic fatty liver diseases in patients with COVID-19: A retrospective study. *J Hepatol* (2020) 73(2):451–3. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.044
31. Zhou YJ, Zheng KI, Wang XB, Sun QF, Pan KH, Wang TY, et al. Metabolic-associated fatty liver disease is associated with severity of COVID-19. *Liver Int* (2020) 40(9):2160–3. doi: 10.1111/liv.14575
32. Targher G, Mantovani A, Byrne CD, Wang XB, Yan HD, Sun QF, et al. Risk of severe illness from COVID-19 in patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and increased fibrosis scores. *Gut* (2020) 69(8):1545–7. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321611
33. Gao F, Zheng KI, Wang XB, Yan HD, Sun QF, Pan KH, et al. Metabolic associated fatty liver disease increases coronavirus disease 2019 disease severity in nondiabetic patients. *J Gastroenterol Hepatol* (2020) 36(1):204–7. doi: 10.1111/jgh.15112
34. Zhou YJ, Zheng KI, Wang XB, Yan HD, Sun QF, Pan KH, et al. Younger patients with MAFLD are at increased risk of severe COVID-19 illness: A multicenter preliminary analysis. *J Hepatol* (2020) 73(3):719–21. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.027
35. Pan L, Huang P, Xie X, Xu J, Guo D, Jiang Y. Metabolic associated fatty liver disease increases the severity of COVID-19: A meta-analysis. *Dig Liver Dis* (2021) 53(2):153–7. doi: 10.1016/j.dld.2020.09.007
36. Sharma P, Kumar A. Metabolic dysfunction associated fatty liver disease increases risk of severe Covid-19. *Diabetes Metab Syndr* (2020) 14(5):825–7. doi: 10.1016/j.dsx.2020.06.013
37. Taylor RS, Taylor RJ, Bayliss S, Hagström H, Nasr P, Schattenberg JM, et al. Association Between Fibrosis Stage and Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* (2020) 158(6):1611–25.e12. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.043
38. Bajaj JS, Garcia-Tsao G, Biggins SW, Kamath PS, Wong F, McGeorge S, et al. Comparison of mortality risk in patients with cirrhosis and COVID-19 compared with patients with cirrhosis alone and COVID-19 alone: multicentre matched cohort. *Gut* (2021) 70(3):531–6. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322118
39. Marjot T, Moon AM, Cook JA, Abd-El Salam S, Aloman C, Armstrong MJ, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: an international registry study. *J Hepatol* (2021) 74(3):567–77. doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.024
40. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci* (2016) 61(5):1294–303. doi: 10.1007/s10620-016-4049-x
41. Cai J, Zhang XJ, Li H. Role of Innate Immune Signaling in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Endocrinol Metab* (2018) 29(10):712–22. doi: 10.1016/j.tem.2018.08.003
42. Rezae N, Aghamohammadi A and Notarangelo LD. (eds.). *Primary Immunodeficiency Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer (2017).
43. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* (1999) 340(6):448–54. doi: 10.1056/NEJM199902113400607
44. Jia Q, Li C, Xia Y, Zhang Q, Wu H, Du H, et al. Association between complement C3 and prevalence of fatty liver disease in an adult population: a cross-sectional study from the Tianjin Chronic Low-Grade Systemic Inflammation and Health (TCLSIHealth) cohort study. *PloS One* (2015) 10(4):e0122026. doi: 10.1371/journal.pone.0122026
45. Lee JH, Poudel B, Ki HH, Nepali S, Lee YM, Shin JS, et al. Complement C1q stimulates the progression of hepatocellular tumor through the activation of discoidin domain receptor 1. *Sci Rep* (2018) 8(1):4908. doi: 10.1038/s41598-018-23240-6
46. Rensen SS, Slaats Y, Driessen A, Peutz-Kootstra CJ, Nijhuis J, Steffensen R, et al. Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (2009) 50(6):1809–17. doi: 10.1002/hep.23228
47. Segers FM, Verdam FJ, de Jonge C, Boonen B, Driessen A, Shiri-Sverdlov R, et al. Complement alternative pathway activation in human nonalcoholic steatohepatitis. *PloS One* (2014) 9(10):e110053. doi: 10.1371/journal.pone.0110053
48. Nicola H. The role of contact system in septic shock: the next target? An overview of the current evidence. *J Intensive Care* (2017) 5:31. doi: 10.1186/s40560-017-0228-x
49. Kotronen A, Joutsu-Korhonen L, Sevastianova K, Bergholm R, Hakkarainen A, Pietiläinen KH, et al. Increased coagulation factor VIII, IX, XI and XII activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* (2011) 31(2):176–83. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02375.x
50. Arias-Loste MT, Fábrega E, López-Hoyos M, Crespo J. The Crosstalk between Hypoxia and Innate Immunity in the Development of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Res Int* (2015) 2015:319745. doi: 10.1155/2015/319745
51. Kim S, Park S, Kim B, Kwon J. Toll-like receptor 7 affects the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* (2016) 6:27849. doi: 10.1038/srep27849
52. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* (2006) 124(4):783–801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
53. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher F, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007) 292(3):E740–7. doi: 10.1152/ajpendo.00302.2006
54. Douhara A, Moriya K, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Kitade M, et al. Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Mol Med Rep* (2015) 11(3):1693–700. doi: 10.3892/mmr.2014.2995
55. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* (2012) 142(5):1100–e2. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.034
56. Dasu MR, Jialal I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2011) 300(1):E145–54. doi: 10.1152/ajpendo.00490.2010
57. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* (2012) 21(4):504–16. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.007
58. Taira R, Yamaguchi S, Shimizu K, Nakamura K, Ayabe T, Taira T. Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes. *J Clin Biochem Nutr* (2015) 56(2):149–54. doi: 10.3164/jcbn.14-74
59. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, Smith S, et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese

- humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2013) 11(7):868–75.e1–3. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.015
60. Arias-Loste MT, Iruzubieta P, Puente A, Ramos D, Santa Cruz C, Estébanez Á, et al. Increased Expression Profile and Functionality of TLR6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Hepatocytes of Morbidly Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* (2016) 17(11):1878. doi: 10.3390/ijms17111878
 61. Roh YS, Park S, Kim JW, Lim CW, Seki E, Kim B. Toll-like receptor 7-mediated type I interferon signaling prevents cholestasis- and hepatotoxin-induced liver fibrosis. *Hepatology* (2014) 60(1):237–49. doi: 10.1002/hep.26981
 62. Wan X, Xu C, Yu C, Li Y. Role of NLRP3 Inflammasome in the Progression of NAFLD to NASH. *Can J Gastroenterol Hepatol* (2016) 2016:6489012. doi: 10.1155/2016/6489012
 63. Luo W, Xu Q, Wang Q, Wu H, Hua J. Effect of modulation of PPAR-γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* (2017) 7:44612. doi: 10.1038/srep44612
 64. Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, Verrijken A, Molendi-Coste O, Fleury S, et al. Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat Metab* (2019) 1(6):604–14. doi: 10.1038/s42255-019-0076-1
 65. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology* (2013) 7 Suppl 2:771–81. doi: 10.1007/s12072-013-9468-6
 66. Tian Z, Chen Y, Gao B. Natural killer cells in liver disease. *Hepatology* (2013) 57(4):1654–62. doi: 10.1002/hep.26115
 67. Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *J Hepatol* (2013) 59(3):618–20. doi: 10.1016/j.jhep.2013.02.032
 68. Martin-Murphy BV, You Q, Wang H, De La Houssaye BA, Reilly TP, Friedman JE, et al. Mice lacking natural killer T cells are more susceptible to metabolic alterations following high fat diet feeding. *PLoS One* (2014) 9(1):e80949. doi: 10.1371/journal.pone.0080949
 69. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* (2009) 21(6):673–80. doi: 10.1097/MEG.0b013e32831bc3d6
 70. Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol* (2017) 66(5):1037–46. doi: 10.1016/j.jhep.2017.01.022
 71. Henning JR, Graffeo CS, Rehman A, Fallon NC, Zambirinis CP, Ochi A, et al. Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* (2013) 58(2):589–602. doi: 10.1002/hep.26267
 72. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* (2012) 18(9):1407–12. doi: 10.1038/nm.2885
 73. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology* (2013) 57(2):577–89. doi: 10.1002/hep.26081
 74. Luo XY, Takahara T, Kawai K, Fujino M, Sugiyama T, Tsuneyama K, et al. IFN-γ deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in a steatohepatitis model induced by a methionine- and choline-deficient high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2013) 305(12):G891–9. doi: 10.1152/ajpgi.00193.2013
 75. Hadinia A, Doustimotlagh AH, Goodarzi HR, Arya A, Jafarinia M. Circulating Levels of Pro-inflammatory Cytokines in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Iran J Immunol* (2019) 16(4):327–33. doi: 10.22034/IJI.2019.80284
 76. Kar S, Pagliarunga S, Jaycox SH, Islam R, Paredes AH. Assay validation and clinical performance of chronic inflammatory and chemokine biomarkers of NASH fibrosis. *PLoS One* (2019) 14(7):e0217263. doi: 10.1371/journal.pone.0217263
 77. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* (2001) 286(3):327–34. doi: 10.1001/jama.286.3.327
 78. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* (2001) 34(6):1158–63. doi: 10.1053/jhep.2001.29628
 79. du Plessis J, Korf H, van Pelt J, Windmolders P, Vander Elst I, Verrijken A, et al. Pro-Inflammatory Cytokines but Not Endotoxin-Related Parameters Associate with Disease Severity in Patients with NAFLD. *PLoS One* (2016) 11(12):e0166048. doi: 10.1371/journal.pone.0166048
 80. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* (1996) 45(7):881–5. doi: 10.2337/diabetes.45.7.881
 81. Yu J, Ip E, Dela Peña A, Hou JY, Sessa J, Pera N, et al. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* (2006) 43(4):826–36. doi: 10.1002/hep.21108
 82. Brenner DA, Seki E, Taura K, Kisseleva T, Deminics S, Iwaisako K, et al. Non-alcoholic steatohepatitis-induced fibrosis: Toll-like receptors, reactive oxygen species and Jun N-terminal kinase. *Hepatol Res* (2011) 41(7):683–6. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00814.x
 83. Dev A, Iyer S, Razani B, Cheng G. NF-κB and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* (2011) 349:115–43. doi: 10.1007/82_2010_102
 84. Czaja MJ. JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* (2010) 21(12):707–13. doi: 10.1016/j.tem.2010.08.010
 85. Gehrke N, Schattnerberg JM. Metabolic Inflammation-A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Gastroenterology* (2020) 158(7):1929–47.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.020
 86. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* (2016) 65(2):425–43. doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.005
 87. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant* (2020) 39(5):405–7. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012
 88. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol* (2020) 11:1446. doi: 10.3389/fimmu.2020.01446
 89. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* (2020) 92(4):424–32. doi: 10.1002/jmv.25685
 90. Campbell CM, Kahwash R. Will Complement Inhibition Be the New Target in Treating COVID-19-Related Systemic Thrombosis? *Circulation* (2020) 141(22):1739–41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047419
 91. Carvelli J, Demaria O, Vély F, Batista L, Chouaki Benmansour N, Fares J, et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis. *Nature* (2020) 588:146–50. doi: 10.1038/s41586-020-2600-6
 92. Gralinski LE, Sheahan TP, Morrison TE, Menachery VD, Jensen K, Leist SR, et al. Complement Activation Contributes to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pathogenesis. *mBio* (2018) 9(5):e01753–18. doi: 10.1128/mBio.01753-18
 93. Lefere S, Tacke F. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Crosstalk with metabolism. *JHEP Rep* (2019) 1(1):30–43. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.02.004
 94. Rodríguez-Puertas R. ACE2 activators for the treatment of COVID 19 patients. *J Med Virol* (2020) 92(10):1701–2. doi: 10.1002/jmv.25992
 95. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* (2003) 426(6965):450–4. doi: 10.1038/nature02145
 96. Maglakelidze N, Manto KM, Craig TJ. A Review: Does Complement or the Contact System Have a Role in Protection or Pathogenesis of COVID-19? *Pulm Ther* (2020) 6(2):169–76. doi: 10.1007/s41030-020-00118-5
 97. Milewska A, Falkowski K, Kalinska M, Bielecka E, Naskalska A, Mak P, et al. Kallikrein 13: a new player in coronaviral infections. *bioRxiv* (2020). 2020.03.01.971499. doi: 10.1101/2020.03.01.971499
 98. Mönkemüller K, Fry L, Rickes S. COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel. *Rev Esp Enferm Dig* (2020) 112(5):383–8. doi: 10.17235/reed.2020.7137/2020
 99. Assante G, Williams R, Youngson NA. Is the increased risk for MAFLD patients to develop severe COVID-19 linked to perturbation of the gut-liver axis? *J Hepatol* (2021) 74:469–90. doi: 10.1016/j.jhep.2020.05.051

100. Cardinale V, Capurso G, Ianaro G, Gasbarrini A, Arcidiacono PG, Alvaro D. Intestinal permeability changes with bacterial translocation as key events modulating systemic host immune response to SARS-CoV-2: A working hypothesis. *Dig Liver Dis* (2020) 52(12):1383–9. doi: 10.1016/j.dld.2020.09.009
101. Belančić A. Gut microbiome dysbiosis and endotoxemia - Additional pathophysiological explanation for increased COVID-19 severity in obesity. *Obes Med* (2020) 20:100302. doi: 10.1016/j.obmed.2020.100302
102. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology* (2020) 159(3):944–55.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.048
103. Gu S, Chen Y, Wu Z, Gao H, Lv L, Guo F, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis* (2020). doi: 10.1093/cid/ciaa709
104. Zuo T, Liu Q, Zhang F, Lui GC, Tso EY, Yeoh YK, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut* (2020) 70:276–84. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322294
105. Zuo T, Zhan H, Zhang F, Liu Q, Tso EYK, Lui GCY, et al. Alterations in Fecal Fungal Microbiome of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization until Discharge. *Gastroenterology* (2020) 159(4):1302–10.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.048
106. Hoel H, Heggelund L, Reikvam DH, Stiksrud B, Ueland T, Michelsen AE, et al. Elevated markers of gut leakage and inflammasome activation in COVID-19 patients with cardiac involvement. *J Intern Med* (2020) 5. doi: 10.1111/joim.13178
107. Moreno-Eutimio MA, López-Macías C, Pastelin-Palacios R. Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes. *Microbes Infect* (2020) 22(4-5):226–9. doi: 10.1016/j.micinf.2020.04.009
108. van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, et al. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA* (2020) 324(7):663–73. doi: 10.1001/jama.2020.13719
109. Englmeier L. A theory on SARS-COV-2 susceptibility: reduced TLR7-activity as a mechanistic link between men, obese and elderly. *J Biol Regul Homeost Agents* (2020) 34(3):1125–9. doi: 10.23812/20-221-L-49
110. Wang Y, Liang H, Jin F, Yan X, Xu G, Hu H, et al. Injured liver-released miRNA-122 elicits acute pulmonary inflammation via activating alveolar macrophage TLR7 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116(13):6162–71. doi: 10.1073/pnas.1814139116
111. Totura AL, Whitmore A, Agnihothram S, Schäfer A, Katze MG, Heise MT, et al. Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *mBio* (2015) 6(3):e00638–15. doi: 10.1128/mBio.00638-15
112. Sohn KM, Lee SG, Kim HJ, Cheon S, Jeong H, Lee J, et al. COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. *J Korean Med Sci* (2020) 35(38):e343. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e343
113. Carpino G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D, et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. *Hepatology* (2020) 72(2):470–85. doi: 10.1002/hep.31056
114. Shi CS, Nabar NR, Huang NN, Kehrl JH. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov* (2019) 5:101. doi: 10.1038/s41420-019-0181-7
115. Nieto-Torres JL, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* (2015) 485:330–9. doi: 10.1016/j.virol.2015.08.010
116. Siu KL, Yuen KS, Castaño-Rodríguez C, Ye ZW, Yeung ML, Fung SY, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. *FASEB J* (2019) 33(8):8865–77. doi: 10.1096/fj.201802418R
117. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* (2021) 218(3):e20201707. doi: 10.1084/jem.20201707
118. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol Res* (2020) 69(3):379–88. doi: 10.33549/physiolres.934492
119. McGonagle D, O'Donnell JS, Sharif K, Emery P, Bridgewood C. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *Lancet Rheumatol* (2020) 2(7):e437–e45. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30121-1
120. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(6):355–62. doi: 10.1038/s41577-020-0331-4
121. Yao X, Ye F, Zhang M, Cui C, Huang B, Niu P, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis* (2020) 71(15):732–9. doi: 10.1093/cid/ciaa237
122. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, et al. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe* (2020) 27(6):883–90.e2. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.017
123. Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* (2019) 56(3):308–21. doi: 10.1007/s12016-017-8648-x
124. Della Torre S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease as a Canonical Example of Metabolic Inflammatory-Based Liver Disease Showing a Sex-Specific Prevalence: Relevance of Estrogen Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2020) 11:572490. doi: 10.3389/fendo.2020.572490
125. Price CC, Altice FL, Shyr Y, Koff A, Pischel L, Goshua G, et al. Tocilizumab Treatment for Cytokine Release Syndrome in Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019: Survival and Clinical Outcomes. *Chest* (2020) 158(4):1397–408. doi: 10.1016/j.chest.2020.06.006
126. Morrison AR, Johnson JM, Griebel KM, Jones MC, Stine JJ, Hencken LN, et al. Clinical characteristics and predictors of survival in adults with coronavirus disease 2019 receiving tocilizumab. *J Autoimmun* (2020) 114:102512. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102512
127. Perrone F, Piccirillo MC, Ascierto PA, Salvarani C, Parrella R, Marata AM, et al. Tocilizumab for patients with COVID-19 pneumonia. The single-arm TOCIVID-19 prospective trial. *J Transl Med* (2020) 18(1):405. doi: 10.1186/s12967-020-02573-9
128. Ramiro S, Mostard RLM, Magro-Checa C, van Dongen CMP, Dormans T, Buijs J, et al. Historically controlled comparison of glucocorticoids with or without tocilizumab versus supportive care only in patients with COVID-19-associated cytokine storm syndrome: results of the CHIC study. *Ann Rheum Dis* (2020) 79(9):1143–51. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-219534
129. Novartis. Novartis provides update on CAN-COVID trial in hospitalized patients with COVID-19 pneumonia and cytokine release syndrome (CRS) Basel: Novartis. (2020). Available at: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-can-covid-trial-hospitalized-patients-covid-19-pneumonia-and-cytokine-release-syndrome-crs>, [Press release].
130. Pei L, Zhang S, Huang L, Geng X, Ma L, Jiang W, et al. Antiviral agents, glucocorticoids, antibiotics, and intravenous immunoglobulin in 1142 patients with coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Pol Arch Intern Med* (2020) 130(9):726–33. doi: 10.20452/pamw.15543
131. Tomazini BM, Maia IS, Cavalcanti AB, Berwanger O, Rosa RG, Veiga VC, et al. Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. *JAMA* (2020) 324(13):1307–16. doi: 10.1001/jama.2020.17021
132. Sterne JAC, Murthy S, Diaz JV, Slutsky AS, Villar J, Angus DC, et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA* (2020) 324(13):1330–41. doi: 10.1001/jama.2020.17023
133. Yu C, Kang L, Chen J, Zang N. Evaluation of safety, efficacy, tolerability, and treatment-related outcomes of type I interferons for human coronaviruses (HCoVs) infection in clinical practice: An updated critical systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol* (2020) 86:106740. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106740

134. Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Ranger-Moore J, Jackson JP, Ferguson SS, et al. Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos* (2009) 37(10):2087–94. doi: 10.1124/dmd.109.027466
135. Naik A, Belić A, Zanger UM, Rozman D. Molecular Interactions between NAFLD and Xenobiotic Metabolism. *Front Genet* (2013) 4:2. doi: 10.3389/fgene.2013.00002
136. Papac-Milicevic N, Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. *Adv Immunol* (2016) 131:1–59. doi: 10.1016/bs.ai.2016.02.001
137. Sbierski-Kind J, Kath J, Brachs S, Streitz M, von Herrath MG, Kühl AA, et al. Distinct Housing Conditions Reveal a Major Impact of Adaptive Immunity on the Course of Obesity-Induced Type 2 Diabetes. *Front Immunol* (2018) 9:1069. doi: 10.3389/fimmu.2018.01069
138. Miyake T, Akbar SM, Yoshida O, Chen S, Hiasa Y, Matsuura B, et al. Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* (2010) 45(8):859–67. doi: 10.1007/s00535-010-0218-4
139. Basho K, Zoldan K, Schultheiss M, Bettinger D, Globig AM, Bengsch B, et al. IL-2 contributes to cirrhosis-associated immune dysfunction by impairing follicular T helper cells in advanced cirrhosis. *J Hepatol* (2021) 74(3):649–60. doi: 10.1016/j.jhep.2020.10.012
140. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* (2005) 54(7):987–93. doi: 10.1136/gut.2004.057968
141. Nobili V, Parola M, Alisi A, Marra F, Piemonte F, Mombello C, et al. Oxidative stress parameters in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* (2010) 26(4):471–6. doi: 10.3892/ijmm.00000487
142. Bruzzi S, Sutti S, Giudici G, Burlone ME, Ramavath NN, Toscani A, et al. B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free Radic Biol Med* (2018) 124:249–59. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.015
143. Sutti S, Jindal A, Locatelli I, Vacchiano M, Gigliotti L, Bozzola C, et al. Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology* (2014) 59(3):886–97. doi: 10.1002/hep.26749
144. Hendriks T, Watzemböck ML, Walenbergh SM, Amir S, Gruber S, Kozma MO, et al. Low levels of IgM antibodies recognizing oxidation-specific epitopes are associated with human non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med* (2016) 14(1):107. doi: 10.1186/s12916-016-0652-0
145. Karrar A, Stepanova M, Alaparhi L, Lingam S, Younoszai Z, Zheng L, et al. Anti-adipocyte antibody response in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* (2015) 30(5):900–8. doi: 10.1111/jgh.12856
146. Loria P, Lonardo A, Leonardi F, Fontana C, Carulli L, Verrone AM, et al. Non-organ-specific autoantibodies in nonalcoholic fatty liver disease: prevalence and correlates. *Dig Dis Sci* (2003) 48(11):2173–81. doi: 10.1023/B:DDAS.0000004522.36120.08
147. Adams LA, Lindor KD, Angulo P. The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* (2004) 99(7):1316–20. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.30444.x
148. Vuppalanchi R, Gould RJ, Wilson LA, Unalp-Arida A, Cummings OW, Chalasani N, et al. Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatol Int* (2012) 6(1):379–85. doi: 10.1007/s12072-011-9277-8
149. Cotler SJ, Kanji K, Keshavarzian A, Jensen DM, Jakate S. Prevalence and significance of autoantibodies in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* (2004) 38(9):801–4. doi: 10.1097/01.mcg.0000139072.38580.a0
150. Niwa H, Sasaki M, Haratake J, Kasai T, Katayanagi K, Kurumaya H, et al. Clinicopathological significance of antinuclear antibodies in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* (2007) 37(11):923–31. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00150.x
151. Diedrich T, Kummer S, Galante A, Drolz A, Schlicker V, Lohse AW, et al. Characterization of the immune cell landscape of patients with NAFLD. *PLoS One* (2020) 15(3):e0230307. doi: 10.1371/journal.pone.0230307
152. Sutti S, Albano E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2020) 17(2):81–92. doi: 10.1038/s41575-019-0210-2
153. Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, et al. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci Rep* (2015) 5:17192. doi: 10.1038/srep17192
154. Inzaugarat ME, De Matteo E, Baz P, Lucero D, García CC, Gonzalez Ballerga E, et al. New evidence for the therapeutic potential of curcumin to treat nonalcoholic fatty liver disease in humans. *PLoS One* (2017) 12(3):e0172900. doi: 10.1371/journal.pone.0172900
155. Alchera E, Rolla S, Imarisio C, Bardina V, Valente G, Novelli F, et al. Adenosine A2a receptor stimulation blocks development of nonalcoholic steatohepatitis in mice by multilevel inhibition of signals that cause immunolipotoxicity. *Transl Res* (2017) 182:75–87. doi: 10.1016/j.trsl.2016.11.009
156. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* (2014) 26(4):549–64. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.003
157. Nishida T, Tsuneyama K, Fujimoto M, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, et al. Spontaneous onset of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in a mouse model of metabolic syndrome. *Lab Invest* (2013) 93(2):230–41. doi: 10.1038/labinvest.2012.155
158. Miyake T, Abe M, Tokumoto Y, Hirooka M, Furukawa S, Kumagi T, et al. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* (2013) 7(2):539–47. doi: 10.1007/s12072-012-9345-8
159. Wu Z, Xu J, Tan J, Song Y, Liu L, Zhang F, et al. Mesenteric adipose tissue B lymphocytes promote local and hepatic inflammation in non-alcoholic fatty liver disease mice. *J Cell Mol Med* (2019) 23(5):3375–85. doi: 10.1111/jcmm.14232
160. Inzaugarat ME, Ferreyra Solari NE, Billordo LA, Abecasis R, Gadano AC, Cheriavsky AC. Altered phenotype and functionality of circulating immune cells characterize adult patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Immunol* (2011) 31(6):1120–30. doi: 10.1007/s10875-011-9571-1
161. Ferreyra Solari NE, Inzaugarat ME, Baz P, De Matteo E, Lezama C, Galoppo M, et al. The role of innate cells is coupled to a Th1-polarized immune response in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Immunol* (2012) 32(3):611–21. doi: 10.1007/s10875-011-9635-2
162. Rau M, Schilling AK, Meertens J, Hering I, Weiss J, Jurowich C, et al. Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *J Immunol* (2016) 196(1):97–105. doi: 10.4049/jimmunol.1501175
163. Bertola A, Bonnafoos S, Anty R, Patoureaux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* (2010) 5(10):e13577. doi: 10.1371/journal.pone.0013577
164. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (2005) 42(4):880–5. doi: 10.1002/hep.20826
165. Söderberg C, Marmur J, Eckes K, Glaumann H, Sällberg M, Frelin L, et al. Microvesicular fat, inter cellular adhesion molecule-1 and regulatory T-lymphocytes are of importance for the inflammatory process in livers with non-alcoholic steatohepatitis. *APMIS* (2011) 119(7):412–20. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02746.x
166. Lalazar G, Mizrahi M, Turgeman I, Adar T, Ben Ya'acov A, Shabat Y, et al. Oral Administration of OKT3 MAb to Patients with NASH, Promotes Regulatory T-cell Induction, and Alleviates Insulin Resistance: Results of a Phase IIa Blinded Placebo-Controlled Trial. *J Clin Immunol* (2015) 35(4):399–407. doi: 10.1007/s10875-015-0160-6
167. Świdarska M, Jaroszewicz J, Stawicka A, Parfieniuk-Kowerda A, Chabowski A, Flisiak R. The interplay between Th17 and T-regulatory responses as well as adipokines in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol* (2017) 3(3):127–34. doi: 10.5114/ceh.2017.68466
168. Su L, Wu Z, Chi Y, Song Y, Xu J, Tan J, et al. Mesenteric lymph node CD4. *Cell Immunol* (2019) 337:33–41. doi: 10.1016/j.cellimm.2019.01.005
169. He B, Wu L, Xie W, Shao Y, Jiang J, Zhao Z, et al. The imbalance of Th17/Treg cells is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *BMC Immunol* (2017) 18(1):33. doi: 10.1186/s12865-017-0215-y

170. Hu Y, Zhang H, Li J, Cong X, Chen Y, He G, et al. Gut-derived lymphocyte recruitment to liver and induce liver injury in non-alcoholic fatty liver disease mouse model. *J Gastroenterol Hepatol* (2016) 31(3):676–84. doi: 10.1111/jgh.13183
171. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, Medina-Echeverez J, Kleiner DE, Jin P, et al. NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* (2016) 531(7593):253–7. doi: 10.1038/nature16969
172. Brown ZJ, Fu Q, Ma C, Kruhlak M, Zhang H, Luo J, et al. Carnitine palmitoyltransferase gene upregulation by linoleic acid induces CD4. *Cell Death Dis* (2018) 9(6):620. doi: 10.1038/s41419-018-0687-6
173. Coia H, Ma N, Hou Y, Permaul E, Berry DL, Cruz MI, et al. Theaphenon E prevents fatty liver disease and increases CD4+ T cell survival in mice fed a high-fat diet. *Clin Nutr* (2021) 40(1):110–9. doi: 10.1016/j.clnu.2020.04.033
174. Stiglund N, Strand K, Cornillet M, Stål P, Thorell A, Zimmer CL, et al. Retained NK Cell Phenotype and Functionality in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol* (2019) 10:1255. doi: 10.3389/fimmu.2019.01255
175. Adler M, Taylor S, Okebugwu K, Yee H, Fielding C, Fielding G, et al. Intrahepatic natural killer T cell populations are increased in human hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* (2011) 17(13):1725–31. doi: 10.3748/wjg.v17.i13.1725
176. Vonghia L, Magrone T, Verrijken A, Michielsen P, Van Gaal L, Jirillo E, et al. Peripheral and Hepatic Vein Cytokine Levels in Correlation with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-Related Metabolic, Histological, and Haemodynamic Features. *PLoS One* (2015) 10(11):e0143380. doi: 10.1371/journal.pone.0143380
177. Tan L, Kang X, Ji X, Li G, Wang Q, Li Y, et al. Validation of Predictors of Disease Severity and Outcomes in COVID-19 Patients: A Descriptive and Retrospective Study. *Med (N Y)* (2020) 1(1):128–38.e3. doi: 10.1016/j.medj.2020.05.002
178. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* (2020) 17(5):533–5. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2
179. Li J, Guo M, Tian X, Wang X, Yang X, Wu P, et al. Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS-CoV-2 Pathogenesis. *Med (N Y)* (2021) 2(1):99–112.e7. doi: 10.1016/j.medj.2020.07.002
180. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* (2020) 11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827
181. 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* (2020) 369(6508):eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511
182. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med* (2020) 26(7):1070–6. doi: 10.1038/s41591-020-0944-y
183. Targher G, Mantovani A, Byrne CD, Wang XB, Yan HD, Sun QF, et al. Detrimental effects of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and increased neutrophil-to-lymphocyte ratio on severity of COVID-19. *Diabetes Metab* (2020) 46(6):505–7. doi: 10.1016/j.diabet.2020.06.001
184. Prins GH, Olinga P. Potential implications of COVID-19 in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* (2020) 40(10):2568. doi: 10.1111/liv.14484
185. Su Y, Chen D, Yuan D, Lausted C, Choi J, Dai CL, et al. Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell* (2020) 183(6):1479–95.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.037
186. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* (2017) 13(9):509–20. doi: 10.1038/nrendo.2017.56

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Lamadrid, Alonso-Peña, San Segundo, Arias-Loste, Crespo and Lopez-Hoyos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

Immune Assessment of BNT162b2 m-RNA-Spike Based Vaccine Response in Adults

David San Segundo ^{1,2} , Alejandra Comins-Boo ^{1,2} , Juan Irure-Ventura ^{1,2} , Mónica Renuncio-García ^{1,2}, Adriell Roa-Bautista ^{1,2}, Elena González-López ^{1,2}, David Merino-Fernández ², Patricia Lamadrid-Perojo ², Marta Alonso-Peña ² , Javier Gonzalo Ocejo-Vinyals ¹ , Maria Gutiérrez-Larrañaga ^{1,2}, Sandra Guiral-Foz ^{1,2} and Marcos López-Hoyos ^{1,2,*} 

- ¹ Immunology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; david.sansegundo@scsalud.es (D.S.S.); alejandra.comins@scsalud.es (A.C.-B.); juan.irure@scsalud.es (J.I.-V.); monica.renuncio@scsalud.es (M.R.-G.); adrielantonio.roa@scsalud.es (A.R.-B.); elena.gonzalez@scsalud.es (E.G.-L.); javiergonzalo.ocejo@scsalud.es (J.G.O.-V.); maria.gutierrezl@scsalud.es (M.G.-L.); sandraguiral5@gmail.com (S.G.-F.)
- ² Autoimmunity and Transplantation Research Group, Research Institute “Marqués de Valdecilla” (IDIVAL), 39011 Santander, Spain; david.merino@hotmail.com (D.M.-F.); plamadrid@idival.org (P.L.-P.); malonso@idival.org (M.A.-P.)
- * Correspondence: marcos.lopez@scsalud.es



Citation: San Segundo, D.; Comins-Boo, A.; Irure-Ventura, J.; Renuncio-García, M.; Roa-Bautista, A.; González-López, E.; Merino-Fernández, D.; Lamadrid-Perojo, P.; Alonso-Peña, M.; Ocejo-Vinyals, J.G.; et al. Immune Assessment of BNT162b2 m-RNA-Spike Based Vaccine Response in Adults. *Biomedicines* **2021**, *9*, 868. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080868>

Academic Editor: Marjorie Pion

Received: 2 June 2021

Accepted: 21 July 2021

Published: 22 July 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Vaccine efficacy is based on clinical data. Currently, the assessment of immune response after SARS-CoV-2 vaccination is scarce. A total of 52 healthcare workers were immunized with the same lot of BNT162b2 vaccine. The immunological response against the vaccine was tested using a T-specific assay based on the expression of CD25 and CD134 after stimulation with anti-N, -S, and -M specific peptides of SARS-CoV-2. Moreover, IgG anti-S2 and -RBD antibodies were detected using ELISA. Furthermore, the cell subsets involved in the response to the vaccine were measured in peripheral blood by flow cytometry. Humoral-specific responses against the vaccine were detected in 94% and 100% after the first and second doses, respectively. Therefore, anti-S T-specific responses were observed in 57% and 90% of the subjects after the first and second doses of the vaccine, respectively. Thirty days after the second dose, significant increases in T helper 1 memory cells ($p < 0.001$), peripheral memory T follicular helper (pT_{FH}) cells ($p < 0.032$), and switched memory ($p = 0.005$) were observed. This study describes the specific humoral and cellular immune responses after vaccination with the new mRNA-based BNT162b2 vaccine. A mobilization of T_{FH} into the circulation occurs, reflecting a specific activation of the immune system.

Keywords: SARS-CoV-2; vaccines; T-specific response; B-specific response; T follicular helper cells

1. Introduction

Vaccination against SARS-CoV-2 seems to be a unique and effective way to control the pandemic outbreak. Several clinical trials have been performed to assess safety and efficacy before general use in the population [1–4]. Most of the vaccine trials focused on the clinical effect (i.e., protection against COVID-19). The production of specific SARS-CoV-2 antibodies, and specific CD4 and CD8 T cells has also been analyzed in subgroups of patients included in the clinical trials and, more recently after the conditional approval of vaccines, in specific groups of patients and populations [5]. However, such an immune response is not usually evaluated between the first and second doses of the vaccine and is not used for immune assessment of the response before clinical effect.

The average clinical efficacy range is more than 90% after two doses. However, there are differences in vaccine designs: the mRNA-1273 SARS-CoV-2 and BNT162b2 vaccines are designed based on SARS-CoV-2 Spike-mRNA, whereas Gam-COVID-Vac is a combined vector vaccine, based on rAd type 26 (rAd26) and rAd type 5 (rAd5), and ChAdOx1

nCoV-19 is a chimpanzee adenovirus-vectored vaccine [6]. At the moment of this study, no inactivated or attenuated vaccine has been approved in Europe for wide use.

The SARS-CoV-2 virus has several core units, such as nucleocapsids and the membrane, and uses the S protein to enter human cells by binding to the ACE2 receptor [7]. The described vaccines are based on an S-protein and would induce a specific response against it, while those whole-virus designed vaccines induce a wide immune response against different parts of the SARS-CoV-2 virus.

The specific-vaccine response involves germinal center activation in secondary lymphoid organs. Different cells interact in an activation as demonstrated in natural COVID-19 infection; first, T follicular helper cells (T_{FH}) are activated by antigen-presenting cells with their specific antigen. Subsequently, after antigen recognition, naïve mature B cells develop to unswitched B cells before their B cell receptor's affinity maturation to achieve the switched memory B cell (SwM) stage. Finally, follicular B cells mature to long-lived memory B cells or antibody producing-plasma cells [8]. Very recently, the induction of long-lived bone marrow plasma cells has been demonstrated up to 11 months after natural infection [9].

In order to assess the vaccine response in the community, specific antibody production against pathogens is measured. However, other immune response components could be evaluated. All of the currently approved vaccines for SARS-CoV-2 allow for assessing specific-S protein response in the vaccinated population, measuring both S-specific T cell responses and S-specific IgG antibody production [10,11].

However, to better characterize the immune response elicited by the vaccine, both cellular and humoral components should be tested. Here, we describe the differences observed in T and B lymphocytes after completing each dose of the BNT162b2 vaccine, and we focus on the induction of peripheral T follicular helper (pT_{FH}) cells and the production of specific antibodies.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

A total of 52 healthcare workers (median age 42.5 years and interquartile range 30.5–54.2) were recruited for the study after giving written consent, of which 41 were females (78.8%). The study was addressed following the Helsinki declaration and assessed by the Regional Ethics Committee (CEIm, internal code 2020.167). All subjects had not evidenced prior COVID-19 infection with a negative PCR-specific test of SARS-CoV-2 prior immunization and were vaccinated with the same lot (EK9788) of BNT162b2 vaccine (Pfizer-BioNTech). The first dose was inoculated within 4–8 January 2021, and the second dose was inoculated within 27–30 January 2021. The samples were collected after 20 days of the first dose and after 30 days of the second dose.

2.2. Flow Cytometry for B and T Cell Subsets

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) gradient centrifugation. In brief, PBMCs were freshly stained and processed following standard procedures [12,13]. The following monoclonal antibodies were used to identify the pT_{FH} and the different T lymphocyte subsets: CD45-Krome orange (KrO) clone J33, CD3-pacific blue (PB) clone UCHT1, CD4-phycoerythrin-cyanine 5.5 (PC5.5) clone 13B8.2, CD45RO-ECD clone UCHL1, (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CXCR3-FITC clone G025H7, CCR6 (CD196) phycoerythrin-cyanine 7 (PE Cy7) clone G034E3, and CXCR5-PE clone J252D4 (BioLegend, San Diego, CA, USA).

The different B lymphocyte subsets were identified using the following monoclonal antibodies: CD19-PC7 clone J3-119, anti-IgD-FITC clone IA6-2, and CD27-PC5.5 clone 1A4 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

The gating strategy used for the different B and T cell subpopulations is depicted in Figure 1. Lymphocytes were gated based on CD45 pan-leukocyte marker. Afterwards, B and T lymphocytes were classified as $CD19^+$ and $CD3^+$, respectively. Within the T

population, T helper (Th) cells express CD4. This subpopulation was further divided in Th memory (ThMEM) that express CD45RO surface marker and T follicular helper (T_{FH}) cells with the expression of CXCR5. Within the ThMEM subset, the Th1MEM subpopulation, characterized by the expression of CXCR3 marker, was evaluated. Moreover, from the ThMEM subset, the memory pT_{FH} cells were identified based on CXCR5 expression and based on CXCR3 and CCR6, and memory pT_{FH1}, pT_{FH2}, and pT_{FH17} were classified [14]. Table 1 shows the phenotypic markers used to characterize each T and B cell subset shown in Figure 1.

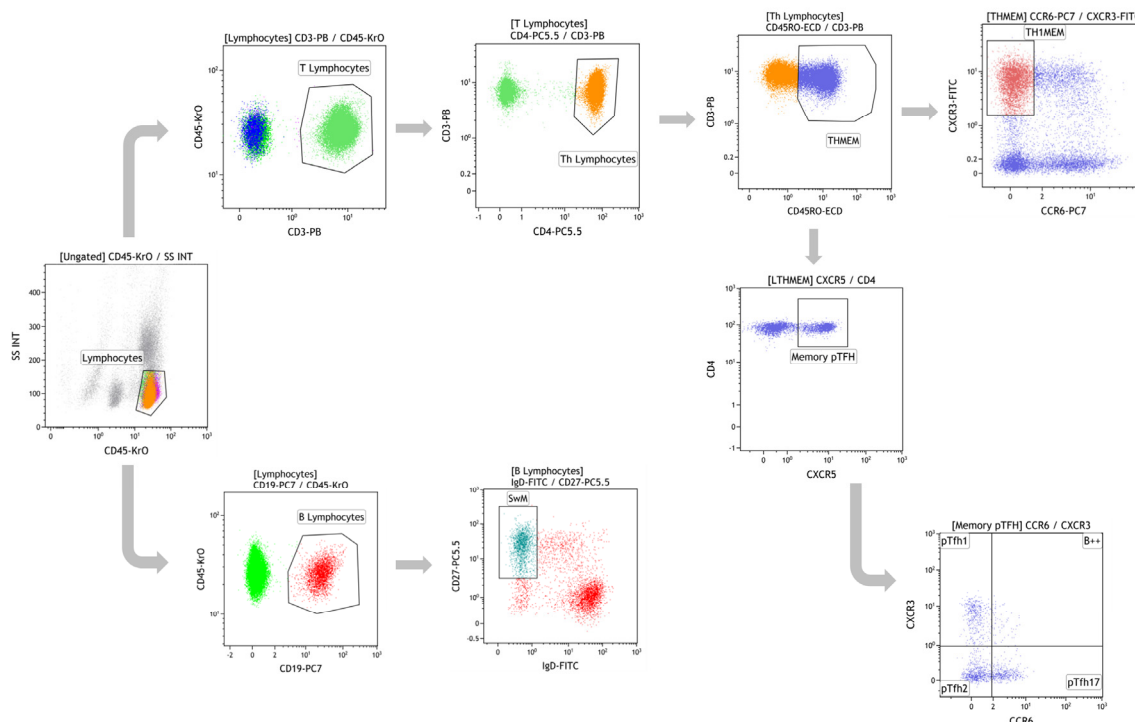


Figure 1. Gating strategy of T and B cell analysis explained in the text.

Table 1. Phenotypic characterization of the T and B cell subsets.

Cell Subsets	Phenotypic CD Markers
T cell subsets	
T helper 1 (Th1)	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 [−]
Th memory (ThMEM)	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺
Th1 memory (Th1MEM)	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 [−]
Memory T follicular helper (T _{FH})	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR5 ⁺
Memory T follicular helper 1 (T _{FH1})	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 [−]
Memory T follicular helper 1 (T _{FH2})	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 [−] CCR6 [−]
Memory T follicular helper 1 (T _{FH17})	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR5 ⁺ CXCR3 [−] CCR6 ⁺
B cell subsets	
Switched memory B (SwM)	CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD [−]

2.3. SARS-CoV-2 T-Specific Response Assessment by Flow Cytometry

The procedure was validated by the Spanish Society of Immunology and based on activation-induced marker (AIM) expression after exposure with specific SARS-CoV-2 antigens [15]. Briefly, PBMCs from heparinized blood were isolated by Ficoll gradient and cultured at 10⁶/mL in TexMACS medium (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) during 24 h at 37 °C in a flat-bottom 96-well plate in 0.1% DMSO, PepTivator SARS-CoV-2 Prot S, Prot M and Prot N (1 ug/mL) and Dynabeads Human T activator CD3/CD28

(Gibco Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania) as a positive control. After incubation, the PBMCs were washed and stained with the following monoclonal antibodies: anti-CD3 (FITC) clone UCHT 1 (Immunotech SAS Beckman Coulter, Marseille, France), anti-CD4 (APC-Vio 770) clone VIT4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany), anti-CD8 (ECD) clone SFCI21Thy2D3 (Beckman Coulter, 737659, Brea, CA, USA), anti-CD134 (PE) clone 134-1 (Cytognos, Salamanca, Spain), and anti-CD25 (PE-Cy7) clone 2A3. The stained PBMCs samples were washed with 150 μ L pf PBS and centrifuged 5 min at 1800 rpm. Finally, 2 μ L of 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) staining solution (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA) and 90 μ L of PBS were added before the samples were acquired on the CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter). The results were expressed as the frequency in the AIM ($CD25^+CD134^+$) ratio obtained after specific activation to negative non-stimulated control. A ratio >3 in one of the specific SARS-CoV-2 peptides was considered positive.

The gating strategy used for AIM assay is shown in Figure 2. First, lymphocytes were gated based on forward and side scatter. Then, T lymphocytes were obtained using CD3 and divided in T helper (Th) and T cytotoxic (Tc) cells by the expression of CD4 and CD8, respectively. Finally, within the CD4 subpopulation, the three conditions were displayed: non-stimulated negative control, CD3/CD28 positive control, and S-antigen stimulated.

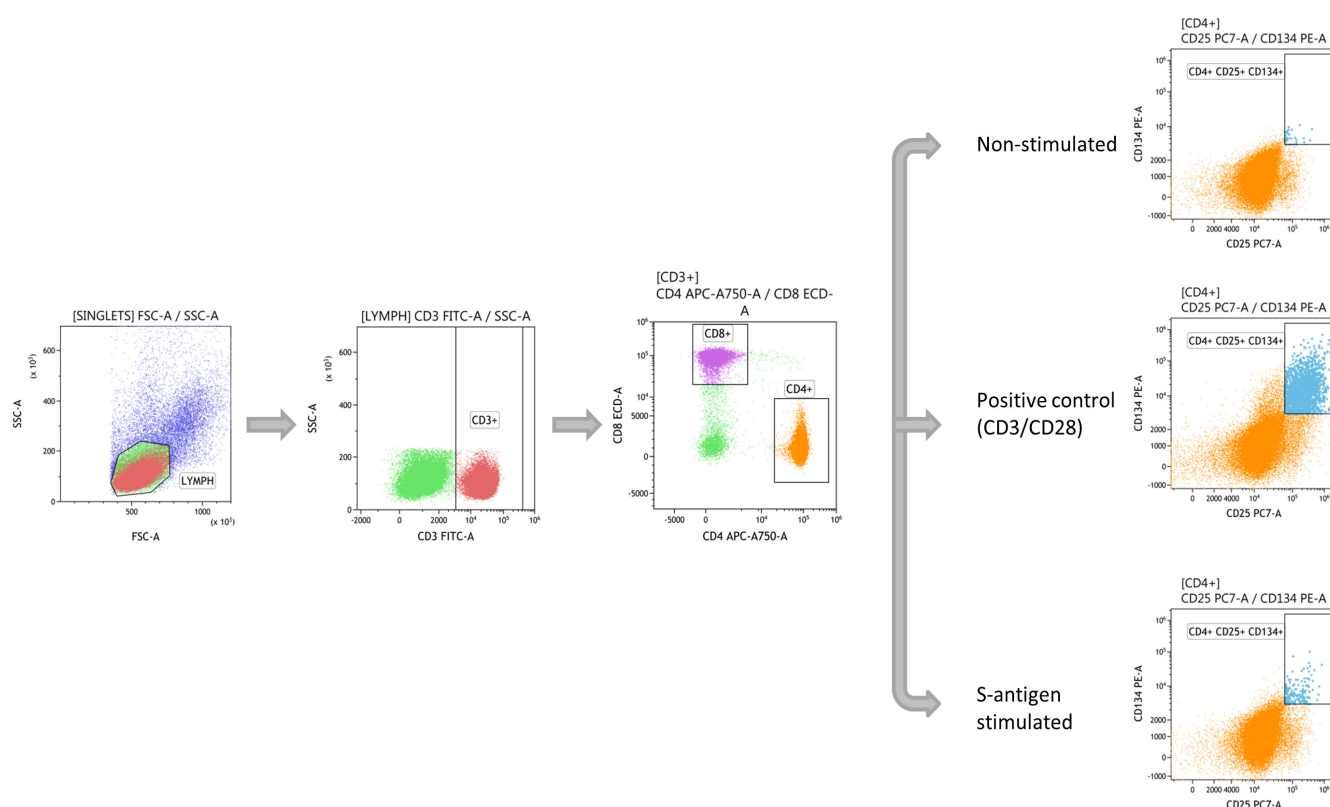


Figure 2. Gating strategy of the T-specific response against S-antigen of SARS-CoV-2 as explained in the text.

2.4. SARS-CoV-2 Anti-S Antibodies Detection

The detection of IgG, IgA, and IgM antibodies against SARS-CoV-2 by ELISA was performed following the IrsiCaixa published protocol [16]. Briefly, serum samples were previously diluted 1:100 in phosphate buffer saline (PBS). Nunc MaxiSorp96-well plates (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) were coated with optimized concentrations of 2 μ g/mL of capture antibody (MA1-21315, ThermoFisher Scientific) diluted with PBS overnight at 4 $^{\circ}$ C. Coated plates were washed and blocked with PBS 1 $\times$ + 1% bovine serum albumin (BSA) for two hours at room temperature. After washing the plates, antigen

solution [S2 + RBD (Sino Biologicals, Wayne, PA, USA) diluted in blocking buffer] was added to one half of the plate and blocking buffer to the other half and incubated overnight at 4 °C. Serum samples were added and incubated for one hour at room temperature. Then, incubation with peroxidase-conjugated anti-IgG, -IgA, and -IgM detection antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) was carried out for 30 min at room temperature. Bound antigen-specific antibodies were detected by adding the substrate solution. Absorbance was read at 492 nm. The specific signal associated with each sample was calculated by background subtraction as follows: OD specific signal = OD (+Ag) – OD (–Ag).

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software 6.0 version. The distribution of continuous variables was assessed using Kolmogorov–Smirnov/Shapiro–Wilk tests. The results were expressed as median (interquartile range (IQR)). Comparisons were based on the Kruskal–Wallis and U-Mann–Whitney tests, correspondingly. A two-sided p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. T-Cell Immune Response after Vaccination

The evaluation of the vaccine-response has been mainly based on the specific antibody production. However, specific T cells should be previously activated to induce B cell maturation in germinal centers. The frequency of total Th lymphocytes was comparable after the first and second doses. Nevertheless, the frequency of memory Th subset ($CD3^+CD4^+CD45RO^+$) was significantly increased after the second dose, $p = 0.008$ (Figure 3A). Most of the memory Th cells were Th1 ($CXCR3^+CCR6^-$), and their proportion was also increased after the second dose, $p < 0.0001$ (Figure 3B). Within the Th cell compartment, those involved in class-switch and B cell affinity maturation in germinal centers are defined as peripheral T follicular helper cells (pT_{FH}). These cells can be identified in peripheral blood as $CD4^+CD45RO^+CXCR5^+$ cells (memory pT_{FH}), and after vaccination, a significant increase of the frequency of memory pT_{FH} cells was observed, $p = 0.032$ (Figure 3C). Furthermore, a significant increase of memory pT_{FH1} and pT_{FH2} between the first and the second doses was detected ($p < 0.0001$) (Figure 4A,B). On the contrary, a significant reduction of memory pT_{FH17} was observed after the first dose ($p < 0.0001$) (Figure 4C).

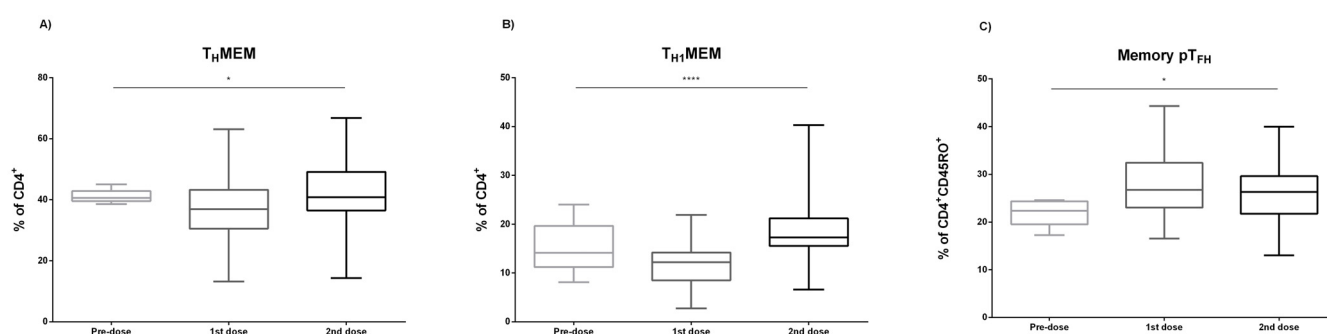


Figure 3. T-specific SARS-CoV-2 vaccine assessment. The frequency of memory T helper (T_H MEM) (A), memory T helper 1 (T_{H1} MEM) (B), and memory peripheral T Follicular helper (pT_{FH}) (C), prior immunization (Pre-dose) after the first and the second doses (1st and 2nd dose, respectively) are depicted. Kruskal–Wallis test was used to compare medians in (A–C) * ($p < 0.05$) and **** ($p < 0.0001$).

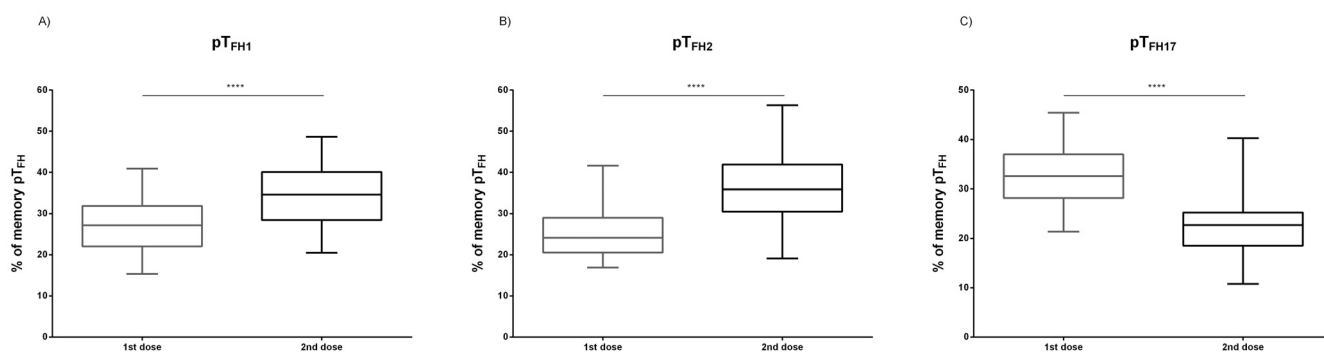


Figure 4. Memory peripheral T follicular helper subset assessment. The frequency of memory peripheral T Follicular helper 1 (pTFH1) (A), memory peripheral T Follicular helper 2 (pTFH2) (B), and memory peripheral T Follicular helper 17 (pTFH17) (C) after the first and the second doses (1st and 2nd dose, respectively) are depicted. U-Mann–Whitney test was used to compare medians in (A–C), **** ($p < 0.0001$).

3.2. Specific T-Cell Immune Response

To examine the specific T-cell response, PBMCs were exposed to anti-SARS-CoV-2 peptides using an unstimulated negative control and CD3/CD28 as positive control, as previously showed in the Material and Methods section. Thirty out of fifty-three (56.6%) subsets presented a positive specific reaction against the Spike pool peptides after the first dose. Meanwhile, after the boost, 45 out of 53 (90%) were identified as Spike-specific responses. The AIM produced with the specific S antigen after the first dose was 3.3 (1.99–4.41) and, in parallel with the frequency, significantly increased after the second dose to 5.0 (3.89–7.22), $p < 0.0001$. A cutoff of 3.0 was considered to set up a result as positive [15]. As expected, since there are no N or M antigens in the vaccine, no responses were detected for both the first and second doses (Figure 5).

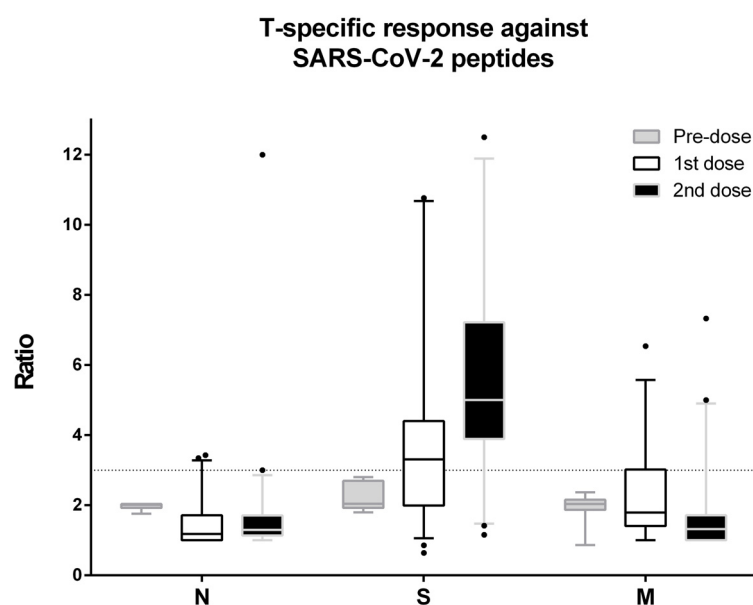


Figure 5. The ratio of specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺ cells after Nucleocapside-pool (N), Spike-pool (S), and Membrane-pool (M) of SARS-CoV-2 peptide stimulation is shown. Grey (before immunization), white (after the first dose), and black (after the second dose) whisker-box plots are shown, and the cutoff to consider T-specific positive response was set at ratio >3 (dotted line).

3.3. B Cell and Antibody Response

To assess the humoral compartment of the immune response, first, the peripheral blood B cell frequency was evaluated and there was no significant difference between the frequency of B cells (CD19⁺ cells) after the first and the second doses. Second, B cell maturation stage was studied based on the surface expression of CD27 and IgD. Switched memory B cells (SwM) (CD19⁺CD27⁺IgD⁺), considered a further stage of the B cell development, were quantified. We observed a significant increase in the SwM B cell frequency after the second dose compared with the first one ($p = 0.0054$) (Figure 6A). After studying the B cell subpopulations, ELISA tests were performed following the protocol shown in the Material and Methods section to evaluate the specific serological profiles (IgG, IgA, and IgM) after BNT162b2 vaccination. Importantly, we detected IgG antibodies in 50 of 53 (94.34%), IgA in 10 (18.67%), and IgM in 13 (24.53%) of the cases after the first dose. It is noteworthy that one of the three participants did not seroconvert to IgG-specific antibodies but produced IgM antibodies. After the second boost, all volunteers developed anti-IgG antibodies (100%), and the frequency of seropositive subjects for the other two isotypes also increased: 22 (41.51%) had IgA and 20 (37.74%) had IgM (Figure 6B).

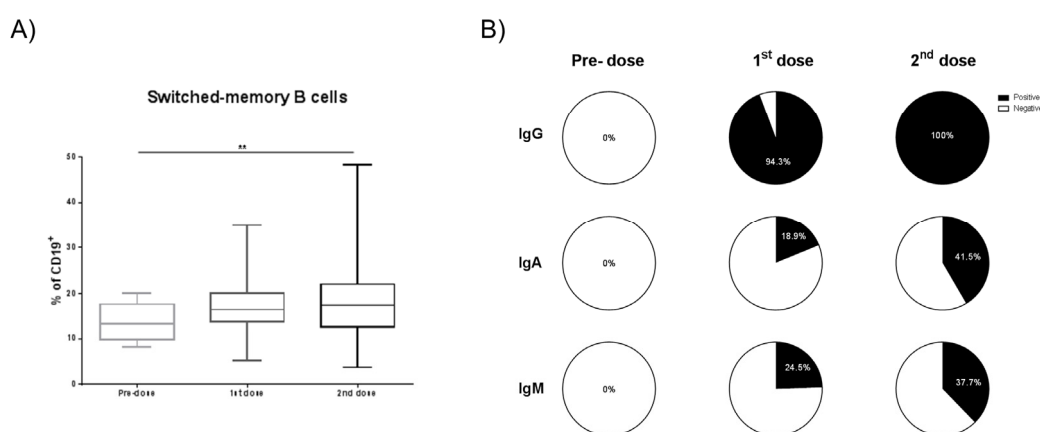


Figure 6. B-specific SARS-CoV-2 vaccine assessment. The frequency of switch-memory B cells (A) within CD19⁺ cells in peripheral blood, prior immunization (Pre-dose), after the first and the second doses (1st and 2nd doses, respectively) is depicted. The frequency of specific anti-SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies before immunization (Pre-dose), after the first and the second doses (1st and 2nd dose, respectively) is shown (B). Wilcoxon test was used to median comparison in A and B, ** ($p < 0.01$).

4. Discussion

The efficacy of vaccines in clinical trials has been described based on the frequency of infected cases and hospitalization after vaccination [17]. However, a detailed evaluation of the immune response is not fully described, and data on specific germinal center reaction cells are still scarce. In some studies, such as the Sputnik vaccine [3], Logunov et al. performed immunogenicity analysis studies in less than 10% of the subjects included in the trial.

Similarly to our findings, both cellular and humoral responses after the seasonal influenza vaccine have been studied [18], and an increase in memory T_{FH} cells after the second dose has been described. The authors observed an increase in T_{FH} cells after the seasonal flu vaccine was correlated with specific antibody development. Likewise, there is an increase in memory pT_{FH1} and pT_{FH2} cells after the second dose of the BNT162b2 vaccine. As previously described, memory pT_{FH1} cells lack the capacity to help naïve B cells in vitro while being capable of inducing memory B cells to differentiate into plasma cells [18]. Moreover, memory pT_{FH2} cells are able to induce naïve B cells to produce Igs and to switch isotypes through IL-21 secretion [19]. All these findings contribute to

explaining the interrelation between the humoral and cellular responses after vaccination against SARS-CoV-2.

Before COVID-19, no mRNA-based vaccine had been approved for human use. However, in non-human primate models, mRNA-based influenza vaccine was assessed to elucidate cellular and humoral immune responses. This vaccine also elicited an increase of T_{FH} cells in peripheral blood after the last dose [20]. With the introduction of new mRNA-based vaccines directed to SARS-CoV-2, the main way to demonstrate sensitization against SARS-CoV-2 is based on specific antibody development. The same response level against SARS-CoV-2 after one dose in convalescents and after two doses in no-SARS-CoV-2-contact subjects was demonstrated [21]. This work is based on neutralizing antibodies, and one of the limitations in our cohort is the lack of information on neutralizing antibody production. Since our ELISA method detects anti-S-2 and -RBD antibodies, we assume that we mainly detect neutralizing antibodies [22].

First-line healthcare workers and elders were included within the first group in vaccination programs across Europe. Here we focused in healthcare workers without known comorbidities and under 65 years old. In this group an increase in SwM B, memory $Th1$ and memory pT_{FH} has been demonstrated. Within memory pT_{FH} , three subsets have been identified, and an specific increase of both memory pT_{FH1} and pT_{FH2} at the expense of pT_{FH17} was observed. This finding could be explained because after the second dose there is an enhancement of both a cellular immune response mediated by memory pT_{FH1} [18] and an induction of germinal center reaction mediated by memory pT_{FH2} [18,19]. However, potential sensitive groups, i.e., such as patients with primary and secondary immunodeficiencies or patients under immunosuppression treatment, could also be prioritized. The patients under hemodialysis treatment have impaired immune systems [23], and a reduction in their humoral response after the BNT162b2 vaccine compared with controls has been observed [24]. Moreover, residents of long-term care facilities developed a weak humoral response after one dose of BNT162b2 [25]. However, up until now, there is a lack of data about the cellular immune response induced after vaccination in these groups of immunosuppressed patients. Unlike the clinical trial-derived data for the BNT162b2 vaccine, where the efficacy after the first dose was reported as 52%, most of the subjects included in our cohort (94%) developed anti-S-specific antibodies 20 days after the first dose. This variability in the production of antibodies could be explained due to differences in the age of the subjects included in both studies. In our study, the median age was 42.5 years (interquartile range 30.5–54.2). Therefore, the immune response is expected to be strong enough to induce a specific response with only one dose. In clinical trials, efficacy has been based on a lack of infection after the vaccination. Similarly, in our cohort, no infections were reported, and the immune response assessment has been used as a tool to test efficacy.

The efficacy of vaccinations is measured through incidence of infection, which seems to be very low (<5%) with mRNA COVID-19 vaccines [1,4]. However, in some specific disease groups, such as solid organ transplant recipients, a lack of protection against symptomatic COVID-19 has been described [26]. The measurement of anti-S SARS-CoV-2 antibodies is an objective and a biological way of assessing vaccine efficacy. Thus, a weaker humoral response in transplanted patients has been demonstrated [27–30]. The use of T cell response components in the assessment of vaccine protection is not routinely implemented, but it could be a valuable tool in specific disease or octogenarian groups.

To our knowledge, this is the first study in which peripheral blood memory T follicular helper cells have been described as relevant subpopulations implicated in the development of an immune response after SARS-CoV-2 vaccination. The higher induction of these cell subsets after the second, but not after the first, dose could help to demonstrate an effective vaccination in the weaker groups of patients indicated in the previous paragraph. A lack of response after such a second dose could be an alarm signaling to protect them and to think about the need for an additional dose to obtain an effective response.

Despite the natural course of an immune response involving the cooperation between T and B cells to generate specific cells implicated in antibody production, a humoral response has been detected before the cellular response in the present study. This finding can be explained because our study is not based on the assessment of T cell subpopulations present in secondary lymphoid organs but in the peripheral blood instead, which takes longer to be detected. On the other hand, we cannot exclude the possibility of extrafollicular responses in our cohort, although it is supposed that the production of the majority of antibodies depends on plasma cells that have undergone the somatic hypermutation and affinity maturation in the germinal center response [9].

Among the limitations of the present work, the absence of PD1 and CCR7 as markers that allow for differentiating quiescent and activated pT_{FH} cells stands out. Moreover, the identification of anti-SARS-CoV-2-specific antibodies as a dichotomous variable did not allow us to establish a correlation between the presence of these antibodies and the level of T cell subsets.

In summary, this study describes the specific immune response after vaccination with the new mRNA based BNT162b2 vaccine, measuring the production of specific antibodies and the development of a specific T cell response. Moreover, mobilization of T follicular helper and B follicular cells into the circulation occurs, with both populations implicated in the post-germinal center secondary immune response, reflecting a specific activation of the immune system after vaccination. Such an approach can help in the management of populations with some degree of immunosuppression or immunosenescence.

Author Contributions: Conceptualization, M.L.-H. and D.S.S.; methodology, A.C.-B., J.I.-V., M.R.-G., A.R.-B., E.G.-L., D.M.-F., P.L.-P., M.A.-P., M.G.-L. and S.G.-F.; software, A.C.-B., D.M.-F., D.S.S. and J.I.-V.; validation, M.L.-H., D.S.S. and J.G.O.-V.; formal analysis, M.L.-H., D.S.S. and J.G.O.-V.; resources, M.L.-H.; data curation, A.C.-B., J.I.-V. and D.S.S.; writing—original draft preparation, M.L.-H., D.S.S. A.C.-B. and J.I.-V.; writing—review and editing, M.L.-H., D.S.S. and J.G.O.-V.; supervision, M.L.-H. and D.S.S.; funding acquisition, M.L.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the Cantabrian Government, grant number 2020UIC22-PUB-001, and from Instituto de Salud Carlos III, grant number COV20/00170.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CEIm, internal code 2020.167).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: The authors acknowledge all of the healthcare workers involved in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 403–416. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Folegatti, P.M.; Ewer, K.J.; Aley, P.K. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **2020**, *396*, 467–478. [\[CrossRef\]](#)
3. Logunov, D.Y.; Dolzhikova, I.V.; Shcheblyakov, D.V. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: An interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* **2021**, *397*, 671–681. [\[CrossRef\]](#)
4. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [\[CrossRef\]](#)
5. Dan, J.M.; Mateus, J.; Kato, Y.; Hastie, K.M.; Yu, E.D.; Faliti, C.E.; Grifoni, A.; Ramirez, S.I.; Haupt, S.; Frazier, A.; et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* **2021**, *371*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Rawat, K.; Kumari, P.; Saha, L. COVID-19 vaccine: A recent update in pipeline vaccines, their design and development strategies. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *892*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

7. Lan, J.; Ge, J.; Yu, J. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220. [\[CrossRef\]](#)
8. Victora, G.D.; Nussenzweig, M.C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 429–457. [\[CrossRef\]](#)
9. Turner, J.S.; Kim, W.; Kalaidina, E.; Goss, C.W.; Rauseo, A.M.; Schmitz, A.J.; Hansen, L.; Haile, A.; Klebert, M.K.; Pusic, I.; et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature* **2021**, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
10. Hodgson, S.H.; Mansatta, K.; Mallett, G. 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.* **2021**, *21*, e26–e35. [\[CrossRef\]](#)
11. Sekine, T.; Perez-Potti, A.; Rivera-Ballesteros, O. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* **2020**, *183*, 158–168.e14. [\[CrossRef\]](#)
12. Irure-Ventura, J.; Segundo, D.S.; Rodrigo, E. High pretransplant BAFF levels and B-cell subset polarized towards a memory phenotype as predictive biomarkers for antibody-mediated rejection. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 779. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Suárez-Fernández, P.; Utrero-Rico, A.; Sandonis, V.; García-Ríos, E.; Arroyo-Sánchez, D.; Fernández-Ruiz, M.; Andrés, A.; Polanco, N.; González-Cuadrado, C.; Almendro-Vázquez, P.; et al. Circulatory follicular helper T lymphocytes associate with lower incidence of CMV infection in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Schmitt, N.; Bentebibel, S.E.; Ueno, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* **2014**, *35*, 436–442. [\[CrossRef\]](#)
15. Grifoni, A.; Weiskopf, D.; Ramirez, S.I. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* **2020**, *181*, 1489–1501.e15. [\[CrossRef\]](#)
16. Pradenas, E.; Trinité, B.; Urrea, V. Stable neutralizing antibody levels 6 months after mild and severe COVID-19 episodes. *Medicine* **2021**, *2*, 313–320.e4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Haas, E.J.; Angulo, F.J.; McLaughlin, J.M.; Anis, E.; Singer, S.R.; Khan, F.; Brooks, N.; Smaja, M.; Mircus, G.; Pan, K.; et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: An observational study using national surveillance data. *Lancet* **2021**, 397, 1819–1829. [\[CrossRef\]](#)
18. Bentebibel, S.E.; Lopez, S.; Obermoser, G. Induction of ICOS + CXCR3 + CXCR5 + T H cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*. [\[CrossRef\]](#)
19. Morita, R.; Schmitt, N.; Bentebibel, S.E.; Ranganathan, R.; Bourdery, L.; Zurawski, G.; Foucat, E.; Dullaers, M.; Oh, S.K.; Sabzghabaei, N.; et al. Human Blood CXCR5 + CD4+ T cells are counterparts of T Follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* **2011**, *34*, 108–121. [\[CrossRef\]](#)
20. Lindgren, G.; Ols, S.; Liang, F. Induction of robust B cell responses after influenza mRNA vaccination is accompanied by circulating hemagglutinin-specific ICOS+ PD-1+ CXCR3+ T follicular helper cells. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. [\[CrossRef\]](#)
21. Gobbi, F.; Buonfrate, D.; Moro, L. Antibody response to the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in subjects with prior SARS-CoV-2 infection. *Viruses* **2021**, *13*, 422. [\[CrossRef\]](#)
22. Carrillo, J.; Izquierdo-Useros, N.; Ávila-Nieto, C. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *538*, 187–191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Fernández-Fresnedo, G.; Ramos, M.A.; González-Pardo, M.C.; De Francisco, A.L.M.; López-Hoyos, M.; Arias, M. B lymphopenia in uraemia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2000**, *15*, 502–510. [\[CrossRef\]](#)
24. Grupper, A.; Sharon, N.; Finn, T. Humoral Response to the Pfizer BNT162b2 Vaccine in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
25. Brockman, M.A.; Mwimanzu, F.; Sang, Y. Weak humoral immune reactivity among residents of long-term care facilities following one dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *medRxiv Prepr. Serv. Health Sci.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
26. Ashokkumar, C.; Rohan, V.; Kroemer, A.H.; Rao, S.; Mazariegos, G.; Higgs, B.W.; Nadig, S.; Almeda, J.; Dhani, H.; Khan, K.; et al. Impaired T-cell and antibody immunity after COVID-19 infection in chronically immunosuppressed transplant recipients. *bioRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
27. Heldman, M.R.; Limaye, A.P. SARS-CoV-2 Vaccines in kidney transplant recipients: Will they be safe and effective and how will we know? *J. Am. Soc. Nephrol.* **2021**, *32*, 1021–1024. [\[CrossRef\]](#)
28. Caballero-Marcos, A.; Salcedo, M.; Alonso-Fernández, R.; Rodríguez-Perálvarez, M.; Olmedo, M.; Graus Morales, J.; Cuervas-Mons, V.; Cachero, A.; Loinaz-Seguro, C.; Iñarrairaegui, M.; et al. Changes in humoral immune response after SARS-CoV-2 infection in liver transplant recipients compared to immunocompetent patients. *Am. J. Transplant.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
29. Alp Ikizler, T.; Coates, P.T.; Rovin, B.H.; Ronco, P. Immune response to SARS-CoV-2 infection and vaccination in patients receiving kidney replacement therapy. *Kidney Int.* **2021**, *99*, 1275–1279. [\[CrossRef\]](#)
30. Rabinowich, L.; Grupper, A.; Baruch, R.; Ben-Yehoyada, M.; Halperin, T.; Turner, D.; Katchman, E.; Levi, S.; Houri, I.; Lubezky, N.; et al. Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients. *J. Hepatol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)

Article

Innate and Adaptive Immune Assessment at Admission to Predict Clinical Outcome in COVID-19 Patients

David San Segundo ^{1,2}, Francisco Arnáiz de las Revillas ³, Patricia Lamadrid-Perojo ², Alejandra Comins-Boo ^{1,2}, Claudia González-Rico ³, Marta Alonso-Peña ², Juan Irure-Ventura ^{1,2}, José Manuel-Olmos ^{4,5}, María Carmen Fariñas ^{3,5,†} and Marcos López-Hoyos ^{1,2,5,*}

- ¹ Immunology Service, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; david.sansegundo@scsalud.es (D.S.S.); alejandra.comins@scsalud.es (A.C.-B.); juan.irure@scsalud.es (J.I.-V.)
- ² Transplantation and Autoimmunity Laboratory, IDIVAL, 39011 Santander, Spain; plamadrid@idival.org (P.L.-P.); malonso@idival.org (M.A.-P.)
- ³ Infectious Diseases Service, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; francisco.arnailasrevillas@scsalud.es (F.A.d.I.R.); claudia.gonzalez@scsalud.es (C.G.-R.); mcarmen.farinas@scsalud.es (M.C.F.)
- ⁴ Internal Medicine Service, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; josemanuel.olmos@scsalud.es
- ⁵ Faculty of Medicine, University of Cantabria, 39011 Santander, Spain
- * Correspondence: marcos.lopez@scsalud.es
- † These authors contributed equally to this work.

Citation: Segundo, D.S.; de las Revillas, F.; Lamadrid-Perojo, P.; Comins-Boo, A.; González-Rico, C.; Alonso-Peña, M.; Irure-Ventura, J.; Manuel-Olmos, J.; Fariñas, M.C.; López-Hoyos, M. Innate and Adaptive Immune Assessment at Admission to Predict Clinical Outcome in COVID-19 Patients. *Biomedicines* **2021**, *9*, 917. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080917>

Academic Editor: Marjorie Pion

Received: 24 June 2021

Accepted: 26 July 2021

Published: 29 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: During the COVID-19 pandemic, many studies have been carried out to evaluate different immune system components to search for prognostic biomarkers of the disease. A broad multiparametric antibody panel of cellular and humoral components of the innate and the adaptive immune response in patients with active SARS-CoV-2 infection has been evaluated in this study. A total of 155 patients were studied at admission into our center and were categorized according to the requirement of oxygen therapy as mild or severe (the latter being those with the requirement). The patients with severe disease were older and had high ferritin, D-dimer, C-reactive protein, troponin, interleukin-6 (IL-6) levels, and neutrophilia with lymphopenia at admission. Moreover, the patients with mild symptoms had significantly increased circulating non-classical monocytes, innate lymphoid cells, and regulatory NK cells. In contrast, severe patients had a low frequency of Th1 and regulatory T cells with increased activated and exhausted CD8 phenotype (CD8⁺CD38⁺HLADR⁺ and CD8⁺CD27⁺CD28⁺, respectively). The predictive model included age, ferritin, D-dimer, lymph counts, C4, CD8⁺CD27⁺CD28⁺, and non-classical monocytes in the logistic regression analysis. The model predicted severity with an area under the curve of 78%. Both innate and adaptive immune parameters could be considered potential predictive biomarkers of the prognosis of COVID-19 disease.

Keywords: SARS-CoV-2; flow cytometry; innate immunity; adaptive immunity; immunological profile; predictive model

1. Introduction

COVID-19 is an infectious disease induced by the novel coronavirus SARS-CoV-2 first detected in December 2019, causing acute respiratory distress syndrome (ARDS). Due to its high rate of transmission, it has reached pandemic status. The clinical picture of the infection ranges from asymptomatic or mildly symptomatic to lethal, mainly affecting the elderly population and those with associated comorbidities [1,2].

Early after COVID-19 breakout, different parameters were identified as prognostic markers of death, such as serum D-dimer, IL-6, troponin, ferritin, lactate dehydrogenase

(LDH), and lymph count [3]. Subsequently, several groups worldwide confirmed these parameters and proposed new factors at admission to identify those patients with poor outcomes [4–8].

The variability of the antiviral immune response in healthy subjects might underlie the diverse array of clinical manifestations. Moreover, therapeutic approaches, primarily based on previous SARS, MERS, and inflammatory disorders associated with the cytokine storm, demonstrate different efficacies.

Considering that SARS-CoV-2 is a foreign invader in our organism, the immune response seems vital in clearing the infection. Furthermore, a dysregulated immune response appears to play a crucial role in the second phase of the disease, which manifests itself in intensive care units and might result in death [9].

Circulating immune cells and soluble immune components can be detected in peripheral blood and may be direct consequences of infection or biomarkers of tissue pathology in COVID-19 [10,11].

The early identification of patients with poor prognoses would help clinicians to manage the clinical therapeutic options. Here, we propose a model including easily measurable immunological parameters to predict the patients at risk of worse outcomes.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Blood Sampling

The Regional Ethics Committee (CEIm, internal code 2020.167, 14 May 2020) approved the protocol for the patients included in the study. Patients at admission or, if not possible, a legal representative gave oral informed consent, which was expressed in the medical records. The inclusion criteria included subjects over the age of 18 years who demonstrated COVID-19 with positive RT-PCR for SARS-CoV-2. Disease severity was assessed based on their clinical records. The cohort was divided based on oxygen therapy requirements during their follow-up into those with no requirement (mild) and those who required oxygen therapy or intensive care or were deceased (moderate–severe). Blood was collected in sodium heparin tubes for flow cytometry and functional studies or tubes without additives for serum parameters at admission into the hospital.

2.2. Flow Cytometry for Main Peripheral Blood Lymphocytes

Frequencies and absolute numbers of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺/56⁺, and CD3⁺/CD16⁺/56⁺ were estimated using AQUIOS CL (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) volumetric flow cytometer. The instrument employs a volumetric approach for enumerating specific cell populations without the need for reference beads. Fifty microliters of whole blood from EDTA tubes was stained with CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD4-RD1, CD16-CD56-RD1, CD8-ECD, CD19-ECD, and CD3-phycoerythrin-cyanine 5 (PC5) (Beckman Coulter). After lysis, the sample was acquired in the automated “load and go” flow cytometer.

2.3. Flow Cytometry for B and T Cell Subsets and Monocyte Subpopulations

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) gradient centrifugation. Briefly, PBMCs were freshly stained and processed following standard procedures. The following monoclonal antibodies were used to identify the different T lymphocyte subsets: anti-CD8-FITC clone B9.11 (Beckman Coulter), CD127-FITC clone R34.34, CD28-FITC clone CD28.2, CXCR3-FITC clone G025H7 (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD25-phycoerythrin (PE) clone B1.49.9 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), HLA-DR-PE clone Immu-357, CD62L-ECD clone DREG56, CD45RO-ECD clone UCHL1, CD4-phycoerythrin-cyanine 5.5 (PC5.5) clone 13B8.2, CD27-phycoerythrin-cyanine 7 (PC7) clone 1A4CD27, CD38-allophycocyanin (APC) clone LS198-4-3, CD45RA-Alexa fluor 700 (AF700) clone 2H4LDH11 LDB9, CD3-pacific blue (PB) clone UCHT1, and CD45-Krome orange (KrO) clone J33.

The different B-lymphocyte subsets were identified using the following monoclonal antibodies: anti-IgD-FITC clone IA6-2 (Beckman Coulter), CD27-PC5.5 clone 1A4CD27, CD19-PC7 clone J3-119, and CD45-KrO clone J33.

The following monoclonal antibodies were used to identify the different monocyte subpopulations: anti-CD14-PE clone RMO52 (Beckman Coulter), CD16-APC clone 3G8, and CD45-KrO clone J33.

2.4. TLR Protein Expression in PBMCs

The cell-surface expression of TLR4 and the intracellular expression of TLR3, TLR7, and TLR8 were assessed in different PBMC subpopulations including T lymphocytes, B lymphocytes, and monocytes by flow cytometry, as previously shown [12]. PBMCs collected into EDTA tubes were isolated by Ficoll Histopaque 1077 and stained with CD3-PB clone UCHT1 (Beckman Coulter), CD19-PC5.5 clone J3-119, and CD14 ECD clone RMO52 to identify T lymphocytes, B lymphocytes, and monocytes, respectively, and with PE-conjugated anti-human TLR4 (eBioscience, San Diego, CA, USA) or PE mouse IgG2a isotype control for 20 min in the dark. To determine the intracellular expression of TLR3 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany), TLR7 (Abcam, CA, USA), and TLR8, cells were permeabilized with FACS permeabilizing solution (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and stained with PE-conjugated anti-human TLR or mouse isotype control for 20 min in the dark. Expression of TLRs was assessed by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter).

2.5. SARS-CoV2 T-Specific Response Assessment by Flow Cytometry

The procedure was validated by the Spanish Society of Immunology and based on activation-induced marker (AIM) expression after exposure to specific SARS-CoV-2 antigens [13]. Briefly, the PBMCs from heparinized blood were isolated by Ficoll gradient and cultured at 10^6 cells/mL in TexMACS medium (MiltenyiBiotec) for 24 h at 37 °C in a flat-bottom 96-well plate in 0.1% DMSO; PepTivator SARS-CoV-2 Prot S, Prot M, and Prot N (1 µg/mL); and Dynabeads Human T activator CD3/CD28 (Gibco Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Lithuania) as a polyclonal stimulus. After incubation, the PBMCs were washed and stained with the following monoclonal antibodies: anti-CD3 (FITC) clone UCHT 1 (Inmunotech SAS Beckman Coulter, Marseille, France), anti-CD134 (PE) clone 134-1 (Cytognos, Salamanca, Spain), anti-CD8 (ECD) clone SFC121Thy2D356,22,23 (Beckman Coulter), anti-CD25 (PE-CyTM7) clone 2A3, and anti-CD4 (APC-Vio 770) clone VIT4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany). The stained PBMC samples were washed with PBS 150 µL and centrifuged for 5 min at 1800 rpm. Finally, 2 µL of 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) staining solution (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA) and 90 µL of PBS were added before the samples were acquired on the CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter). Results were expressed as the ratio of the frequency in the AIM obtained after specific activation to negative non-stimulated control. A ratio >3 in one of the specific SARS-CoV-2 peptides was considered as a positive reaction.

2.6. Determination of Circulating IL-6

Human IL-6 was measured by ELISA (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) following the manufacturer's instructions. The sensitivity of IL-6 serum levels was 0.057 pg/mL. Intra- and interassay variability were 4.38% and 9.6%, respectively.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software. The distribution of continuous variables was assessed using Kolmogorov–Smirnov/Shapiro–Wilk tests where indicated. Results were expressed as mean ± standard deviation or median + interquartile range (IQR) for continuous variables and percentages for categorical data. Comparisons were based on the unpaired T-Student test or U-Mann–Whitney U test for parametric and nonparametric continuous data, respectively. Welch correction was applied

when appropriate. A two-sided p -value < 0.05 was considered statistically significant. In order to identify variables associated with moderate–severe clinical outcomes, logistic regression analysis was performed. After univariate analysis with the potentially independent variables, the odds ratio was calculated with Wald’s statistic. In a further multivariate analysis, those with $p < 0.25$ value in the univariate analysis, following the proposed Hosmer and Lemeshow criteria [14], and supported by other reference authors [15] were included in the analysis. For the model selection, the backward method procedure was used to perform automatically variable selection. To assess the predictive capability of the model, the area under the curve (AUC) was used.

3. Results

3.1. Patient Demographics and Baseline Characteristics at COVID-19 Onset

One hundred and fifty-five COVID-19-positive patients recruited during the first days after hospital admission (mean of 1.0, interquartile range (IQR) (1–2) days of admission) were included in the study from April–October 2020. The median of days between the onset of symptoms and admission was 6 days (IQR 3–9).

The cohort was divided according to their clinical progression after admission into two groups: patients without oxygen therapy (73 included in the mild disease group) and those with oxygen therapy requirements (82 included in the severe disease group). The patients with severe disease were significantly older and had lower oxygen saturation at admission than the mild-disease group. The levels of C-reactive protein (CRP), troponin, ferritin, lactate-dehydrogenase (LDH), C4, and IL-6 were significantly higher in severe patients. The D-dimer levels were also increased in the severe group, although not significantly. No changes in serum concentration of immunoglobulins (IgG, IgA, and IgM) at admission were observed between mild and severe groups, and the concentration remained within the normal range values. Table 1 summarizes the main demographic, analytical, and clinical parameters compared between groups.

Table 1. Demographic, analytical, and clinical parameters.

	Mild ($n = 73$)	Moderate–Severe ($n = 82$)	p -Value	Reference Values
Demographic				
Age (years)	59 (47–77)	72 (63–79)	<0.001	NA
Gender (% female)	43 (58.90%)	26 (31.71%)	0.001	NA
Comorbidities				
Hypertension	30 (41.10%)	43 (52.44%)	NS (0.158)	NA
Type II diabetes	11 (15.07%)	17 (20.73%)	NS (0.360)	NA
Heart disease	12 (16.44)	20 (24.39%)	NS (0.222)	NA
Respiratory disease	6 (8.22%)	8 (9.76%)	NS (0.739)	NA
Obesity	12 (16.44)	11 (13.41%)	NS (0.597)	NA
Biochemical parameters				
C-reactive protein (mg/dL)	2.9 (0.9–6.6)	6.5 (3.0–10.7)	0.001	0.1–0.5
Ferritin (ng/mL)	203.5 (105.5–603)	535 (224–1135)	<0.001	10–291
D-dimer (ng/mL)	540 (313–992)	702 (389–1309)	NS (0.199)	0–500
Troponin (ng/mL)	5 (3–14)	11 (6–21)	0.006	0–40
LDH (IU/L)	227 (173–277)	274 (223–362)	<0.001	120–246
O ₂ saturation at admission (%)	97 (96–98)	95 (93–97)	<0.001	NA
Complete blood count				
Lymphocytes (%)	23.40 (16.00–32.75)	16.65 (10.80–24.90)	0.001	20.0–50.0

Neutrophils (%)	64.85 (54.35–74.40)	74.00 (65.30–81.40)	<0.001	42.0–75.0
Monocytes (%)	8.70 (6.85–11.85)	7.05 (4.70–10.00)	0.003	2.0–13.0
Lymphocytes count ($\times 10^3$)	1.20 (0.80–1.80)	0.90 (0.70–1.20)	0.001	1.2–5.0
Neutrophils ($\times 10^3$)	3.45 (2.30–4.90)	4.15 (2.70–5.90)	NS (0.077)	1.4–7.5
Monocytes ($\times 10^3$)	0.53 $\pm$ 0.27	0.45 $\pm$ 0.26	0.051	0.2–1.0
Serum immune factors				
IgG (mg/dL)	1094.91 $\pm$ 351.20	1096.39 $\pm$ 344.30	NS (0.979)	734–1486
IgM (mg/dL)	98.18 (73.85–134.31)	82.68 (51.42–133.88)	NS (0.078)	41–201
IgA (mg/dL)	262.36 $\pm$ 155.21	279.47 $\pm$ 135.86	NS (0.454)	49–401
C3 (mg/dL)	131.50 $\pm$ 33.02	133.32 $\pm$ 30.60	NS (0.724)	77–203
C4 (mg/dL)	31.04 (25.26–37.02)	35.44 (27.86–40.22)	0.019	7.7–50.5
IL-6 (ng/dL)	26.68 (8.12–54.20)	33.88 (7.46–125.0)	0.048	0–30

Abbreviations: LDH: lactate dehydrogenase; NA: not applicable; NS: not significant. For parametric and nonparametric variables, mean $\pm$ SD and median (interquartile range) are shown. For comparison, T-Student and U-Mann–Whitney test, respectively, were used. The comparison of frequencies was addressed by the Chi-square test.

3.2. Innate-Immune Compartment Assessment at Admission

The innate immune system is involved in the first stage of any viral infection, including COVID-19 disease [16]. The main cellular components of the innate immunity to be measured in peripheral blood are neutrophils, monocytes, NK, and innate lymphoid cells (ILC). In patients with active COVID-19 disease, different innate immune signatures have been identified from mild to severe disease [16,17]. Those patients with a more severe phenotype had increased neutrophil and reduced monocyte frequency at admission [18,19]. In our cohort, these data are confirmed (Table 1, Figure 1A). Moreover, a significant increase in the percentage of non-classical monocytes in the mild group was observed ($p = 0.01$; Figure 2A). In addition, within the innate lymphoid cells (ILC), a significant increase in both the frequency of regulatory NK ($CD3-CD56^{\text{high}}CD16^{-/\text{low}}$) cells ($p = 0.016$, Figure 2B) and the absolute number of ILC type-3 ($p < 0.001$) in the mild group was observed (Figure 2C).

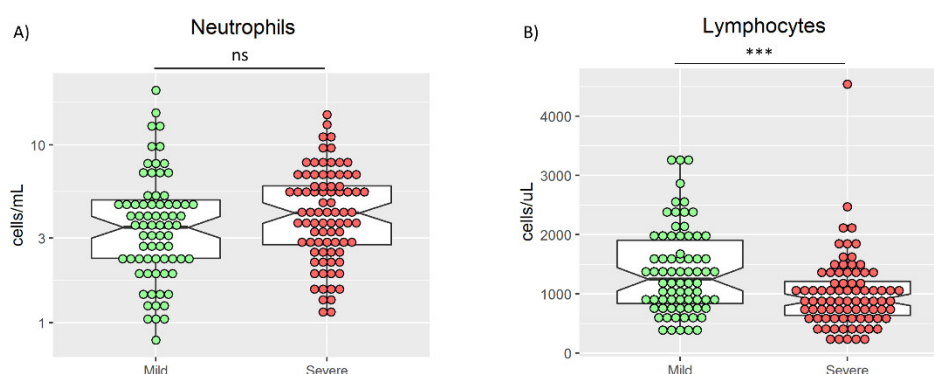


Figure 1. Absolute count of neutrophils (A) and lymphocytes (B) in mild and severe patients. U Mann–Whitney test was used to compare medians in A and B. ***: $p < 0.001$. ns: not significant.

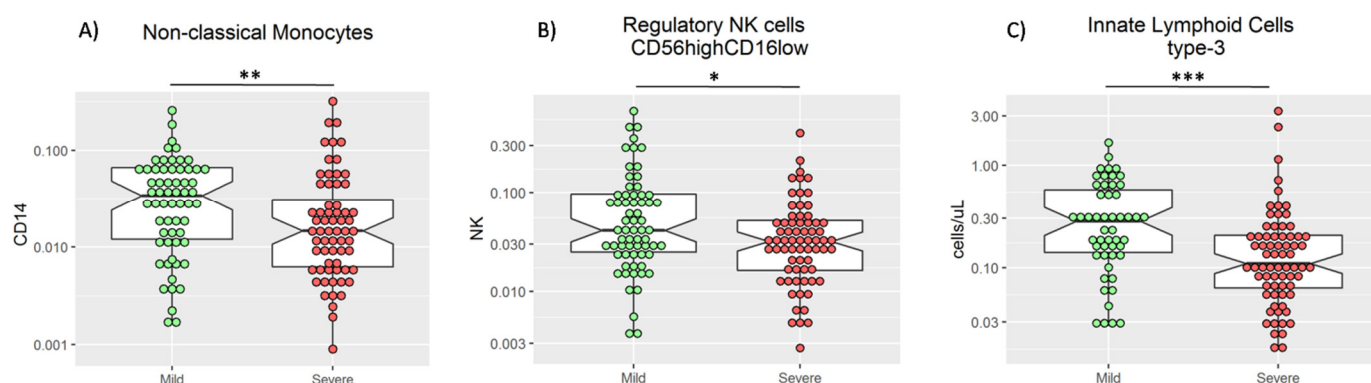


Figure 2. Frequency of non-classical monocytes (A) and regulatory NK cells (B), and absolute count of innate lymphoid cells type-3 (C) in mild and severe patients. U-Mann–Whitney test was used to compare medians in A, B, and C, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Toll-like receptors (TLRs) are important innate immune receptors in recognizing viral particles and play an essential role in the induction of the first line of immune responses. Among the TLRs described in humans, TLR3 and TLR7 have been involved in the immune response against SARS-CoV-2 [20,21]. Therefore, the expression of TLR3, TLR7, and TLR4, as control, was measured. However, no differences in TLR expression between the two groups of patients were found (Table 2).

Table 2. Comparison of innate immunity parameters in mild and moderate–severe COVID-19 patients.

	Mild (n = 73)	Moderate–Severe (n = 82)	p-Value
Monocytes			
Classic (% CD14 ⁺ CD16 [−])	70.34 (55.9–79.6)	71.1 (49.5–82.2)	NS (0.896)
Intermediate (%CD14 ⁺ CD16 ⁺)	27.9 (17.4–39.9)	27.0 (15.2–42.9)	NS (0.677)
Non-classic (% CD14 ⁺ CD16 ⁺)	3.4 (1.2–6.6)	1.5 (0.6–3.5)	0.010
TLR expression			
TLR3	1.1 (0.8–1.7)	1.1 (0.9–1.6)	NS (0.956)
TLR4	2.1 (1.0–3.1)	1.7 (1.1–2.6)	NS (0.593)
TLR7	1.4 (1.0–2.3)	1.3 (1.0–2.1)	NS (0.631)
NK cells			
%CD16/56	13.77 (10.71–23.1)	17.25 (11.7–25.9)	NS (0.097)
%NKT	5.05 (3.205–10.945)	4.52 (3.76–9.25)	NS (0.746)
#CD16/56	169 (114–277)	159 (98–230)	NS (0.205)
#NKT	59 (32.5–130)	44 (30–71)	0.019
CD56 ⁺ CD16 [−]	4.2 (2.5–9.7)	3.2 (1.6–5.1)	0.014
CD56 ⁺ CD16 ⁺	95.8 (90.3–97.5)	96.8 (94.8–98.3)	0.014
ILCs			
ILC1 (Lin [−] CD127 ⁺ CD117 [−] CD294 [−])	2.33 (1.33–4.64)	1.66 (0.94–3.88)	NS (0.198)
ILC2 (Lin [−] CD127 ⁺ CD117 ⁺ CD294 ⁺)	0.32 (0.13–0.73)	0.25 (0.11–0.44)	NS (0.497)
ILC3 (Lin [−] CD127 ⁺ CD117 ⁺ CD294 [−])	0.28 (0.14–0.60)	0.11 (0.06–0.21)	0.00028

Abbreviations: TLR: Toll-like receptor; NK: natural killer; NKT: natural killer T cells; #: absolute count (cells/μL); ILC: innate lymphoid cells; NS: not significant. For parametric and non-parametric variables, mean ± SD and median (inter-quartile range) are shown. For comparison, T-Student and U-Mann–Whitney tests, respectively, were used. All TLR expression was calculated as the ratio of MFI of specific TLR monoclonal Ab/isotype control. See Materials and Methods for details.

3.3. Adaptive Immune Compartment Assessment at Admission

As previously described [22,23], marked lymphopenia in severe patients was confirmed (Table 1). To avoid skew interpretation in absolute counts, only relative frequencies were evaluated. In the main lymphocyte subsets, a significantly higher percentage of

T lymphocytes at admission with a reduction of B and NK cells in mild patients was observed compared with the severe group. No differences were observed in the frequency of CD4 and CD8 T cell subsets (Table S1). Within the CD4 T cell compartment, an increase in the frequencies of both total Th1 (CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻) and memory Th1 (CD4⁺CD45RO⁺CXCR3⁺CCR6⁻) T cells in the mild group was observed ($p = 0.057$ and $p = 0.030$, respectively, Table 3, Figure 3A). Notably, the frequency of peripheral blood T cells with a regulatory phenotype (Tregs) in mild patients was slightly higher than in severe patients ($p = 0.063$) (Table 3).

Conversely, the CD8⁺ T cells are cytotoxic antiviral lymphocytes, and an increased proportion of activated and exhausted CD8⁺ T cells has been described in COVID-19 [24]. Accordingly, we found a significantly increased frequency of CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ (Figure 3B) and CD8⁺CD27⁻CD28⁻ in the severe group compared with the mild group (Table 3, Figure 3C). On the other hand, the frequency of naïve CD8 populations CD8⁺CD62L⁺CD45RA⁺ and CD8⁺CD27⁺CD28⁺ increased in the mild group. Finally, the frequency of effector population CD8⁺CXCR3⁺CCR6⁺ and memory CD8⁺CD45RO⁺CXCR3⁺CCR6⁺ were increased in the mild group at admission (Table 3).

In addition, as previously described [19], a significantly high proportion of plasmablasts (CD19⁺CD20⁺CD27^{high}CD38^{high}) in the severe group was confirmed (Table 3, Figure 3D).

Table 3. Comparison of frequencies of T and B lymphocyte functional subsets between groups.

	Mild ($n = 73$)	Moderate–Severe ($n = 82$)	p -Value
T helper subsets (CD4 ⁺)			
CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺	86.7 (73.9–93.9)	87.1 (75.2–93.6)	NS (0.782)
CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁺	4.8 (3.1–8.1)	4.3 (2.5–7.2)	NS (0.695)
CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁻	0.6 (0.3–1.0)	0.8 (0.3–1.2)	NS (0.724)
CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁻	6.5 (1.0–16.8)	6.7 (2.0–13.6)	NS (0.927)
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Th1)	23.9 (18.3–34.8)	20.1 (15.3–30.0)	0.057
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ (Th1/Th17)	12.6 (8.7–16.0)	9.6 (7.1–14.0)	0.039
CD4 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ (Th17)	12.3 ± 5.0	12.4 ± 5.2	NS (0.907)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ (Memory Th)	62.8 (50.4–71.9)	58.1 (40.2–72.0)	NS (0.064)
CD4 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁺ (Naïve)	19.7 (12.7–29.3)	18.5 (9.9–31.3)	NS (0.290)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺ (TCM)	46.4 ± 13.9	48.3 ± 15.8	NS (0.234)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁻ (TEM)	24.5 (17.8–38.5)	21.3 (11.5–42.8)	NS (0.252)
CD4 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁻ (TEMRA)	1.4 (0.5–3.8)	1.3 (0.6–3.9)	NS (0.957)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ (Memory Th1)	32.2 (26.9–44.4)	28.7 (24.0–38.0)	NS (0.030)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ (Memory Th1/Th17)	19.4 (16.1–25.2)	23.2 (17.5–26.0)	NS (0.137)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ (Memory Th17)	21.1 ± 8.7	18.5 ± 7.9	NS (0.098)
CD4 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CD294 ⁺ (Th2)	1.0 (0.7–1.7)	0.8 (0.4–1.3)	NS (0.830)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ (Tfh)	0.2 (0.1–0.4)	0.3 (0.1–0.5)	NS (0.153)
CD4 ⁺ CD127 ⁻ CD25 ⁺ (Tregs)	6.4 (5.5–7.5)	5.7 (4.3–7.2)	NS (0.063)
T cytotoxic subsets (CD8 ⁺)			
CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺	57.1 (31.4–71.1)	37.6 (21.5–53.2)	0.004

CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁺	2.1 (1.2–3.7)	2.2 (1.1–3.7)	NS (0.580)
CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁻	10.2 (7.4–16.2)	12.0 (6.5–19.0)	NS (0.219)
CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁻	27.7 (15.8–53.1)	44.5 (24.4–63.2)	0.019
CD8 ⁺ CXCR3 ⁺ (Tc1/Tc17)	4.9 (3.2–9.5)	3.0 (1.8–4.6)	0.0003
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ (Memory Tc)	42.9 (34.9–57.7)	42.2 (35.2–57.6)	NS (0.749)
CD8 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁺ (Naïve)	25.9 (14.8–40.8)	19.2 (10.3–28.8)	0.026
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺ (TCM)	15.0 (10.0–19.2)	14.1 (8.8–21.7)	NS (0.942)
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁻ (TEM)	30.9 (23.9–38.7)	31.6 (22.6–44.6)	NS (0.780)
CD8 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁻ (TEMRA)	21.0 (11.8–34.4)	26.1 (14.3–38.1)	NS (0.125)
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CXCR3 ⁺ (Memory Tc1/Tc17)	2.5 (1.4–6.6)	2.8 (1.2–5.1)	0.0002
CD8 ⁺ DR ⁺ CD38 ⁺ B lymphocytes	11.2 (5.3–20.5)	13.8 (8.8–25.6)	0.028
B naïve (CD27 ⁺ IgD ⁺)	65.3 (47.8–75.5)	63.8 (48.3–75.0)	NS (0.656)
B unswitched (CD27 ⁺ IgD ⁺)	15.4 (9.0–23.4)	11.5 (8.3–21.5)	NS (0.196)
B switched (CD27 ⁺ IgD ⁻)	15.9 (8.5–24.1)	17.0 (9.8–25.5)	NS (0.478)
Plasmablasts (CD19 ⁺ CD20 ^{low} CD27 ^{hi} CD38 ^{hi})	1.9 (0.8–5.8)	5.3 (1.6–9.7)	0.002

Abbreviations: Th: helper T cell; TCM: central memory T cells; TEM: effector memory T cells; TEMRA: terminally differentiated T cells; Tregs: regulatory T cells; Tc: cytotoxic T cells; Tfh: T follicular helper cells; NS: not significant. For parametric and non-parametric variables, mean $\pm$ SD and median (interquartile range) are shown. For comparison, T-Student and U-Mann–Whitney tests, respectively, were used.

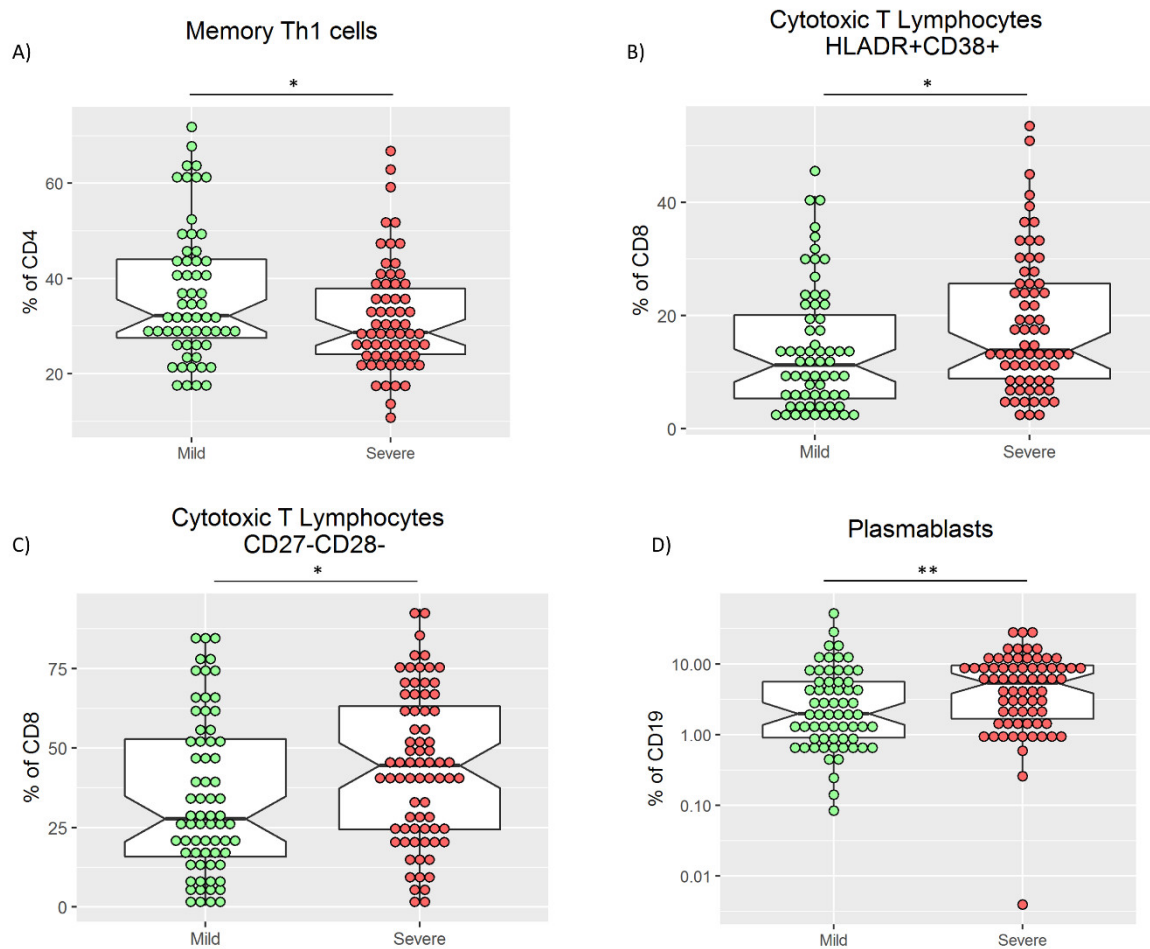


Figure 3. Frequency of memory Th1 cells (A), cytotoxic T lymphocytes HLADR⁺CD38⁺ (B), cytotoxic T lymphocytes CD27[−]CD28[−] (C), and plasmablasts (D) in mild and severe patients. U-Mann–Whitney test was used to compare medians in A, B, C, and D. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

3.4. SARS-CoV-2 Specific T Cells Response in Active COVID-19 Disease

Phenotypic characterization of immune cells may not reflect their function and specificity. The specific T cell response against overlapping peptide pools of the nucleocapsid phosphoprotein (“N”), the membrane glycoprotein (“M”), and the surface glycoprotein (“S”) of SARS-CoV-2 through activation of PBMC in both mild and severe groups was assessed. The response was evaluated by expressing activation-induced markers (CD134 and CD25) after 24 h of stimulation, as previously shown [13]. Anti-CD3/CD28 monoclonal antibody stimulation was used as a positive control, while medium without additives was used as a negative control. The global stimulation index with any SARS-CoV-2 antigen was comparable between groups at admission (Table S2).

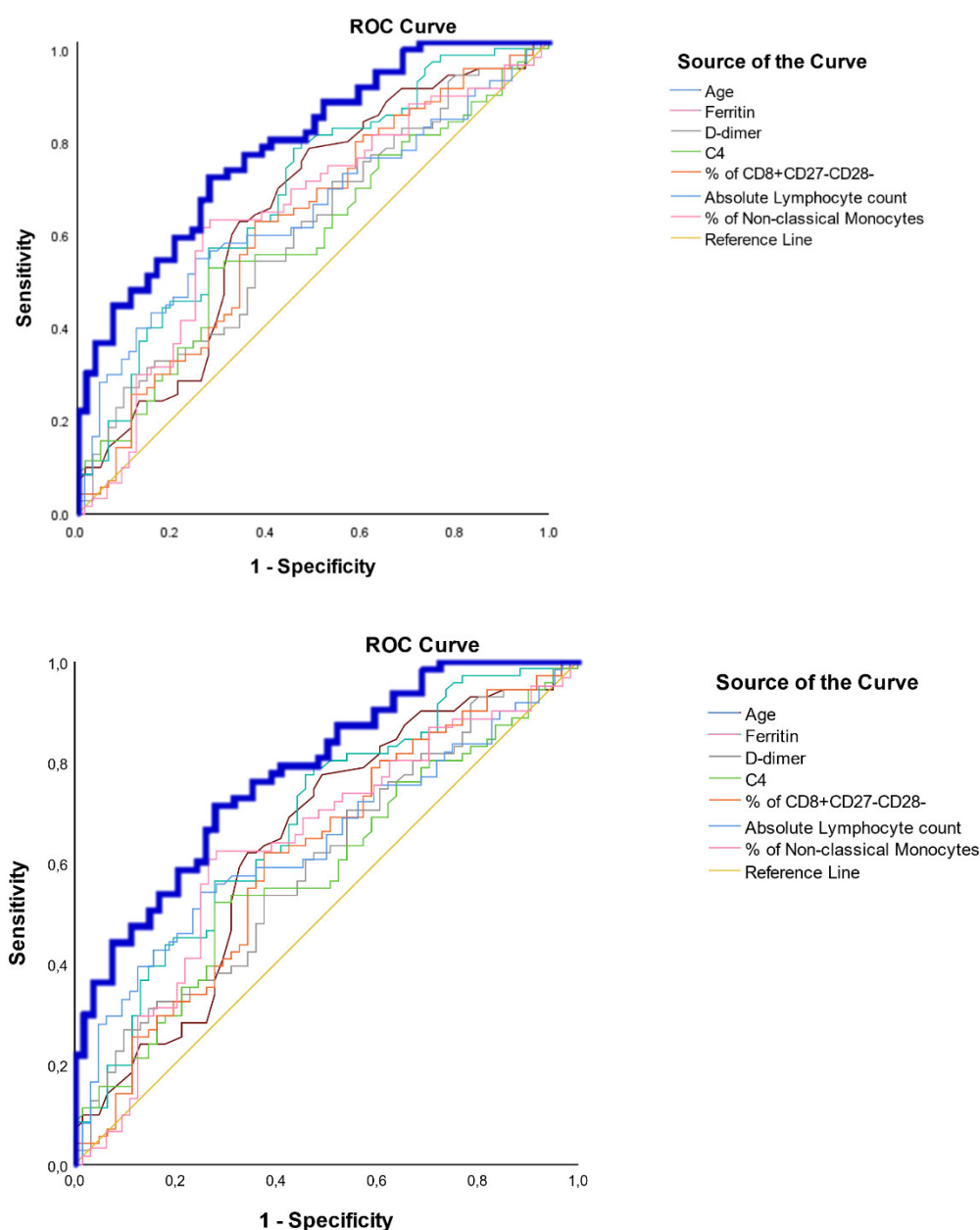
3.5. Assessment of the Immune Parameters as a Prognosis Factor

Within all the evaluated immune parameters included in this study, those with significant differences at admission were selected in order to investigate their independent role in the prognosis of the patients. The univariate and multivariate analyses are summarized in Table 4. The logistic regression model was performed as described in Materials and Methods, and the parameters finally included in the model were: age, ferritin, D-dimer, absolute counts of lymphocytes, C4, CD8⁺CD27[−]CD28[−], and non-classical monocytes. The area under the curve was 78.2%, with a sensitivity and specificity of 71.4 and 72.2, respectively (Figure 4).

Table 4. Univariate and Multivariate analysis of the parameters included in the logistic regression model.

Parameter	Univariate			Multivariate		
	<i>p</i>	Odds	CI	<i>p</i>	Odds	CI
Age	<0.001	1.033	1.013–1.053	0.015	1.038	1.007–1.069
Ferritin	<0.001	1.001	1.001–1.002	0.021	1.001	1.001–1.002
D-dimer	0.226	1.000	1.000–1.000	0.01	1.000	1.000–1.001
Absolute lymphocyte count	0.002	0.999	0.999–1.000	0.023	0.999	0.998–1.000
C4	0.016	1.041	1.007–1.075	0.110	1.036	0.992–1.082
% of CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺	0.023	1.017	1.002–1.031	0.701	1.004	0.985–1.023
% of non-classical monocytes	0.288	0.18	0.000–29.826	0.908	1.712	0.000–0.000149

Abbreviations: CI: confidence interval.


Figure 4. ROC curve analysis of the logistic regression model for prediction of moderate–severe outcomes. Superposed and independent AUC analyses of the variables included in the logistic regression model are depicted. The AUC of the

merged probability is calculated from the predictive model in bold blue line as shown in the Materials and Methods section.

4. Discussion

The COVID-19 disease has been divided into two well-differentiated stages, firstly an inflammatory step and subsequently a hyper-inflammatory step. The inflammatory response is conducted by innate immune components early after SARS-CoV-2 infection. An average of 10 days has been estimated for this response, followed by the induction of an efficient adaptive specific response in mild disease. However, if this immune response is overcome, a further hyper-inflammatory response is mounted. This hyper-inflammatory response has been associated with severe and poor clinical outcomes [25–27].

Different immune profiles at admission have been associated with clinical outcomes, underlining the presence of lymphopenia [10], neutrophilia [11], and an increase in monocyte subsets [28]. Furthermore, alterations in adaptive immune system components, including activated and exhausted phenotypes in cytotoxic T cells, have been confirmed [29]. Moreover, increased levels of plasmablasts in severe patients have been observed [19].

A comprehensive immune profile was created in the present work, and the obtained results were comparable with those described in previous studies [28,29] (Tables 2 and 3). Among differential features in the innate immune system in severe versus mild COVID-19 patients, a dysfunctional neutrophil skew was observed in severe cases [30]. This emergency myelopoiesis could be associated with an increased frequency of neutrophils and lymphopenia, as observed in our cohort. Moreover, non-classical monocytes were expanded within the monocyte compartment in the mild group compared with severe cases [31]. This monocyte subset has been involved in inflammation restoration and tissue recovery [32], whereas its increased frequency in mild patients could be related to virus clearance [33].

The role of total ILCs and specifically ILC1 in antiviral immune response has been previously shown [34,35]. A reduction of ILC1 in severe COVID-19 patients has been recently described by García et al. [35]. Our results confirmed the reduction of this cell subset in severe COVID-19 patients, although no significant differences were observed.

In contrast, the role of ILC3 in respiratory viral infections has not been described yet. ILC3 exist mainly in the intestinal mucosal tissue, playing an important function in mucosal homeostasis and inflammatory responses. Nevertheless, we observed a significant reduction of this subpopulation in severe COVID-19 patients at admission. The function of ILC3 in the intestinal mucosa is well described [36]. Their role in respiratory mucosa remains to be elucidated. Nonetheless, our finding was in peripheral blood, and the relationship between circulating and tissue ILC3 is not established yet.

TLR signaling in viral infections has been thoroughly studied. Specifically, TLR-3, TLR-7, and TLR-8 exert a key role in infections by RNA viruses, such as SARS-CoV-2. Functional studies have identified rare loss-of-function variants of the X-chromosomal *TLR7* in severe COVID-19 patients [37]. In our cohort, the patients with severe disease were older and had several comorbidities that could go unnoticed, such as a loss-of-function effect, since no significant differences in the expression of TLR-3 and TLR-7 considering the severity of COVID-19 patients were observed.

The potential role of regulatory subsets in COVID-19 prognosis was studied by Meckiff et al. [38]. They observed a skew towards a reactive gene expression pattern of SARS-CoV-2-specific CD4⁺ T cells with impairment of Tregs in severe patients. In our cohort at admission, the severe patients had reduced Treg frequency and CD3-CD56⁺CD16^{lo} NK cells compared with the mild group [39].

The Th1 response is involved in cellular immunity throughout IFN- γ production. In our cohort, an increase in Th1 and memory Th1 cells was observed in the mild group. This

observation points to an early activation compared with the severe group. Previous studies on Th subsets in COVID-19 have shown poor outcomes related to undifferentiated Th subsets in patients [40] or with a skew towards Th2 cells [41].

The cytotoxic T cell is the main subset in adaptive antiviral response. After immunophenotype analysis, the CD8 compartment has been classified in detail not only by maturation stage but also activation status. The early activation phenotype in CD8 is defined by CD38 and HLA-DR expression [42]. Recently, an increase in the frequency of CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ cells in patients with COVID-19 disease and fatal outcomes has been confirmed [43,44]. In the present work, the severe group presented an increased frequency of CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ cells at admission. In terms of the functional status of CD8 cells, severe patients had an exhausted or immunosenescence phenotype [45]. We used CD27 and CD28 to identify a CD8 exhausted phenotype [29], and accordingly, a significant increase in the CD8⁺CD27[−]CD28[−] exhausted phenotype in the severe group was found.

This exhausted phenotype of CD8⁺ T cells was included in the predictive model to establish the risk of severe disease. Together with age, IL-6, ferritin, D-dimer, IgM, C4, absolute lymphocyte count, ILC type-3 count, and percentage of plasmablasts, Th1, memory Th1, Treg, CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺, non-classical monocytes, and CD3[−]CD56⁺CD16^{lo} NK cells, the predictive model showed an AUC of 78%. Several predictive models have been published based on demographic, biochemical, and immunological parameters [39,46–49]. The main prognostic factors were neutrophil and lymphocyte counts, whereas NK subsets and CD4 levels were only partially confirmed. Notably, other associated parameters with poor prognosis in COVID-19 patients such as SARS-CoV-2 viral load have been demonstrated [50]. A limitation of the study was the absence of the viral load or the cycle threshold (Ct) data in our model.

Easily measurable immune parameters, such as CD8⁺CD27[−]CD28[−] and non-classical monocytes, improve the predictive value of our model. However, the cross-sectional design is a limitation of the study, and further validation cohorts should be assessed to confirm the model's predictive capability.

Although our model was not developed to predict fatal outcomes, both innate and adaptive immune parameters could help determine the oxygen therapy requirement of 78% of the patients and could be helpful in improving the therapeutic management of the patients at admission.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9080917/s1: Table S1: Comparison of main lymphocyte subsets expressed as frequencies and absolute numbers in peripheral blood. Table S2: CD134 and CD25 expression after stimulation with N-, M-, and S-specific SARS-CoV-2 antigens.

Author Contributions: Conceptualization, M.L.-H. and M.C.F.; methodology, D.S.S., M.A.-P., and P.L.-P.; software, F.A.d.I.R.; visualization, F.A.d.I.R.; resources, F.A.d.I.R. and J.M.O.; formal analysis, J.I.-V. and A.C.-B.; data curation, D.S.S., P.L.-P., J.I.-V., and A.C.-B.; writing—original draft preparation, D.S.S., J.I.-V., and A.C.-B.; writing—review and editing, M.L.-H. and M.C.F.; supervision, M.L.-H. and M.C.F.; project administration, C.G.-R.; funding acquisition, M.L.-H. and M.C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the Cantabrian Government, grant number 2020UIC22-PUB-001, and by Instituto de Salud Carlos III, grant number COV20/00170.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Regional Ethics Committee (CEIm, internal code 2020.167, 14 May 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: We would like to acknowledge Mónica Renuncio-García, Elena González-López, María Gutiérrez-Larrañaga, Adriel Roa-Bautista, Sandra Guiral-Foz, María Iglesias-Escudero and David Merino-Fernández for sample processing, all affiliated to the Immunology Department. We also would like to acknowledge the whole team of health workers involved in the care and treatment of COVID-19 patients in the University Hospital Marqués de Valdecilla.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rodriguez-Morales, A.J.; Cardona-Ospina, J.A.; Gutiérrez-Ocampo, E.; Villamizar-Peña, R.; Holguin-Rivera, Y.; Escalera-Antezana, J.P.; Alvarado-Arnez, L.E.; Bonilla-Aldana, D.K.; Franco-Paredes, C.; Henao-Martinez, A.F.; et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* **2020**, *34*, 101623, doi:10.1016/j.tmaid.2020.101623.
- Cascella, M.; Rajnik, M.; Cuomo, A.; Dulebohn, S.C.; Di Napoli, R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus. *StatPearls* **2020**, *19*.
- Zhou, F.; Yu, T.; Du, R.; Fan, G.; Liu, Y.; Liu, Z.; Xiang, J.; Wang, Y.; Song, B.; Gu, X.; et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 1054–1062, doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
- Al Balushi, A.; AlShekaili, J.; Al Kindi, M.; Ansari, Z.; Al-Khabori, M.; Khamis, F.; Ambusaidi, Z.; Al Balushi, A.; Al Huraizi, A.; Al Sulaimi, S.; et al. Immunological predictors of disease severity in patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, doi:10.1016/j.ijid.2021.06.056.
- Davidescu, E.I.; Odajiu, I.; Tulbă, D.; Sandu, C.D.; Bunea, T.; Sandu, G.; Mureșanu, D.F.; Bălănescu, P.; Popescu, B.O. Prognostic Factors in COVID-19 Patients With New Neurological Manifestations: A Retrospective Cohort Study in a Romanian Neurology Department. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 252, doi:10.3389/fnagi.2021.645611.
- Az, A.; Sogut, O.; Akdemir, T.; Ergenc, H.; Dogan, Y.; Cakirca, M. Impacts of Demographic and Clinical Characteristics on Disease Severity and Mortality in Patients with Confirmed COVID-19. *Int. J. Gen. Med.* **2021**, *14*, 2989–3000, doi:10.2147/ijgm.s317350.
- Zhong, P.; Wang, Z.; Du, Z. Serum triglyceride levels and related factors as prognostic indicators in COVID-19 patients: A retrospective study. *Immunity Inflamm. Dis.* **2021**, iid3.469, doi:10.1002/iid3.469.
- Lok, J.; Gess, M. Liver dysfunction in COVID-19: A useful prognostic marker of severe disease? *Frontline Gastroenterol.* **2021**, *12*, 293–298, doi:10.1136/flgastro-2020-101689.
- McGonagle, D.; Sharif, K.; O'Regan, A.; Bridgewood, C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102537, doi:10.1016/j.autrev.2020.102537.
- Tan, L.; Wang, Q.; Zhang, D.; Ding, J.; Huang, Q.; Tang, Y.Q.; Wang, Q.; Miao, H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: A descriptive and predictive study. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 1–3, doi:10.1038/s41392-020-0148-4.
- Reusch, N.; De Domenico, E.; Bonaguro, L.; Schulte-Schrepping, J.; Baßler, K.; Schultze, J.L.; Aschenbrenner, A.C. Neutrophils in COVID-19. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 952, doi:10.3389/fimmu.2021.652470.
- Alvarez-Rodriguez, L.; Lopez-Hoyos, M.; Garcia-Unzueta, M.; Amado, J.A.; Cacho, P.M.; Martinez-Taboada, V.M. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *91*, 829–838, doi:10.1189/jlb.1011523.
- Grifoni, A.; Weiskopf, D.; Ramirez, S.I. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* **2020**, *181*, 1489–1501.e15, doi:10.1016/j.cell.2020.05.015.
- Hosmer, D.W., Jr.; Lemeshow, S.; X., S. Applied Logistic Regression. In *Applied Logistic Regression*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp. 89–151, ISBN 978-0-470-58247-3.
- Hilbe, J.M. Logistic regression models. In *Logistic Regression Models*; Chapman and Hall: London, UK, 2009; pp. 73–187, ISBN 9781138106710.
- Schultze, J.L.; Aschenbrenner, A.C. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* **2021**, *184*, 1671–1692, doi:10.1016/j.cell.2021.02.029.
- Yang, H.; Lyu, Y.; Hou, F. SARS-CoV-2 infection and the antiviral innate immune response. *J. Mol. Cell Biol.* **2021**, *12*, 963–967, doi:10.1093/jmcb/mjaa071.
- Mann, E.R.; Menon, M.; Knight, S.B.; Konkeli, J.E.; Jagger, C.; Shaw, T.N.; Krishnan, S.; Rattray, M.; Ustianowski, A.; Bakerly, N.D.; et al. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci. Immunol.* **2020**, *5*, doi:10.1126/sciimmunol.abd6197.
- Bolouri, H.; Speake, C.; Skibinski, D.; Long, S.A.; Hocking, A.M.; Campbell, D.J.; Hamerman, J.A.; Malhotra, U.; Buckner, J.H. The COVID-19 immune landscape is dynamically and reversibly correlated with disease severity. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, e143648, doi:10.1172/JCI143648.
- Totura, A.L.; Whitmore, A.; Agnihothram, S.; Schäfer, A.; Katze, M.G.; Heise, M.T.; Baric, R.S. Toll-like receptor 3 signaling via TRIF contributes to a protective innate immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *MBio* **2015**, *6*, 1–14, doi:10.1128/mBio.00638-15.

21. Hu, W.; Yen, Y.T.; Singh, S.; Kao, C.L.; Wu-Hsieh, B.A. SARS-CoV regulates immune function-related gene expression in human monocytic cells. *Viral Immunol.* **2012**, *25*, 277–288, doi:10.1089/vim.2011.0099.
22. Guan, W.; Ni, Z.; Hu, Y.; Liang, W.; Ou, C.; He, J.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.; Hui, D.S.C.; et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1708–1720, doi:10.1056/nejmoa2002032.
23. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
24. 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. *Cytom. Part A* **2020**, *97*, 340–343, doi:10.1002/cyto.a.24002.
25. Petrey, A.C.; Qeadan, F.; Middleton, E.A.; Pinchuk, I.V.; Campbell, R.A.; Beswick, E.J. Cytokine release syndrome in COVID-19: Innate immune, vascular, and platelet pathogenic factors differ in severity of disease and sex. *J. Leukoc. Biol.* **2021**, *109*, 55–66, doi:10.1002/JLB.3COVA0820-410RRR.
26. Webb, B.J.; Peltan, I.D.; Jensen, P.; Hoda, D.; Hunter, B.; Silver, A.; Starr, N.; Buckel, W.; Grisel, N.; Hummel, E.; et al. Clinical criteria for COVID-19-associated hyperinflammatory syndrome: A cohort study. *Lancet Rheumatol* **2020**, *2*, 754–763, doi:10.1016/S2665-9913(20)30343-X.
27. Manson, J.J.; Crooks, C.; Naja, M.; Ledlie, A.; Goulden, B.; Liddle, T.; Khan, E.; Mehta, P.; Martin-Gutierrez, L.; Waddington, K.E.; et al. COVID-19-associated hyperinflammation and escalation of patient care: A retrospective longitudinal cohort study. *Lancet Rheumatol.* **2020**, *2*, e594–e602, doi:10.1016/S2665-9913(20)30275-7.
28. Mathew, D.; Giles, J.R.; Baxter, A.E.; Oldridge, D.A.; Greenplate, A.R.; Wu, J.E.; Alanio, C.; Kuri-Cervantes, L.; Pampena, M.B.; D’Andrea, K.; et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* **2020**, *369*, doi:10.1126/SCIENCE.ABC8511.
29. De Biasi, S.; Meschiari, M.; Gibellini, L.; Bellinazzi, C.; Borella, R.; Fidanza, L.; Gozzi, L.; Iannone, A.; Lo Tartaro, D.; Mattioli, M.; et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–17, doi:10.1038/s41467-020-17292-4.
30. Schulte-Schrepping, J.; Reusch, N.; Paclik, D.; Baßler, K.; Schlickeiser, S.; Zhang, B.; Krämer, B.; Krammer, T.; Brumhard, S.; Bonaguro, L.; et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* **2020**, *182*, 1419–1440.e23, doi:10.1016/j.cell.2020.08.001.
31. Chevrier, S.; Zurbuchen, Y.; Cervia, C.; Adamo, S.; Raeber, M.E.; de Souza, N.; Sivapatham, S.; Jacobs, A.; Bachli, E.; Rudiger, A.; et al. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell Rep. Med.* **2021**, *2*, 100166, doi:10.1016/j.xcrm.2020.100166.
32. Narasimhan, P.B.; Marcovecchio, P.; Hamers, A.A.J.; Hedrick, C.C. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2019**, *37*, 439–456, doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053119.
33. Cros, J.; Cagnard, N.; Woollard, K.; Patey, N.; Zhang, S.Y.; Senechal, B.; Puel, A.; Biswas, S.K.; Moshous, D.; Picard, C.; et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **2010**, *33*, 375–386, doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012.
34. Silverstein, N.J.; Wang, Y.; Manickas-Hill, Z.; Carbone, C.C.; Dauphin, A.; Li, J.Z.; Walker, B.D.; Yu, X.G.; Luban, J. Innate lymphoid cells and disease tolerance in SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* **2021**, doi:10.1101/2021.01.14.21249839.
35. García, M.; Kokkinou, E.; Carrasco García, A.; Parrot, T.; Palma Medina, L.M.; Maleki, K.T.; Christ, W.; Varnaitè, R.; Filipovic, I.; Junggren, H.G.; et al. Innate lymphoid cell composition associates with COVID-19 disease severity. *Clin. Transl. Immunol.* **2020**, *9*, e1224, doi:10.1002/cti2.1224.
36. 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.* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41419-019-1540-2.
37. Van Der Made, C.I.; Simons, A.; Schuurs-Hoeijmakers, J.; Van Den Heuvel, G.; Mantere, T.; Kersten, S.; Van Deuren, R.C.; Steehouwer, M.; Van Reijmersdal, S.V.; Jaeger, M.; et al. Presence of Genetic Variants among Young Men with Severe COVID-19. *JAMA—J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *324*, 663–673, doi:10.1001/jama.2020.13719.
38. Meckiff, B.J.; Ramírez-Suástegui, C.; Fajardo, V.; Chee, S.J.; Kusnadi, A.; Simon, H.; Eschweiler, S.; Grifoni, A.; Pelosi, E.; Weiskopf, D.; et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell* **2020**, *183*, 1340–1353.e16, doi:10.1016/j.cell.2020.10.001.
39. Li, M.; Guo, W.; Dong, Y.; Wang, X.; Dai, D.; Liu, X.; Wu, Y.; Li, M.; Zhang, W.; Zhou, H.; et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.580237.
40. Gutiérrez-Bautista, J.F.; Rodríguez-Nicolas, A.; Rosales-Castillo, A.; Jiménez, P.; Garrido, F.; Anderson, P.; Ruiz-Cabello, F.; López-Ruz, M.Á. Negative Clinical Evolution in COVID-19 Patients Is Frequently Accompanied With an Increased Proportion of Undifferentiated Th Cells and a Strong Underrepresentation of the Th1 Subset. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.596553.
41. Gil-Etayo, F.J.; Suárez-Fernández, P.; Cabrera-Marante, O.; Arroyo, D.; Garcinuño, S.; Naranjo, L.; Pleguezuelo, D.E.; Allende, L.M.; Mancebo, E.; Lalueza, A.; et al. T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fcimb.2021.624483.

42. Schwenk, R.; Banania, G.; Epstein, J.; Kim, Y.; Peters, B.; Belmonte, M.; Ganeshan, H.; Huang, J.; Reyes, S.; Stryhn, A.; et al. Ex vivo tetramer staining and cell surface phenotyping for early activation markers CD38 and HLA-DR to enumerate and characterize malaria antigen-specific CD8⁺ T-cells induced in human volunteers immunized with a Plasmodium falciparum adenovirus-vectored malaria vaccine expressing AMA1. *Malar. J.* **2013**, *12*, doi:10.1186/1475-2875-12-376.
43. 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.* **2021**, *182*, 254–262, doi:10.1159/000514202.
44. Bobcakova, A.; Petriskova, J.; Vysehradsky, R.; Kocan, I.; Kapustova, L.; Barnova, M.; Diamant, Z.; Jesenak, M. Immune Profile in Patients With COVID-19: Lymphocytes Exhaustion Markers in Relationship to Clinical Outcome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fcimb.2021.646688.
45. Yaqinuddin, A.; Kashir, J. Innate immunity in COVID-19 patients mediated by NKG2A receptors, and potential treatment using Monalizumab, Chloroquine, and antiviral agents. *Med. Hypotheses* **2020**, *140*, doi:10.1016/j.mehy.2020.109777.
46. Qin, Z.J.; Liu, L.; Sun, Q.; Li, X.; Luo, J.F.; Liu, J.S.; Liu, D. Impaired immune and coagulation systems may be early risk factors for COVID-19 patients: A retrospective study of 118 inpatients from Wuhan, China. *Med. (Baltim.)* **2020**, *99*, e21700, doi:10.1097/MD.00000000000021700.
47. Gupta, R.K.; Marks, M.; Samuels, T.H.A.; Luintel, A.; Rampling, T.; Chowdhury, H.; Quartagno, M.; Nair, A.; Lipman, M.; Abubakar, I.; et al. Systematic evaluation and external validation of 22 prognostic models among hospitalised adults with COVID-19: An observational cohort study. *Eur. Respir. J.* **2020**, *56*, doi:10.1183/13993003.03498-2020.
48. Fan, X.; Zhu, B.; Nouri-Vaskeh, M.; Jiang, C.; Feng, X.; Poulsen, K.; Baradaran, B.; Fang, J.; Ade, E.A.; Sharifi, A.; et al. Scores based on neutrophil percentage and lactate dehydrogenase with or without oxygen saturation predict hospital mortality risk in severe COVID-19 patients. *Viol. J.* **2021**, *18*, doi:10.1186/s12985-021-01538-8.
49. Martín, M.C.; Jurado, A.; Abad-Molina, C.; Orduña, A.; Yarcce, O.; Navas, A.M.; Cunill, V.; Escobar, D.; Boix, F.; Burillo-Sanz, S.; et al. The age again in the eye of the COVID-19 storm: Evidence-based decision making. *Immun. Ageing* **2021**, *18*, 24, doi:10.1186/s12979-021-00237-w.
50. Rao, S.N.; Manissero, D.; Steele, V.R.; Pareja, J. Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect. Dis. Ther.* **2020**, *9*, 573–586, doi:10.1007/s40121-020-00324-3.

Article

COVID-19 mRNA Based Vaccine Immune-Response Assessment in Nursing Home Residents for Public Health Decision

David San Segundo ^{1,2} , Alejandra Comins-Boo ¹ , Patricia Lamadrid-Perojo ² , Juan Irure-Ventura ^{1,2} , José María Castillo-Otí ^{3,4,5} , Reinhard Wallman ⁶, Jorge Calvo-Montes ^{7,8} , José Manuel Méndez-Legaza ^{7,8} , Carmela Baamonde-Calzada ⁹, Isabel Sánchez-Molina ¹⁰, Marina Lecue-Martínez ³, Silvia Ventisca-Pérez ³, Ana Batlle-López ^{11,12,13} and Marcos López Hoyos ^{1,2,14,*} 

- ¹ Immunology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; david.sansegundo@scsalud.es (D.S.S.); alejandra.comins@scsalud.es (A.C.-B.); juan.irure@scsalud.es (J.I.-V.)
- ² Transplantation and Autoimmunity Laboratory, Research Institute “Marqués de Valdecilla” (IDIVAL), 39008 Santander, Spain; plamadrid@idival.org
- ³ Epidemiological Monitoring and Intervention Unit of Lieres Hospital, 39120 Piélagos, Spain; josemaria.castillo@scsalud.es (J.M.C.-O.); marina.lecue@scsalud.es (M.L.-M.); silvia.ventisca@scsalud.es (S.V.-P.)
- ⁴ Comunitary Health Group Research Institute “Marqués de Valdecilla” (IDIVAL), 39008 Santander, Spain
- ⁵ Nursing Department, School of Nursing, University of Cantabria, 39008 Santander, Spain
- ⁶ Department of Public Health, Cantabrian Government, 39008 Cantabria, Spain; reinhard.wallmann@scsalud.es
- ⁷ Microbiology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; jorge.calvo@scsalud.es (J.C.-M.); josemanuel.mendez@scsalud.es (J.M.M.-L.)
- ⁸ Epidemiology and Molecular and Pathogenic Mechanisms of Infectious Diseases and Clinical Microbiology Group Research Institute “Marqués de Valdecilla” (IDIVAL), 39008 Santander, Spain
- ⁹ Clinical Analysis Department, Sierrallana Hospital, 39300 Torrelavega, Spain; carmel.baamonde@scsalud.es
- ¹⁰ Clinical Analysis Department, Laredo Hospital, 39770 Laredo, Spain; isabel.sanchez-molina@scsalud.es
- ¹¹ Haematology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain; mana.batlle@scsalud.es
- ¹² Haematologic Neoplasms and Haematopoietic Stem Cells Transplantation, IDIVAL, 39008 Santander, Spain
- ¹³ Laboratory Informatic Management System Coordinator (LISCAN), Servicio Cantabro de Salud (SCS), Consejería de Sanidad, 39008 Cantabria, Spain
- ¹⁴ Molecular Biology Department, University of Cantabria, 39011 Santander, Spain
- * Correspondence: marcos.lopez@scsalud.es



Citation: San Segundo, D.; Comins-Boo, A.; Lamadrid-Perojo, P.; Irure-Ventura, J.; Castillo-Otí, J.M.; Wallman, R.; Calvo-Montes, J.; Méndez-Legaza, J.M.; Baamonde-Calzada, C.; Sánchez-Molina, I.; et al. COVID-19 mRNA Based Vaccine Immune-Response Assessment in Nursing Home Residents for Public Health Decision. *Vaccines* **2021**, *9*, 1429. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121429>

Academic Editor: Ger Rijkers

Received: 31 October 2021

Accepted: 29 November 2021

Published: 2 December 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nursing home residents (NHR) have been targeted as a vaccination priority due to their higher risk of worse outcome after COVID-19 infection. The mRNA-based vaccine BTN2b2 was first approved in Europe for NHRs. The assessment of the specific vaccine immune response (both humoral and cellular) at long term in NHRs has not been addressed yet. A representative sample of 624 NHR subjects in Northern region of Spain was studied to assess immune response against full vaccination with BTN2b2. The anti-S1 antibody levels and specific T cells were measured at two and six months after vaccination. 24.4% of NHR had a previous infection prior to vaccination. The remaining NHR were included in the full vaccination assessment group (FVA). After two months, a 94.9% of the FVA presented anti-S1 antibodies, whereas those seronegative without specific cellular response were 2.54%. At long-term, the frequency of NHR within the FVA group with anti-S1 antibodies at six months were 88.12% and the seronegative subjects without specific cellular response was 8.07%. The cellular immune assays complement the humoral test in the immune vaccine response assessment. Therefore, the cellular immune assessment in NHRs allows for the fine tuning of those seronegative subjects with potential competent immune responses against the vaccine.

Keywords: mRNA vaccine; SARS-CoV-2; cellular-immune response; nursing home residents; public health

1. Introduction

The Nursing home residences have been sensitive locations where the SARS-CoV-2 (COVID-19) virus has spread rapidly [1]. The subjects with worse prognosis and higher risk of mortality were those with associated comorbidities and the elderly, this latter group being a priority in the vaccination strategies [2]. However, the different vaccination rates within different groups as students [3] and NHRs [4] could compromise the vaccination success. The vaccination against SARS-CoV-2 with BNT162b2 is safe and effective, conferring a 95% protection against COVID-19 in subjects over 16 years old [5], and reducing hospitalization and mortality.

New SARS-CoV-2 variants have emerged and, despite vaccination, virus isolations in nursing home residences have been detected. Thus, despite vaccination, susceptible subjects should be identified early in order to proceed with new strategies of prevention and immunization. Strategies for public health control have been proposed, such as a third vaccine dose, despite evidence that the two dose strategy continues to be most effective against variants of concern. However, no deep immunological studies have been addressed in order to identify those fully vaccinated elderly subjects at risk of infection. The aim of this strategy is to identify low responders within patients with impaired immunities such as immunodeficiency, autoimmunity, cancer, transplantation or immunosenescence. The most precise way to measure immunological response to vaccination would include both cellular and humoral specific responses. Recently, the utility of both cellular and humoral immunity assessment to identify low responders within kidney [6], liver and heart transplant recipients [7], in addition to hematologic malignancies [8], autoimmunity [9] and the elderly [10] has been demonstrated.

The assessment of humoral immune response after the BNT162b2 vaccine in NHR has been recently published [11]. This group observed 30% of low post-vaccine anti S-RBD antibody levels, and importantly 3% of NHR remained seronegative after six weeks of the second shot. However, neither data about cellular immunity nor risk evaluation for symptomatic COVID-19 was performed. As far as we know, no studies of both humoral and cellular immune responses to the SARS-CoV-2 virus vaccine in NHRs have been previously addressed.

In this study, to detect a possible break in the protection from vaccination, we performed early and medium-term assessments of specific BNT162b2 vaccine immune responses (including both humoral and cellular immunity) in NHR. Moreover, a risk assessment of positive PCR post-vaccination (PPPV) was evaluated. The detection of fully vaccinated NHRs without humoral and cellular response could further suggest the need to boost vaccine dose to enhance immune response.

2. Materials and Methods

2.1. Data Collection

Nursing home residents (NHR) in the Cantabrian region (North of Spain) were vaccinated following both the public health recommendations and European guidelines [12] from January 2021 to March 2021. The total NHRs at the moment of the study in the Cantabrian region were 6598 subjects. The sample size was calculated to estimate 85% of the population with a confidence interval of 95% and an accuracy of $\pm 3\%$. A total of 641 subjects were enrolled in the study, but 17 subjects were not feasible to get samples. Finally, the early assessment of immune vaccine response was conducted in a sample of 624 residents selected for the study, covering all residents in the region (57 nursing home residences), and all the subjects received two doses of the BNT162b2 vaccine. Further long-term assessments after six months of vaccination was performed in a subgroup of 558 NHR. The study design is summarized in Figure 1. The sample size was chosen by simple random sampling from among the total NHR population.

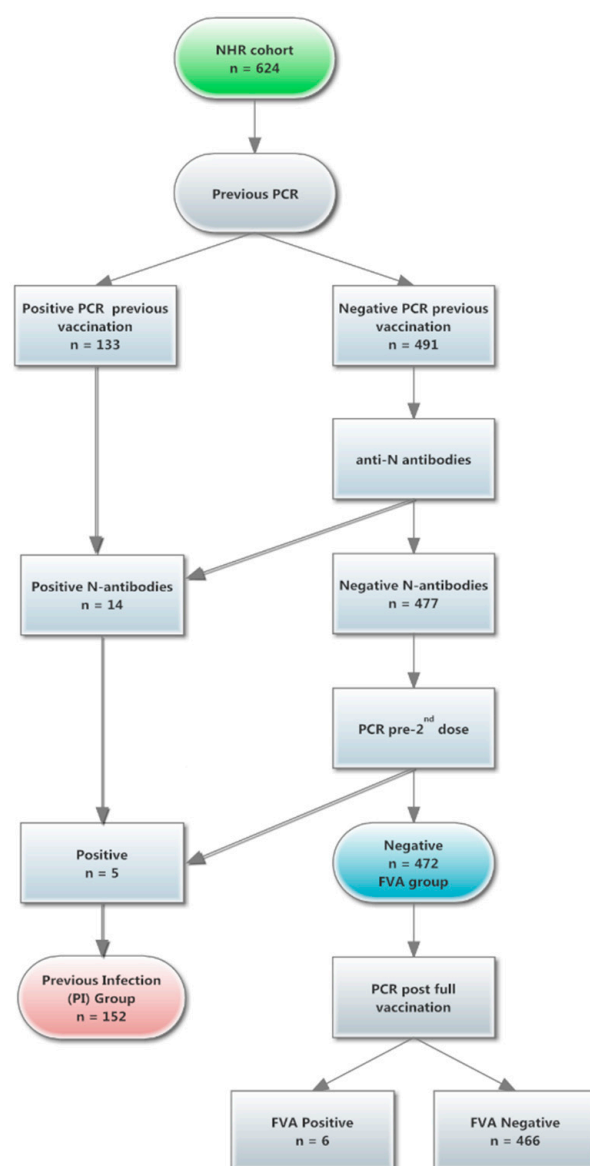


Figure 1. Study design. A total of 624 nursing home residents (NHR) were eligible for the study. Two different groups were defined: previous infection (PI) and full vaccination assessment (FVA).

Sequential real time PCR was performed every two weeks after full vaccination to monitor potential infections. Moreover, in those patients with suspicion of infection or close contact a PCR or antigen test was performed; in the case of negative results, a further PCR test was undertaken.

Our Unified Laboratory Management System in Cantabria (LISCAN) integrated with a nursery home platform (GES CARE) and a unified citation system (TICARES) were instrumental to determine in real time the appropriate diagnostic path to be followed for each patient.

2.2. SARS-CoV-2 Anti-S Antibodies Detection

Serum samples were evaluated after two and six months of complete BNT162b2 for the detection of anti-SARS-CoV-2 S1 (RBD) protein-targeting (anti-S1) and specific anti-N IgG antibodies by chemiluminescent microparticle immunoassay (CLIA) using the SARS-CoV-2 IgG II Quant Assay on the Alinity I (Abbott, Chicago, IL, USA) following the manufacturer's indications. Results were expressed as arbitrary units (AU) per mL (AU/mL). Values higher than 50 AU/mL for anti-S1 and higher than 1.5 AU/mL for anti-N were considered positive.

2.3. SARS-CoV-2 T-Specific Response Assessment by Flow Cytometry

The specific cellular immune response against vaccination was assessed as previously described [13]. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from sodium-heparinized blood were isolated by Ficoll gradient and cultured at 10^6 /mL in TexMACS medium (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany) during 24 h at 37 °C in a flat-bottom 96-well plate in 0.1% DMSO, PepTivator SARS-CoV-2 Prot S, Prot M and Prot N (1 ug/mL) and Dynabeads Human T activator CD3/CD28 (GibcoThermo Fisher Scientific Baltics UAB, Lithuania) as a positive control. After incubation, the PBMCs were washed and stained with the following monoclonal antibodies: anti-CD3 (FITC) clone UCHT 1 (Immunotech SAS Beckman Coulter, Marseille, France), anti-CD4 (APC-Vio 770) clone VIT4 (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany), anti-CD8 (ECD) clone SFCI21Thy2D3 (Beckman Coulter, 737659, Brea, CA, USA), anti-CD134 (PE) clone 134-1 (Cytognos, Salamanca, Spain), and anti-CD25 (PE-Cy7) clone 2A3. The stained PBMCs samples were washed with phosphate buffer saline (PBS) 150 µL and centrifuged for five minutes at 1800 rpm. Finally, 2 µL of 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) staining solution (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA) and 90 µL of PBS were added before the samples were acquired on the CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter). The results were expressed as the frequency in the activation induced molecules (CD25⁺CD134⁺) ratio obtained after specific activation to negative non-stimulated control. A ratio > 3 in one of the specific SARS-CoV-2 peptides was considered positive as previously described [13], and representative examples are summarized in Figure S1.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0 (Chicago, IL, USA) and Graph Pad Prism (software 6.0 version). The distribution of continuous variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk tests. Comparisons were based on U-Mann Whitney and the Student's t test, as corresponded. Results were expressed as median (interquartile range, (IQR) or mean $\pm$ standard deviation, as appropriate. Receiver operation characteristic (ROC) analysis was performed to calculate the cutoff value of anti S-RBD levels after vaccination to better discriminate the risk of PPPV. A two-sided *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. NHR Participants

The mean age of the NHR cohort was 80.56 years (standard deviation, SD, 13.51), of which 67.6% were female. All residents were fully vaccinated with the BNT162b2 vaccine between January and March 2021. The second dose was administered three weeks after the first dose, independently of previous COVID-19 infection.

The NHR cohort was divided into two groups in order to assess the sensitization status (Figure 1). First was the previous COVID19 infection (PI) group, which included a total of 152 subjects, and 133 of them had positive PCRs before administration of the first vaccine dose. Five were PCR positive between the first and the second dose. In this group, we have also included 14 residents who presented detectable anti-N antibodies as a marker of prior infection.

Secondly, the remaining subjects (*n* = 472) without previous infection were included in the full vaccine assessment (FVA) group. From this group, a total of 17 residents had a positive PCR (FVA+), two early (median 89 days) and 15 late (at six months, median 209 days) after second dose. Twelve out of 17 (70.6%) subjects from the FVA+ group were asymptomatic, whereas five subjects with symptoms required hospitalization (1.06% of the FVA group), and one of them died without a clear association with COVID-19 disease (non-compatible radiologic signs).

3.2. Early Assessment of Quantitative Humoral Vaccine Response in NHR Cohort

To assess the vaccine response in NHR, the level of anti-S1 antibodies was measured. A wide range of detection was observed (<50 to >40,000 AU/mL) in the NHR cohort. An increased level of anti-S1 antibodies in PI group compared with FVA group (median, (IQR): 19,669 (8534–40,000) vs 1611 (570.9–4219), respectively ($p < 0.001$) was observed after two months of vaccination (Figure 2).

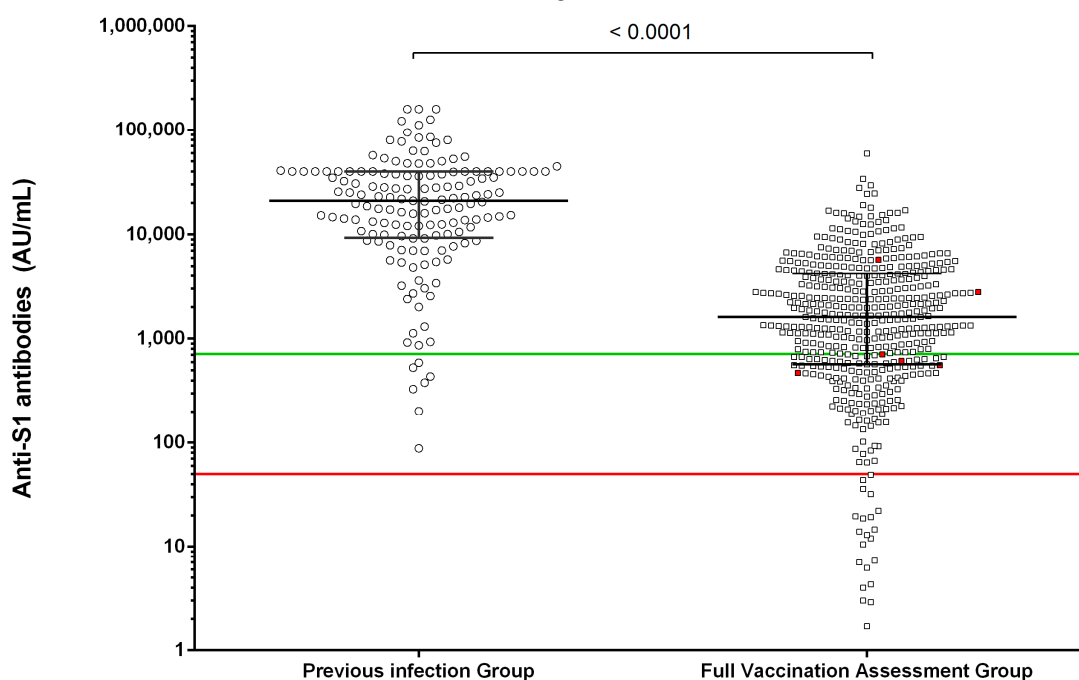


Figure 2. Comparison of anti-S1 antibody levels after two months of BNT162b2 full vaccination in nursing home residents (NHR). The anti-S1 antibody level in the previous infection group (white circles) and full vaccination assessment group (white squares) is depicted. The anti-S1 levels below the red line at 50 AU/mL indicates those NHR identified as seronegative after full vaccination. Whereas a value below 715 AU/mL of anti-S1 antibody level (green line) after two months of vaccination shows patients at risk of infection (red squares). The mean differences were assessed by Student's *t*-test.

To fully characterize the anti-S1 antibody level, different groups were defined based in anti-S1 levels as previously described [9] in seronegative: <50; low responders: 50–1050; moderate: 1050–4160; and high responders: >4160 AU/mL. The PI group demonstrated higher levels since the frequency of anti-S1 antibody levels in each group was = 0%; 6.25%; 4.86% and 88.89% respectively, whereas in the FVA group it was = 4.80%; 32.78%; 36.32% and 26.10%, respectively (Chi square test, $p < 0.001$).

Subsequently, to assess the potential risk of infection post-vaccination, the analysis of anti-S1 antibody levels was addressed in the FVA group. The median (IQR) of anti-S1 antibody levels in the FVA+ group was decreased compared with the FVA- group (662 (536–3515) vs 1611 (570.9–4219), $p = \text{NS}$). However, after ROC analysis a value of 715 AU/mL identified those patients with risk of infection after vaccination (with a 70.5% and 66.7%, sensitivity and specificity, respectively), the hazard ratio of 1.023 (0.993–1.054), $p = 0.069$ (Figure 2).

3.3. Early Evaluation of Immunization Status in NHR

All NHR were fully vaccinated despite previous COVID-19 contact. The assessment of humoral response was performed two months after the second dose. A total of 600 NHR out of 624 had anti-S1 antibodies, reflecting a specific response against SARS-CoV-2 and/or vaccination in 96.2% of the NHR cohort. The remaining 24 patients (3.8%) had neither anti-S1 nor anti-N antibodies after full dose vaccination.

The level of anti-S1 antibodies was significantly higher in the PI group with respect to the FVA (Figure 2), and to eliminate the potential bias of a previous contact with the virus and to perform a strict vaccine assessment, only the FVA group was further investigated.

Twenty-four subjects of the FVA group (24/472, 5.08%) did not show specific antibody response, neither anti-S1 antibodies nor anti-N antibodies after two months of full vaccination. In these seronegative residents, a specific CD4+ T cell immune test was performed to assess the vaccine response. Twelve out of twenty-four (50%) did not show any specific cellular immune response (complete non-responders) against the SARS-CoV-2 peptide pool (anti-S, anti-M or anti-N). The clinical parameters of these early non-responders are summarized in Table S1. Overall, the vaccine responders (anti-S1 antibodies and/or specific cellular immune test) within the FVA group were 97.42%.

To assess the potential utility of cellular specific immunity against SARS-CoV-2 in order to identify break of protection of vaccine in seronegative subjects, the risk of infection should be assessed within complete non-responders' subjects. In our cohort, none of the non-responders within the FVA group had a positive PCR after vaccination (Figure 2).

3.4. Immunization Status in NHR at 6 Months after Full Vaccination

Finally, in order to investigate the degree of immunization in fully vaccinated NHR, a subgroup of the initial cohort ($N = 558$) was tested for anti-S1 antibodies. A total of 137/558 were of the PI group, the remaining 421 were in FVA group. Fifty out of 421 FVA (11.88%) NHR were seronegative at six months of vaccination, 16 of them were also seronegative at two months of vaccination. In 17 out of the remaining 34 NHR who become seronegative, a specific cellular immunity was maintained (50.0%) at six months post vaccination. In Figure 3a, the level of anti-S1 antibodies after two and six months of vaccination are shown. Those NHR seronegative in each timepoint were tested for specific cellular immunity to fully investigate specific immune response against the SARS-CoV-2. Full negative specific immune response to the coronavirus peptides was observed in 12/624 (1.92%) and 33/558 (5.91%) of the NHR cohort at two and six months, respectively (Figure 3b). Considering only those included in the FVA group, the frequencies of subjects without vaccination response were 12/472 (2.54%) and 34/421 (8.07%) at two and six months, respectively. The clinical parameters NHR seronegative at 6 months are summarized in Table S2.

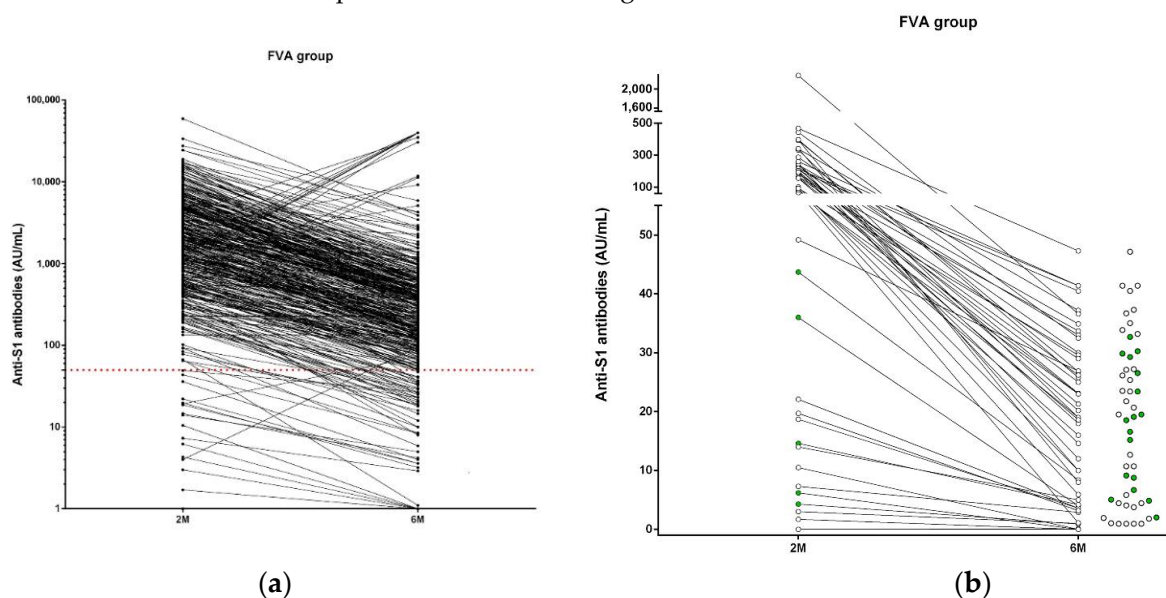


Figure 3. Comparison of anti-S1 antibody levels and cellular immunity after two and six months of BNT162b2 full vaccination in nursing home residents (NHR) included in Full Vaccination Assessment (FVA) group. The level of anti-S1 antibodies was compared in NHR at two and six months after full vaccination in the FVA group. The red line shows the anti-S1 levels at 50 AU/mL, subjects with anti-S1 values below this line were identified as seronegative (a). All seronegative NHR after six months of vaccination were assessed for cellular immunity; the green circles show positive specific cellular immunity whereas the white circles show those without a cellular-specific response to vaccination (b).

4. Discussion

The NHR subjects have been especially vulnerable to COVID-19. Public health authorities have to design strategies to protect them [12]. With the approval of a vaccine, the NHR were the first group to get vaccinated. However, different strategies were carried out in different countries. In the UK a single dose was established to reach higher numbers of vaccination in less time. Recently, the humoral and cellular immune response to a single dose of BNT162b2 in residential care homes showed delayed antibody responses in those infection-naïve residents, suggesting that giving a second dose early would be required [14].

In our cohort, 22% of NHR had previous contact with the COVID-19 virus. Due to natural immunity, the boost after mRNA vaccination increased anti-S1 antibody levels as previously described [11]. Individuals with previous contact before vaccination had increased levels of anti-S1 antibodies after full dose BNT162b2 vaccination [15]. In our cohort of NHR we have corroborated these data, despite the difference in the mean age of the subjects (80 years in the present study vs 41.89 [15]). This is in line with the generation of the hybrid immunity [16].

Moreover, the anti-S1 antibody levels maintained increased in the PI group after 6 months of vaccination (data not-shown). Another work studying the immune response after a single dose of BNT162b2 in elderly subjects showed a humoral response in 93% at 5–6 weeks of vaccination [17]. All the subjects in our NHR cohort were vaccinated following the FDA and EMA recommendations, and after two-doses a total of 96.16% NHR had humoral response.

However, not all the antibodies are equal. The neutralizing antibodies have been described as involved in minimizing virus infection [18]. It has been previously demonstrated humoral response after vaccination with BNT162b2 [19]. A limitation of the present study is the lack of neutralization assay. Nevertheless, an indirect approach suggests an association between antibody levels and capability to neutralize [20,21], where a value of 4160 AU was identified as a neutralizing capability.

In the work of Blain et al [11], no assessment of post vaccination risk infection was performed. Here, the subjects with antibody levels at 2 months of vaccination lower than 715 AU/mL showed a higher risk of positive PCR after vaccination. This level of anti-S1 antibody would correspond to the low-responder group. Nevertheless, the measurement of humoral immunity alone could be limited since a specific T cell response has to be elicited before humoral immunity.

In our cohort, only 17 subjects were positive PCR after full vaccination, with a total of 1.06% hospitalizations. These results confirm the reduction of infections, hospitalizations and deaths described in full-vaccinated subjects [22].

The study of specific T cell response could identify patients who developed immunity against the vaccine despite the lack of serologic level of IgG antibodies [6–10]. The assessment of both humoral and cellular immune response after vaccination has allowed establishing groups of patients with an impaired immune system regarding the ability to respond to the vaccine. Therefore, no responders could be at risk of infection. Moreover, in the elderly, the immune response to vaccination is heterogeneous [10] and, given that the NHR population is elderly for the most part, it makes this group of particular interest to study the immune response globally. This approach (study of cellular and humoral response to the vaccine in NHR) is the one that has been taken into account in the present study to identify non-responding NHRs. We considered that those with anti-S1 IgG antibodies already had specific T cell immunity necessary to produce IgG switching in the germinal center, and only those seronegative for anti-S1 IgG were further studied for specific CD4+ T cells response. Here we describe how the NHR without previous contact before vaccination with total immunity reaches 97.42%. In this study, we cannot confirm the utility of the specific cellular assessment as a tool for identifying NHR at risk of infection after vaccination since there were no significant differences in COVID-19 incidence between cellular responders and non-responders. Another limitation of the study was the lack of a

cellular test in those subjects with less than 715 AU/mL. This cutoff value was set after statistical analysis but testing of cellular function was not performed during the study since we only considered the value established by routine laboratory at 50 AU/mL.

5. Conclusions

After 6 months of full vaccination, 11.88% of NHR subjects were seronegative, however, 34.0% of them retained a detectable specific cellular immune response. In summary, a total of 94.09% of NHR maintained a detectable immune response after six months of vaccination. Moreover, the specific cellular immune assessment could potentially be used as a second-line tool to test the vaccine immune response in those subjects without humoral response.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines9121429/s1>, Figure S1: SARS-CoV-2 specific T cell assessment, Table S1: Demographic and clinical records of the non-S1 antibodies (seronegative) subjects at 2 months after full vaccination. Table S2: Demographic and clinical records of the non-S1 antibodies subjects after 6 months after full vaccination.

Author Contributions: Conceptualization, R.W., J.C.-M., A.B.-L. and M.L.H.; Data curation, D.S.S., A.C.-B., P.L.-P., J.I.-V., J.M.C.-O. and J.M.M.-L.; Formal analysis, D.S.S., A.C.-B., P.L.-P., J.I.-V., J.M.C.-O., J.M.M.-L., C.B.-C., I.S.-M., M.L.-M. and S.V.-P.; Funding acquisition, M.L.H.; Investigation, A.B.-L.; Methodology, D.S.S., A.C.-B., P.L.-P., J.I.-V., J.M.C.-O., C.B.-C., I.S.-M., M.L.-M., S.V.-P. and A.B.-L.; Project administration, M.L.H.; Software, A.B.-L.; Supervision, R.W., J.C.-M. and M.L.H.; Validation, D.S.S., J.I.-V., C.B.-C., I.S.-M., M.L.-M. and S.V.-P.; Visualization, A.C.-B. and J.M.C.-O.; Writing—original draft, D.S.S., A.C.-B. and J.I.-V.; Writing—review & editing, M.L.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially supported by grant from Cantabrian Government #2020 UIC22-PUB-0019 (to M.L.H.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Cantabria (CEIC). internal code 2020–167.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bagchi, S.; Mak, J.; Li, Q.; Sheriff, E.; Mungai, E.; Anttila, A.; Soe, M.M.; Edwards, J.R.; Benin, A.L.; Pollock, D.A.; et al. Rates of COVID-19 Among Residents and Staff Members in Nursing Homes—United States, May 25–November 22, 2020. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 52–55. [\[CrossRef\]](#)
2. Dooling, K.; McClung, N.; Chamberland, M.; Marin, M.; Wallace, M.; Bell, B.P.; Lee, G.M.; Talbot, H.K.; Romero, J.R.; Oliver, S.E. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Allocating Initial Supplies of COVID-19 Vaccine—United States, 2020. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2020**, *69*, 1857–1859. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Gallè, F.; Sabella, E.A.; Roma, P.; De Giglio, O.; Caggiano, G.; Tafuri, S.; Da Molin, G.; Ferracuti, S.; Montagna, M.T.; Liguori, G.; et al. Knowledge and acceptance of COVID-19 vaccination among undergraduate students from central and southern Italy. *Vaccines* **2021**, *9*, 638. [\[CrossRef\]](#)
4. Feifer, R.A.; Bethea, L.S.; White, E.M. Racial Disparities in COVID-19 Vaccine Acceptance: Building Trust to Protect Nursing Home Staff and Residents. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2021**, *22*, 1853–1855.e1. [\[CrossRef\]](#)
5. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [\[CrossRef\]](#)
6. Cucchiari, D.; Egri, N.; Bodro, M.; Herrera, S.; Del Risco-Zevallos, J.; Casals-Urquiza, J.; Cofan, F.; Moreno, A.; Rovira, J.; Banon-Maneus, E.; et al. Cellular and humoral response after mRNA–1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2021**, *21*, 2727–2739. [\[CrossRef\]](#)

7. Herrera, S.; Colmenero, J.; Pascal, M.; Escobedo, M.; Castel, M.A.; Sole-González, E.; Palou, E.; Egri, N.; Ruiz, P.; Mosquera, M.; et al. Cellular and humoral immune response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in liver and heart transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Malard, F.; Gaugler, B.; Gozlan, J.; Bouquet, L.; Fofana, D.; Siblany, L.; Eshagh, D.; Adotevi, O.; Laheurte, C.; Ricard, L.; et al. Weak immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Cancer J.* **2021**, *11*. [\[CrossRef\]](#)
9. Malipiero, G.; Moratto, A.; Infantino, M.; D'Agaro, P.; Piscianz, E.; Manfredi, M.; Grossi, V.; Benvenuti, E.; Bulgaresi, M.; Benucci, M.; et al. Assessment of humoral and cellular immunity induced by the BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccine in healthcare workers, elderly people, and immunosuppressed patients with autoimmune disease. *Immunol. Res.* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Collier, D.A.; Ferreira, I.A.T.M.; Kotagiri, P.; Datir, R.P.; Lim, E.Y.; Touizer, E.; Meng, B.; Abdullahi, A.; Baker, S.; Dougan, G.; et al. Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature* **2021**, *596*, 417–422. [\[CrossRef\]](#)
11. Blain, H.; Tuaillon, E.; Gamon, L.; Pisoni, A.; Miot, S.; Rolland, Y.; Picot, M.C.; Bousquet, J. Antibody response after one and two jabs of the BNT162b2 vaccine in nursing home residents: The CONsort-19 study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
12. Blain, H.; Rolland, Y.; Schols, J.M.G.A.; Cherubini, A.; Miot, S.; O'Neill, D.; Martin, F.C.; Guérin, O.; Gavazzi, G.; Bousquet, J.; et al. August 2020 Interim EuGMS guidance to prepare European Long-Term Care Facilities for COVID-19. *Eur. Geriatr. Med.* **2020**, *11*, 899–913. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Segundo, D.S.; Comins-Boo, A.; Irure-Ventura, J.; Renuncio-García, M.; Roa-Bautista, A.; González-López, E.; Merino-Fernández, D.; Lamadrid-Perojo, P.; Alonso-Peña, M.; Ocejó-Vinyals, J.G.; et al. Immune assessment of BNT162b2 m-RNA-spike based vaccine response in adults. *Biomedicines* **2021**, *9*, 868. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Tut, G.; Lancaster, T.; Krutikov, M.; Sylla, P.; Bone, D.; Kaur, N.; Spalkova, E.; Bentley, C.; Amin, U.; Jadir, A.T.; et al. Profile of humoral and cellular immune responses to single doses of BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 vaccines in residents and staff within residential care homes (VIVALDI): An observational study. *Lancet Heal. Longev.* **2021**, *2*, e544–e553. [\[CrossRef\]](#)
15. Ebinger, J.E.; Fert-Bober, J.; Printsev, I.; Wu, M.; Sun, N.; Prostko, J.C.; Frias, E.C.; Stewart, J.L.; Van Eyk, J.E.; Braun, J.G.; et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 981–984. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Crotty, S. Hybrid immunity. *Science* **2021**, *372*, 1392–1393. [\[CrossRef\]](#)
17. Parry, H.; Bruton, R.; Tut, G.; Ali, M.; Stephens, C.; Greenwood, D.; Faustini, S.; Hughes, S.; Huissoon, A.; Meade, R.; et al. Immunogenicity of single vaccination with BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 at 5–6 weeks post vaccine in participants aged 80 years or older: An exploratory analysis. *Lancet Health Longev.* **2021**, *2*, e554–e560. [\[CrossRef\]](#)
18. Khoury, D.S.; Cromer, D.; Reynaldi, A.; Schlub, T.E.; Wheatley, A.K.; Juno, J.A.; Subbarao, K.; Kent, S.J.; Triccas, J.A.; Davenport, M.P. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1205–1211. [\[CrossRef\]](#)
19. Müller, L.; Andrée, M.; Moskorz, W.; Drexler, I.; Walotka, L.; Grothmann, R.; Ptok, J.; Hillebrandt, J.; Ritchie, A.; Rabl, D.; et al. Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Clin. Infect. Dis.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
20. Salazar, E.; Kuchipudi, S.V.; Christensen, P.A.; Eagar, T.; Yi, X.; Zhao, P.; Jin, Z.; Long, S.W.; Olsen, R.J.; Chen, J.; et al. Convalescent plasma anti-SARS-CoV-2 spike protein ectodomain and receptor-binding domain IgG correlate with virus neutralization. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 6728–6738. [\[CrossRef\]](#)
21. Wang, Z.; Schmidt, F.; Weisblum, Y.; Muecksch, F.; Barnes, C.O.; Finklin, S.; Schaefer-Babajew, D.; Cipolla, M.; Gaebler, C.; Lieberman, J.A.; et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* **2021**, *592*, 616–622. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Mazagatos, C.; Monge, S.; Olmedo, C.; Vega, L.; Gallego, P.; Martin-Merino, E.; Sierra, M.J.; Limia, A.; Larrauri, A. Effectiveness of mRNA COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infections and COVID-19 hospitalisations and deaths in elderly long-term care facility residents, Spain, weeks 53 2020 to 13 2021. *Eurosurveillance* **2021**, *26*, 1–6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Odriozola A, Lamadrid-Perojo P, Cuadrado A, San Segundo D, Del Barrio M, Fortea JI, et al. Immune response after a third dose of the mrna-1273 sars-cov-2 vaccine in liver transplant recipients. *Transplantation* [Internet]. julio de 2022 [citado 7 de mayo de 2024];106(7):e341-2. Disponible en: <https://journals.lww.com/10.1097/TP.0000000000004147>

ANEXO II: Otras publicaciones durante el programa de doctorado



Myeloid-Derived Suppressor Cells in Kidney Transplant Recipients and the Effect of Maintenance Immunotherapy

OPEN ACCESS

Edited by:

Matthew Collin,
Newcastle University, United Kingdom

Reviewed by:

Amanda S. MacLeod,
Duke University, United States
Alessandra Franco,
University of California, San Diego,
United States

*Correspondence:

Jordi Ochando
Jordi.ochando@mssm.edu
Marcos López-Hoyos
marcos.lopez@scsalud.es

Specialty section:

This article was submitted to
Antigen Presenting Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 16 August 2019

Accepted: 20 March 2020

Published: 30 April 2020

Citation:

Iglesias-Escudero M,
Sansegundo-Arribas D, Riquelme P,
Merino-Fernández D, Guiral-Foz S,
Pérez C, Valero R, Ruiz JC, Rodrigo E,
Lamadrid-Perojo P, Hutchinson JA,
Ochando J and López-Hoyos M
(2020) Myeloid-Derived Suppressor
Cells in Kidney Transplant Recipients
and the Effect of Maintenance
Immunotherapy.
Front. Immunol. 11:643.
doi: 10.3389/fimmu.2020.00643

**María Iglesias-Escudero¹, David Sansegundo-Arribas^{1,2}, Paloma Riquelme³,
David Merino-Fernández¹, Sandra Guiral-Foz^{1,2}, Carmen Pérez¹, Rosalia Valero^{1,4},
Juan Carlos Ruiz^{1,4}, Emilio Rodrigo^{1,4}, Patricia Lamadrid-Perojo¹, James A. Hutchinson³,
Jordi Ochando^{5,6*} and Marcos López-Hoyos^{1,2*}**

¹ Transplantation and Autoimmunity Group, Marqués de Valdecilla Health Research Institute (IDIVAL) Santander, Spain, ² Department of Immunology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ³ Section of Experimental Surgery, Department of Surgery, University Hospital of Regensburg, Regensburg, Germany, ⁴ Department of Nephrology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ⁵ Department of Oncological Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States, ⁶ Immunología de Trasplantes, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) represent a heterogeneous group of myeloid regulatory cells that were originally described in cancer. Several studies in animal models point to MDSC as important players in the induction of allograft tolerance due to their immune modulatory function. Most of the published studies have been performed in animal models, and the data addressing MDSCs in human organ transplantation are scarce. We evaluated the phenotype and function of different MDSCs subsets in 38 kidney transplant recipients (KTRs) at different time points. Our data indicate that monocytic MDSCs (Mo-MDSC) increase in KTR at 6 and 12 months posttransplantation. On the contrary, the percentages of polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC) and early-stage MDSC (e-MDSC) are not significantly increased. We evaluated the immunosuppressive activity of Mo-MDSC in KTR and confirmed their ability to increase regulatory T cells (Treg) *in vitro*. Interestingly, when we compared the ability of Mo-MDSC to suppress T cell proliferation, we observed that tacrolimus, but not rapamycin-treated KTR, was able to inhibit CD4⁺ T cell proliferation *in vitro*. This indicates that, although mTOR inhibitors are widely regarded as supportive of regulatory responses, rapamycin may impair Mo-MDSC function, and suggests that the choice of immunosuppressive therapy may determine the tolerogenic pathway and participating immune cells that promote organ transplant acceptance in KTR.

Keywords: kidney transplantation, mTOR inhibition, myeloid-derived suppressor cells, tacrolimus, immunosuppression

INTRODUCTION

Kidney transplantation is a treatment option for patients with end-stage renal disease (ESRD). Although immunosuppressive protocols have clearly reduced the incidence of acute rejection, transplant patients continue at high risk of treatment side effects, and long-term allograft survival has not improved significantly (1). As a consequence, the main goals in transplantation are to predict the risk of developing rejection and to find biomarkers of tolerance to allow immunosuppression withdrawal in order to minimize the adverse effects of the currently available immunosuppressive regimens.

An increasing field of research is focused on the study of immune cells with regulatory and/or suppressive function. Among them, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have gained attention in the last years. The MDSCs are a heterogeneous group of myeloid cells able to suppress adaptive and innate immune responses and have been suggested as potential biomarkers for allograft tolerance. They were initially described in cancer, and several studies have pointed out MDSC to play an important role in the regulation of immune responses in other clinical setting, such as organ transplantation, infection, and autoimmune diseases (2–4).

Myeloid-derived suppressor cells were first described in mice as CD11b⁺ Gr1⁺ cells, and experimental transplant models demonstrated that MDSCs have an important role in the induction of tolerance (5). On the contrary, evidence on their role in human transplantation is scarce and non-conclusive. In renal transplant patients, Luan et al. observed MDSC, defined as CD33⁺ CD11b⁺HLA-DR⁻, able to expand T regulatory cells (Treg) *in vitro* and correlate with Treg cell numbers *in vivo* (6). These data were confirmed by Meng et al. who associated MDSC numbers with less tissue injury and longer allograft survival (7). Human MDSCs are divided into three main subsets: monocytic MDSC (Mo-MDSCs: CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁻), polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSCs: CD33⁺CD11b⁺CD15⁺HLA-DR⁻), and a population lacking both differentiation surface markers classified as early-stage MDSC (e-MDSCs: CD33⁺HLA-DR⁻CD15⁻CD14⁻) (8). Since these phenotypic markers are not exclusive of MDSCs and they are present in other myeloid cells such as monocytes, macrophages, and granulocytes, MDSC cells are further defined upon demonstration of their suppressive function (9).

Due to the paucity of the MDSC data in clinical organ transplantation and that different immunosuppressants may have a distinct effect on MDSC, we monitored circulating MDSC subset frequencies in kidney transplant recipients (KTRs). The main goal of the study was to compare transplant recipients receiving standard triple therapy to those maintained on a regimen including rapamycin and evaluate the effect

of each therapeutic arm on MDSC in relation to kidney transplant outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

A total of 38 consecutive KTRs were enrolled in the study after giving consent while they were listed for kidney transplantation in the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla in 2016. The study was approved by the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Ethics Committee. The mean follow-up time was 459 days. The clinical and immunological features of the KTR are summarized in **Table 1**. Clinical data were collected from patient records, and blood was drawn at baseline/day 0, 180, and 360 days after transplantation. The clinical and immunological features of the KTR are summarized in **Table 1**.

Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry Analysis

The PBMCs or isolated MDSCs were stained with the following monoclonal antibodies: anti-CD33-APC (clone D3HL60.251), anti-CD3-FITC (clone UCHT1), anti-CD14-ECD (clone RMO52), and anti-CD11b-PE-cyanin (clone Bear1) (Beckman Coulter, Marseille, France); anti-CD16-APC-Cy7 (clone 3G8) and anti-CD56-FITC (clone HCD56 and anti-HLA-DR-Brilliant Violet 510 (clone L243) (Biolegend, San Diego, CA, United States); anti-CD19-FITC (clone 4G7), anti-CD14-FITC (clone MφP9), anti-CD25-PE (clone 2A3), and anti-FoxP3-Pacific Blue (clone 206D) (BD Biosciences); anti-CD15-CF Blue (clone MCS-1) (Immunostep, Salamanca, Spain); and anti-CD4-APC-Vio770 (clone REA623) from Miltenyi Biotec. The cells were incubated for 20 min, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and acquired in a Cytotflex® flow cytometer (Beckman Coulter). MDSCs were quantified by flow cytometry following the gating strategy proposed by Bronte et al. (8) to characterize MDSC subsets: Mo-MDSCs (CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ CD14⁺CD15⁻), PMN-MDSC (CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ CD15⁺CD14⁻), and e-MDSC Lin⁻ (CD14⁺CD56⁺CD3⁺CD19⁺) CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ CD14⁻CD15⁻. Total MDSCs were defined as CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ cells. Fluorescence minus one control was used to identify HLA-DR⁺ and HLA-DR⁻ cells.

Isolation and Sorting of MDSC

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats from healthy donors and from KTR by Ficoll density gradient centrifugation. To isolate CD33⁺ HLA-DR⁻ and CD33⁺ HLA-DR⁻ CD14⁺ cells (Mo-MDSC), the CD33⁺ cells were first sorted by magnetic-automated cell sorting using CD33-positive separation microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Further isolation of CD33⁺HLA-DR⁻ cells and CD33⁺HLA-DR⁻ CD14⁺ was performed by sorting enriched cells on a FACS-ARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA, United States). The purity of the cell sorting was tested after

Abbreviations: 7AAD, 7-amino-actinomycin D; CNI, calcineurin inhibitors; e-MDSC, early-stage MDSCs; HC, healthy controls; KTRs, kidney transplant recipients; MDSCs, myeloid-derived suppressor cells; Mo-MDSCs, monocytic MDSCs; mTOR, mammalian target of rapamycin; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PMN-MDSCs, polymorphonuclear MDSCs.

TABLE 1 | Main features of study population (*N* = 38).

Recipients: Age, mean, years	51.88 (SD13.23)
Donors: Age, mean, years	49.61 (SD12.63)
Healthy controls: Age, mean, years	46.17 (SD11.85)
Recipient Sex (% female)	18 (47.37%)
Donor sex (% female)	19 (50%)
Dialysis post kidney transplant	10 (26%)
Preexisting anti-HLA antibodies	13 (34.21%)
Class I antibodies	10 (26%)
Class II antibodies	8 (21.05%)
Rejection	6 (15.78%)
RT	11 (28.94%)
Induction treatment	
None	21 (55.26%)
ATG	12 (31.57%)
Basiliximab	5 (13.15%)
Both	0 (0.00%)
Immunosuppressive protocol	
Calcineurin inhibitor	33 (86.84%)
mTOR inhibitor	0 (0.00%)
Both	5 (13.15%)
ABDR mismatches	
>3	24 (63.15%)
=3	14 (36.84%)
Class II mismatches	
0	8 (21.05%)
1	17 (44.73%)
2	13 (34.2%)
Renal disease	
Glomerular	11 (28.94%)
Others	1 (2.63%)
Congenital	7 (18.42%)
Sistemic	10 (26.31%)
Vascular	2 (5.26%)
Interstitial	5 (13.15%)
Unknown	2 (5.26%)
Peripheral blood creatinine	
Cr 7 days post trasplant	2.28 (SD1.70)
Cr 30 days post transplant	1.90 (SD1.39)
Cr 120 days post transplant	1.40 (SD0.45)
Cr 180 days post transplant	1.40 (SD0.48)

SD, standard deviation; ESRD, end stage renal disease; 1stT, first transplant; RT, retransplant patients.

each experiment, and >98% efficiency was considered acceptable for the study. The experimental conditions were replicated at least four times.

Whole Blood Cultures

Whole blood culture was performed as follows: fresh blood anticoagulated with lithium-heparin was diluted 1:4 in Gibco™ DMEMF/12 GlutaMAX™ supplement medium (Thermo Fisher Scientific) containing 100 U/ml penicillin (Lonza) and 100 mg/ml streptomycin (Lonza). Cells were stimulated throughout the cultures with 5 ng/ml recombinant human monocyte colony stimulating factor (rhM-CSF; R&D

Systems, Wiesbaden-Nordenstadt). For some experiments, human CD14⁺ monocytes were isolated from Ficoll density gradient centrifugation of PBMC followed by positive selection using anti-CD14 microbeads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). Isolated CD14⁺ monocytes were stained with Cell Tracker™ Green CMFDA Dye (Thermo Fisher Scientific) at 2 nM and then added back into whole blood cultures at 10⁵ cells/tube (Falcon® 5 ml round bottom polystyrene test tube) diluted 1/4 in Gibco™ DMEMF/12 GlutaMAX™ supplement medium (Thermo Fisher Scientific) and supplemented with 100 U/ml penicillin (Lonza), 100 mg/ml streptomycin (Lonza), and rhM-CSF (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) at 5 ng/ml carried on 0.1% human albumin. Purity of sorted cells was tested after isolation, and >95% efficiency was considered acceptable for the study. Cells were collected, and location was analyzed at baseline and 1 and 2 days after culture.

In vitro Evaluation of MDSC Suppressor Function

CD4⁺ T cells were isolated from healthy donors or KTR PBMC by immunomagnetic depletion using EasySep™ Human CD4⁺ naive T Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies, Grenoble, France) and incubated with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). The CFSE-labeled T CD4⁺ cells (5×10^5) were stimulated with Dynabeads human T-activator CD3/CD28 (Life Technologies AS, Oslo, Norway) in U-bottomed 96-well plates with complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) media supplemented with 10% human AB + serum. Proliferation was determined using flow cytometry. Autologous Mo-MDSCs were added to the culture at 1:2 ratio (CD4⁺ T cells: MDSCs), and proliferation was determined at day 5. Proliferation assays from blood donors were performed five times. These same functional assays were also carried out with MDSC from four renal transplant receptors: four patients under calcineurin inhibitor (tacrolimus) and four patients under mTOR inhibitor treatment (rapamycin) with at least 24 months of IS treatment.

In vitro Expansion of Treg Generation

peripheral blood mononuclear cells were obtained from KTR under maintenance immunosuppression with tacrolimus. CD4⁺ T cells were sorted from the PBMC as described above. CD4⁺ T cells (5×10^5) were polyclonally stimulated and cultured with CD33⁺HLA-DR⁻CD14⁺ (Mo-MDSC) at different concentrations. Treg generation was determined at day 5 by staining with the monoclonal antibodies indicated above and flow cytometry analysis.

Western Blot

Gel electrophoresis and immunoblotting were performed as described elsewhere (10).

Statistical Analysis

Non-parametric Mann–Whitney *U* test and Student's *t*-test were used to compare two groups, as appropriate. More than

two groups were compared using the parametric analysis of variance (ANOVA), the non-parametric Kruskal–Wallis (not matching), or Friedman (repeated measures) test. Comparisons between two paired groups were performed using the Student's *t*-test for paired data or the Wilcoxon signed-rank test when data were or not normally distributed, respectively. Multiple comparisons were assessed using Dunn or Tukey's tests. Statistical analyses were performed using GraphPad software version 6.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA, United States). To examine the relationship between bivariate variables, the Pearson correlation was calculated using SPSS Statistics version 24.

RESULTS

Monitoring MDSC in Kidney Transplant Patients

We hypothesized that MDSC subset frequencies might serve as useful biomarkers of clinical outcome after kidney transplantation. Therefore, we first quantified Mo-MDSC, PMN-MDSCs, and e-MDSC in peripheral blood from KTRs at 0, 180, and 360 days after transplantation. We found an increase in total CD33⁺HDL-DR^{lo} MDSC frequency at 180 days after transplantation [median, 11.5%; interquartile range (IQR), 6.2–17.0%] (Figures 1B, 2A) in comparison with patients on the day of transplantation (median, 8.8%; IQR, 5.0–16.4%) (Figures 1A, 2A). MDSC frequency at 360 days posttransplant was also increased but not significantly (median, 11.2%; IQR, 4.9–17.8%; Figures 1C, 2A). Next, we examined changes in MDSC subset distribution after transplantation (Figure 2 and Supplementary Figures S1, S2). Mo-MDSC frequencies were significantly increased at 180 and 360 days posttransplant (median, 22.71%; IQR, 6.75–57.56% and median, 25.48%; IQR, 8.85–56.58%) in comparison to patients on the day of transplantation (median, 10.56%; IQR, 3.18–37.55%) (Figures 1A–C, 2B). PMN-MDSC and e-MDSC frequencies were lower at 180 days after transplantation (median, 41.71%; IQR, 12.67–62.79% and median, 5.5%; IQR, 1.9–10.87%) compared to patients on the day of transplantation (median, 54.6%; IQR, 29.4–84.95% and median, 6.15%; IQR, 3.9–13.5%), and they remained lower 360 days posttransplantation (median, 43.14%; IQR, 10.28–63.02% and median, 4.09%; IQR, 2.11–8.2%) (Figures 1A–C, 2C,D). Despite these changes, we did not find any association between the MDSC subsets, and the clinical data are summarized in Table 1 for patients included in the present work. Importantly, all the KTRs were receiving tacrolimus (Table 1) as main immunosuppressant during the first 360 days after transplantation shown.

MDSC From Transplant Patients Induce the Production of Tregs *in vitro*

Treg expansion is one of the main mechanisms by which MDSCs exert suppressive function (11, 12). Hence, we evaluated the capacity of Mo-MDSC from healthy donors and KTR to boost Tregs *in vitro*. We observed a significant increase in the frequency of Tregs recovered from the culture when CD4⁺ T cells were

stimulated with Mo-MDSC from cells from KTR at 360 days after transplantation, confirming their suppressive function (Figure 3).

MDSC From Tacrolimus Treated KTR Effectively Suppress T Cell Proliferation *in vitro*

The T-cell-suppressive capacity of Mo-MDSC from healthy controls, tacrolimus, and rapamycin-treated KTR was compared using an *in vitro* assay of polyclonally activated T cell proliferation. Sorted Mo-MDSC were added at a 1:2 ratio to autologous CD3/CD28-stimulated CD4⁺ T cells. Four patients under long-term tacrolimus treatment and four patients under long-term rapamycin maintenance therapy were analyzed (Figure 4). Results indicate that Mo-MDSC obtained from tacrolimus treated KTR were significantly suppressive in comparison with rapamycin treated KTR. This suggests that Mo-MDSC from transplant patients exhibit different suppressive function *in vitro*, according to the immunosuppressive therapy that KTRs receive.

Rapamycin Inhibits the Function of *in vitro* Generated Myeloid Suppressor Cells

Following-up our observation of Mo-MDSC obtained from rapamycin-treated KTRs, we next investigated the effect of rapamycin on myeloid suppressor cells that were generated *in vitro* from whole blood cultures. First, we developed a flow cytometry panel that allowed us to reliably detect Mo-MDSC from human whole blood cultures according to their CD45⁺ CD33⁺ Lin[−] HLA-DR^{lo} CD14⁺ CD15[−] phenotype (Figure 5A). Using whole blood cultures, we next investigated whether CSF1-stimulated human monocytes acquire a Mo-MDSC phenotype (CD33⁺ Lin[−] HLA-DR^{lo} CD14⁺ CD15[−]) *in vitro*. When cultured for 48 h, we observed an increase in Mo-MDSC frequency in whole blood cultures from healthy donors (Figure 5B). Next, we investigated the effect of rapamycin on Mo-MDSC in whole blood cultures and observed that rapamycin led to accumulation of HLA-DR^{lo} CD14⁺ Mo-MDSC over 48 h (Figure 5C). This suggests that mTOR inhibition promotes Mo-MDSC development. Surprisingly, we found that rapamycin exposure substantially reduced the T-cell-suppressive capacity of Mo-MDSC (Figure 5D). It has been previously shown that T cell suppression by human-monocyte-derived Mo-MDSC is in part mediated by the expression of the immunosuppressive molecule indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (13). Our results confirm that rapamycin blocked the expression of IDO (Figure 5E), suggesting that the suppressive effect of Mo-MDSC from rapamycin-treated KTR may be compromised due to the impaired expression of IDO.

DISCUSSION

Myeloid-derived suppressor cells represent a varied group of myeloid regulatory cells that were originally studied in cancer

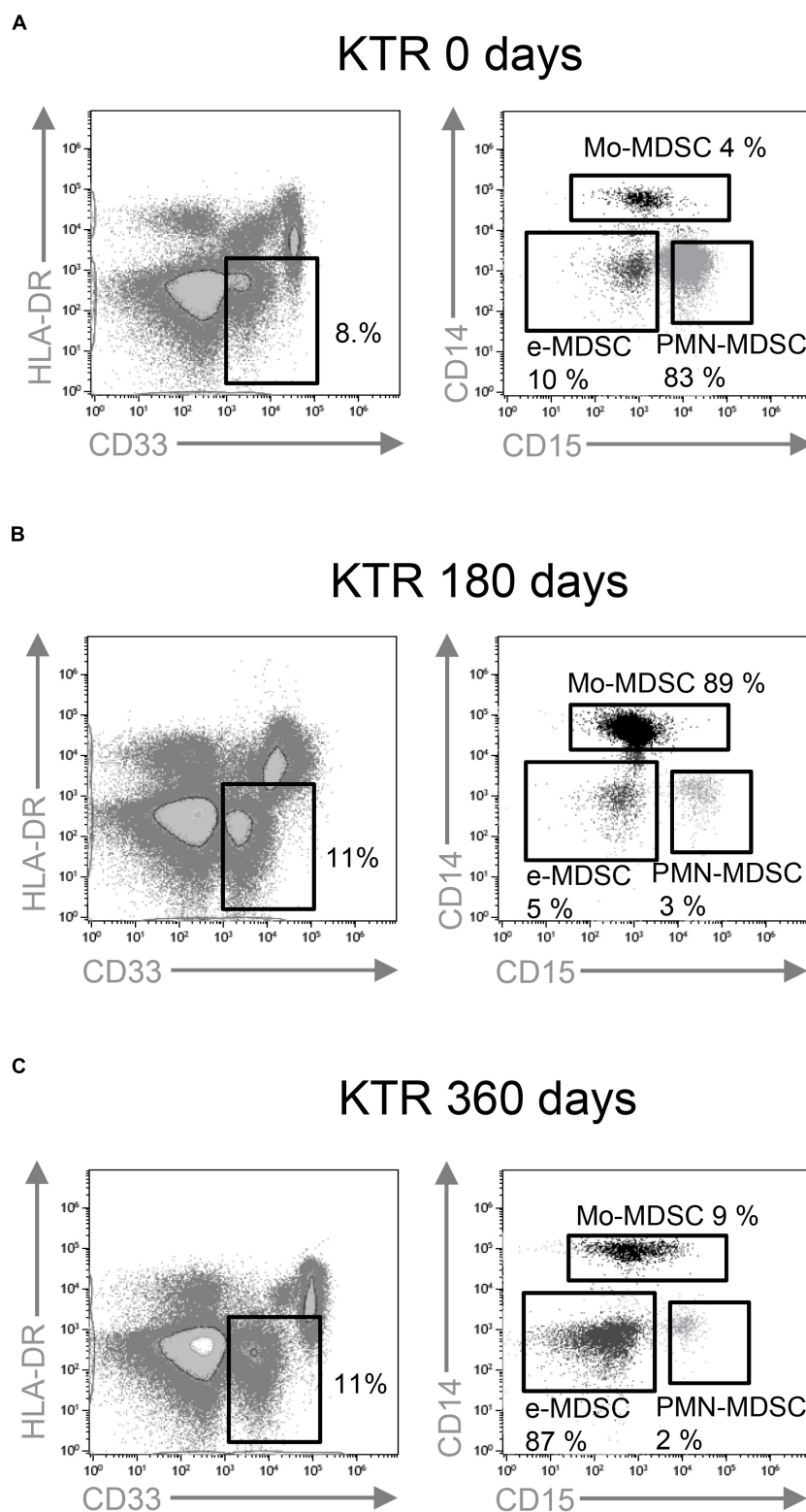
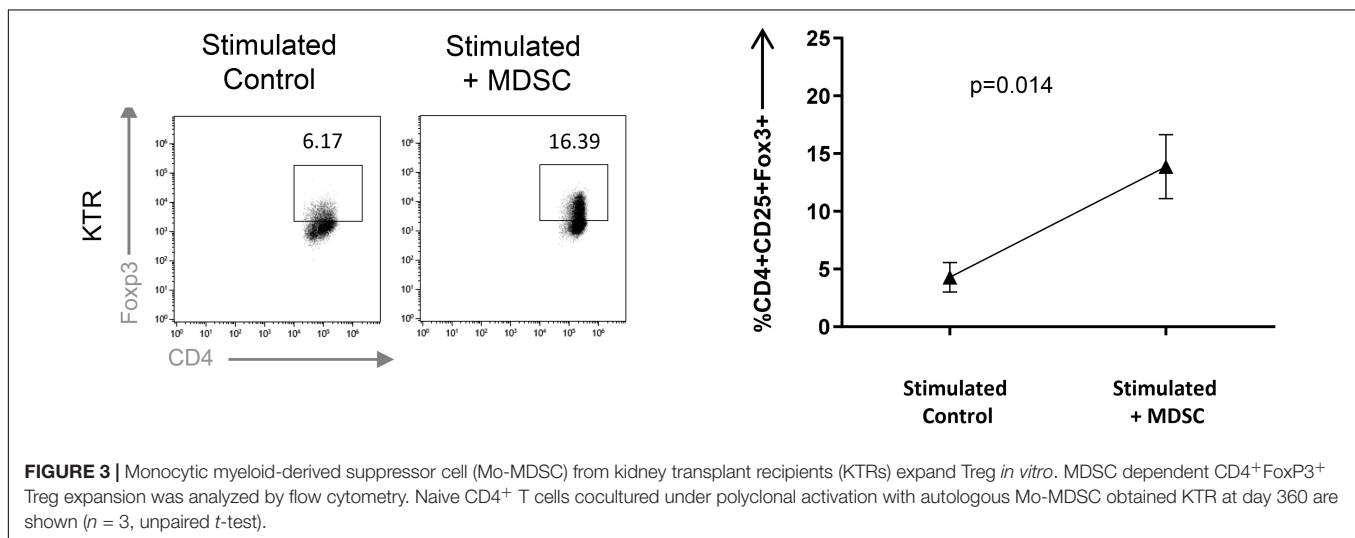
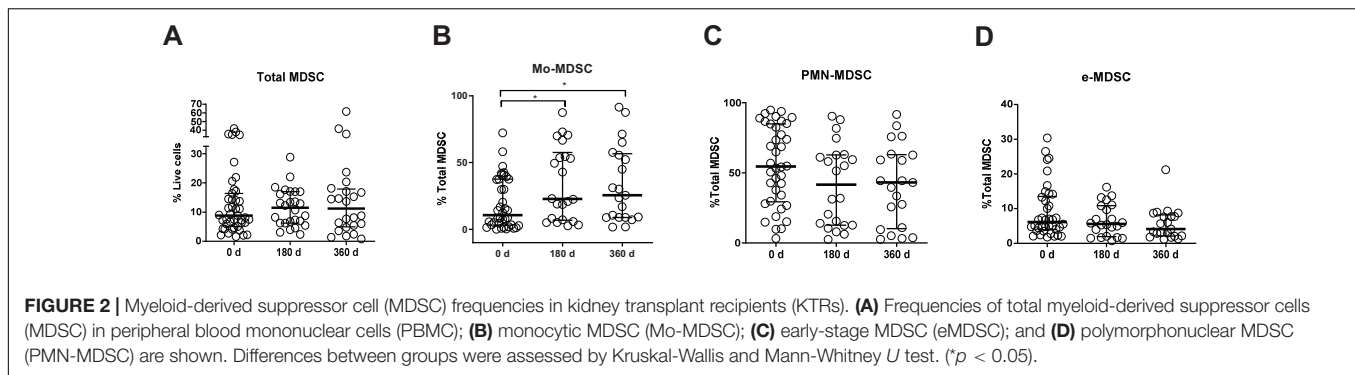


FIGURE 1 | Characterization of myeloid-derived suppressor cell (MDSC) subsets by flow cytometry. CD33⁺ HLA-DR⁺ myeloid cells were selected from live cells after doublets and debris exclusion. To define monocytic (Mo-MDSC), early-stage (e-MDSC), and polymorphonuclear (PMN-MDSC) MDSC, the CD14 and CD15 expression was analyzed on cells selected from CD33⁺ HLA-DR⁺ MDSC. Representative flow cytometry data of MDSC from **(A)** patients on the day of transplantation (day 0), **(B)** kidney transplant recipients on day 180, and **(C)** day 360 posttransplantation is shown.



(14). Several studies demonstrating their immunoregulatory action in animal models point to a potential role of MDSC in the induction of tolerance after transplantation (2). As most of the published studies were performed in animal models, there is a paucity of data addressing MDSC features and their role in human transplantation. We found that absolute numbers of circulating total MDSC were increased in KTR and in the short term after transplantation, whereas they declined to baseline levels 1 year after transplantation. We also observed an increase in Mo-MDSCs frequencies in the short term after transplantation and 1 year after transplantation. Luan et al. found that peripheral blood MDSCs were increased in KTR (6). Hock et al. also reported that renal transplant recipients had elevated frequencies of circulating MDSC (15), but they further found that MDSC numbers had returned to normal levels 12 months posttransplantation (16). However, in their previous study, long-term KTR had increased MDSC numbers, suggesting that MDSC recover and even expand in the long term, as graft acceptance progresses. These observational studies suggest that MDSC numbers increased rapidly and peaked following immunosuppressive therapy. Whether these increases are the result of potential differences between the two immunosuppressive regimens used (tacrolimus and mTOR inhibitors) or whether MDSC subsets are

differentially regulated by local conditions or treatments is still a matter of debate.

Studies developed in mice suggest that MDSCs have an important role to induce T regulatory cells (Treg) after transplant (11, 12), but their role in human transplantation is still unclear. In KTR, Luan et al. observed that CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR[−] MDSC are capable of expanding Treg, and they correlate with Treg increases *in vivo* (6). Consistent with this view, Meng et al. (7) found that MDSCs isolated from transplant recipients were also able to expand regulatory T cells and were associated with longer allograft survival. Okano S. et al. also found a positive correlation between MDSC and Treg in intestinal transplant patients (17), and we report here an increase in Treg expansion after Mo-MDSC coculture. However, there was no significant linear association between MDSC absolute numbers and percentage Treg when we examined the relationship between total MDSC subsets and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg *in vivo*.

Myeloid cell surface markers define potential MDSC, but the lack of unique phenotypic markers obliges to perform functional studies to identify MDSC subsets. We tested the suppressive capacity of MDSCs from KTR under calcineurin (tacrolimus) or mTOR (rapamycin) inhibition at 360 days of immunosuppressant maintenance therapies. Our results demonstrate that MDSC from healthy donors display marginal

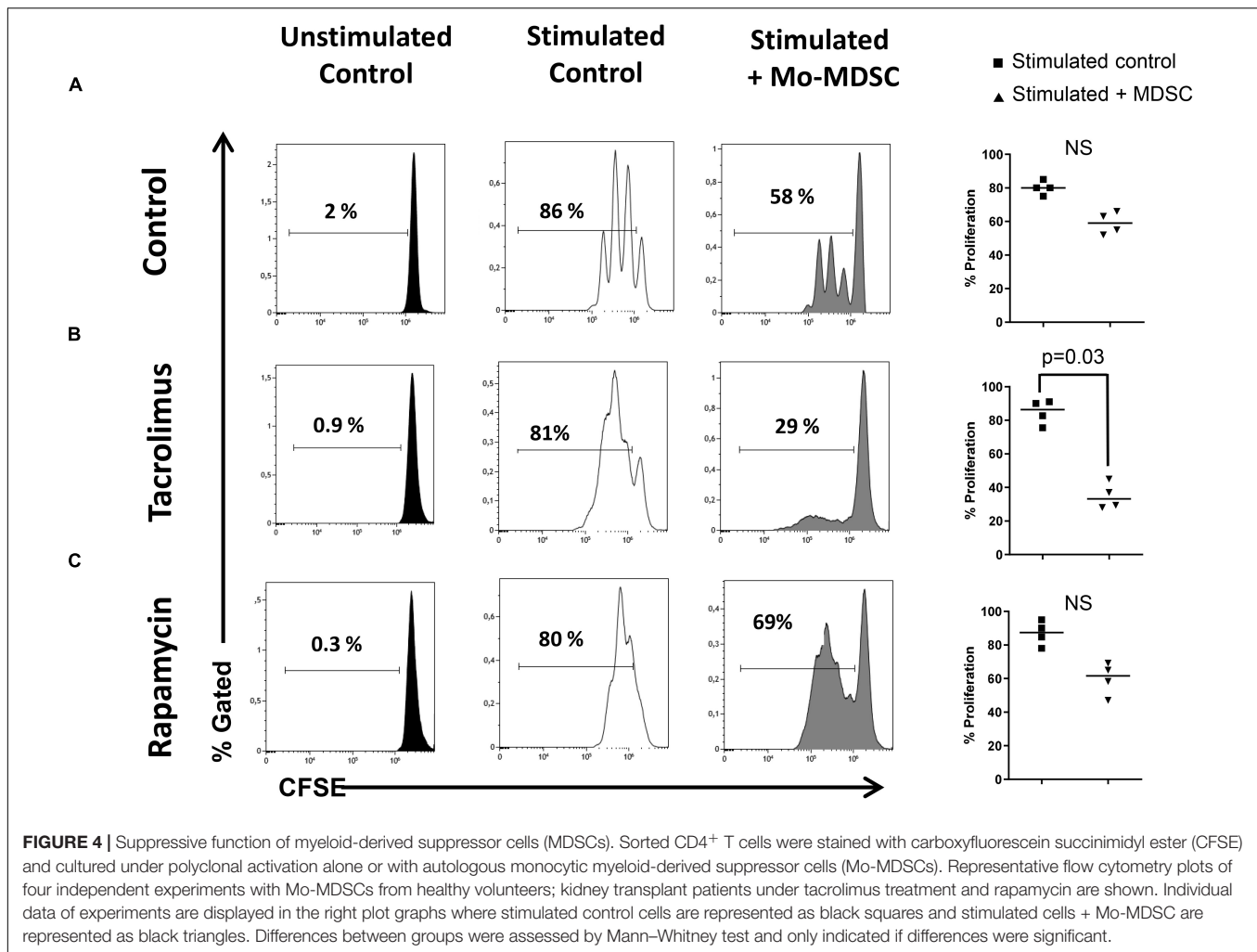


FIGURE 4 | Suppressive function of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). Sorted $CD4^+$ T cells were stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and cultured under polyclonal activation alone or with autologous monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs). Representative flow cytometry plots of four independent experiments with Mo-MDSCs from healthy volunteers; kidney transplant patients under tacrolimus treatment and rapamycin are shown. Individual data of experiments are displayed in the right plot graphs where stimulated control cells are represented as black squares and stimulated cells + Mo-MDSC are represented as black triangles. Differences between groups were assessed by Mann–Whitney test and only indicated if differences were significant.

suppression of polyclonal T $CD4^+$ responses. In contrast, Mo-MDSCs from KTR exhibit potent suppressive function. The results are consistent with previous data demonstrating that $CD11b^+CD33^+HLA-DR^-$ myeloid cells from human KTR inhibit T cell proliferation, but they found no inhibition when $CD11b^+CD33^+HLA-DR^-$ cells were obtained from healthy donors (6). Moreover, we observed that Mo-MDSC from KTR under tacrolimus treatment had increased suppressive activity compared to rapamycin, and this immune inhibitory function may be related to the upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (18).

On the other hand, rapamycin downregulates iNOS expression in MDSC, and the suppressive activity and MDSC numbers are significantly reduced after rapamycin treatment in an allogeneic skin transplant model (19). Our results are consistent with this hypothesis, and we attribute loss of suppressive function to diminished IDO expression in rapamycin-exposed Mo-MDSC. However, other studies demonstrated that rapamycin prolongs cardiac allograft survival through the enhancement of MDSC migration and suppressive activity (20). Chen X. et al. showed that mTOR signaling

is a negative determinant of MDSC function in immune-mediated hepatic injury (IMH) diseases. In the context of IMH, the blocking of mTOR with rapamycin or mTOR-deficient $CD11b^+Gr1^+$ MDSC mediated the protection against IMH (21). Another study addressing the murine MDSC response to acute kidney injury demonstrated that MDSC reduced the injury, and the effect was potentiated by MDSC induction and enhancement of the immunosuppressive activity promoted by mTOR (22). More recently, a previously unrecognized mechanistic pathway associated with organ rejection identifies the expression of mTOR by graft infiltrating macrophages at the center of epigenetic and metabolic changes that correlate with graft loss (23). This novel functional mechanism involves non-permanent reprogramming of macrophages and has been termed “trained immunity” (24). Therefore, it seems that, while mTOR inhibition may prevent trained immunity and inflammatory pathways in myeloid cells (25, 26), it may also interfere with tolerogenic programming and the ability of myeloid cells to expand Treg and suppress T-cell-mediated immune responses. This dual effect of mTOR inhibition (immunogenic vs. tolerogenic) and the resulting

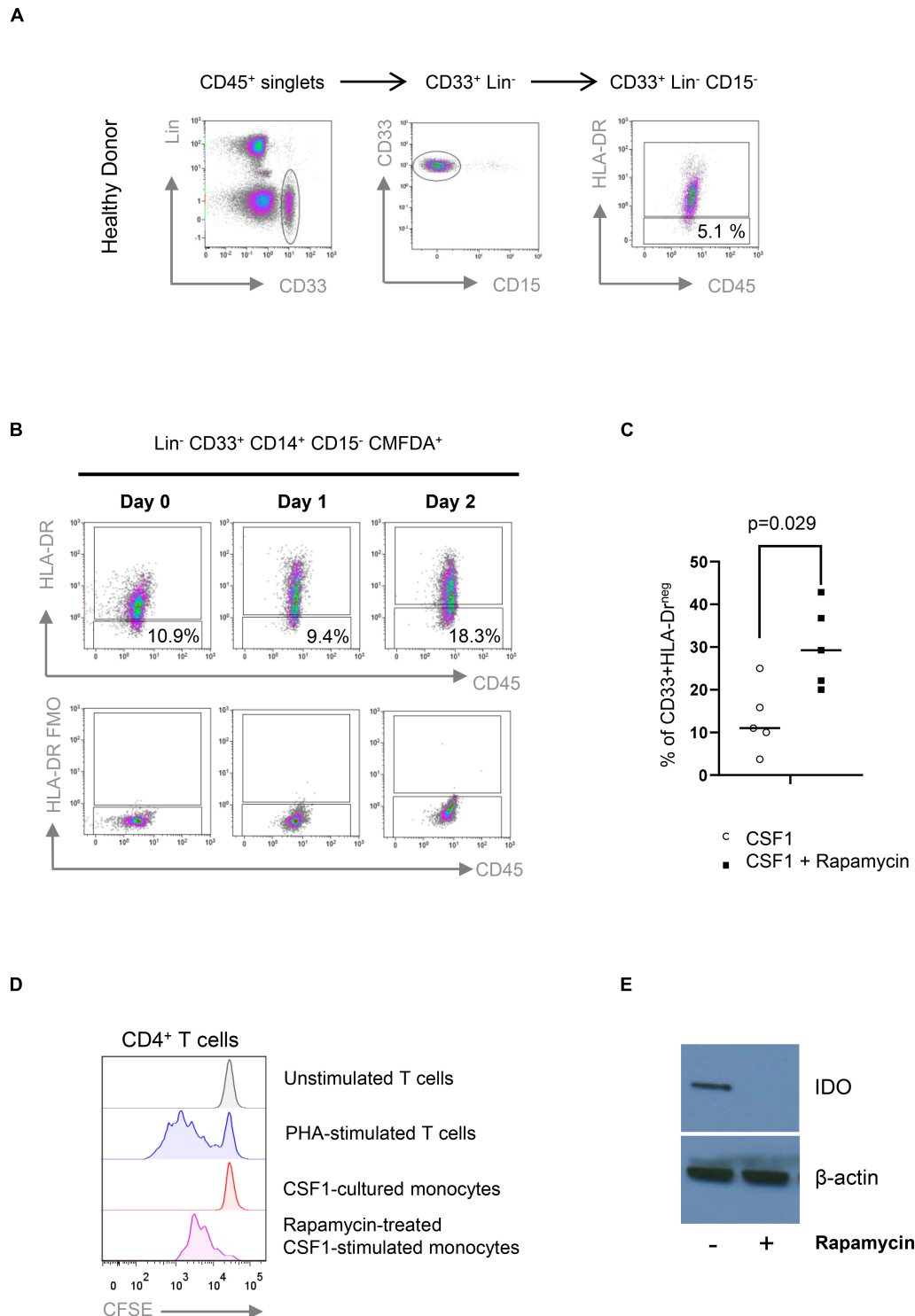


FIGURE 5 | Rapamycin prevents the suppressive function of CD33⁺HLA-DR⁻/low myeloid cells. **(A)** Gating strategy for the identification of CD33⁺HLA-DR⁻/low myeloid cells obtained from healthy control (HC). Fluorescence minus one (FMO) controls were used to define HLA-DR expression (not shown). **(B)** Colony stimulating factor 1 (CSF1) induces the accumulation of CD33⁺HLA-DR⁻/low myeloid cells *in vitro*. CD14⁺ cells were isolated from peripheral blood, labeled with CFDA and cocultured with CSF1 for 2 days. CD33⁺HLA-DR⁻/low phenotype was analyzed in CFDA⁺ cells at day 0, 1, and 2 after culture. FMO controls were used to define HLA-DR expression. **(C)** CD33⁺HLA-DR⁻/low myeloid cell frequencies after 48 h in WB cultures treated with or without rapamycin. Differences between groups were assessed by paired *t*-test. **(D)** Rapamycin-treated CSF1-stimulated monocytes are less effective than untreated monocytes in suppressing phytohemagglutinin (PHA)-stimulated proliferation of allogeneic human CD4⁺ T cells in 1:1 direct cocultures (*n* = 3). **(E)** Western Blot analyses indicate that rapamycin-treated CSF1-derived CD33⁺HLA-DR⁻/low myeloid cells prevents the expression of IDO.

dominant pathway *in vivo* is likely to determine the outcome of the transplanted organ. Taken together, the effects of distinct immunosuppressive drugs on MDSC development and function need to be better characterized in KTR.

Understanding the effect of immunosuppressive drugs on MDSC in clinical transplantation is important to develop strategies to promote tolerance. While there are many unanswered questions regarding the development and function of MDSC human transplantation, we conclude that MDSCs are increased in KTR early after transplantation and that Mo-MDSC subsets from KTR are able to suppress immune responses *in vitro*. How immunosuppressive therapy may enhance or impair MDSC numbers and function is not clear, and additional prospective studies in KTR are required to establish if the long-term transplant tolerance by immune modulation is dependent on MDSC.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Ethics Committee (CEIC). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MI-E: data acquisition, analysis, interpretation, investigation, methodology, writing, and original draft. DS-A and PR: conceptualization, formal analysis, supervision, writing, and review. DM-F: data acquisition, analysis, interpretation, investigation and methodology. SG-F, CP, and PL-P:

investigation, and methodology. RV, JR, and ER: patient recruitment and clinical data analysis. JH, JO, and ML-H: conceptualization, project administration, funding acquisition, formal analysis, writing, reviewing, and editing.

FUNDING

This work was supported by grants from the FIS-ISCIII (PI16/01585) to ML-H and R01 AI139623-01 to JO. This project also received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement number 860003 (www.instruct-h2020.eu).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Sandra Raso Torres y María José Ortiz González (IDIVAL, Santander, Spain) for her excellent technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00643/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Comparison of MDSC subsets: Mo-MDSC, PMN-MDSC, and e-MDSC at day 0 and 180 days after transplant **(A)** and at day 0, day 180, and 360 after transplant **(B)**. Levels of Mo-MDSC 180 days after transplant were significantly increased compared to day 0. The central number is the difference (in percent) between the means of the two time points **(A)** and the three time points **(B)**. Differences between time points were calculated using the following formula: (mean postTx-mean preTx)/mean preTx.

FIGURE S2 | MDSC absolute numbers in KTR. **(A)** Frequencies of total myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); **(B)** monocytic-MDSCs (Mo-MDSCs); **(C)** early stage-MDSC (eMDSCs), and **(D)** polymorphonuclear MDSCs (PMN-MDSCs) are shown. Differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* test. (**p* < 0.05).

REFERENCES

- Ojo AO, Morales JM, González-Molina M, Steffick DE, Luan FL, Merion RM, et al. Comparison of the long-term outcomes of kidney transplantation: USA versus Spain. *Nephrol Dial Transplant*. (2013) 28:213–20. doi: 10.1093/ndt/gfs287
- Ochando J, Conde P, Utrero-Rico A, Paz-Artal E. Tolerogenic role of myeloid suppressor cells in organ transplantation. *Front Immunol*. (2019) 10:374. doi: 10.3389/fimmu.2019.00374
- Dorhoi A, Du Plessis N. Monocytic myeloid-derived suppressor cells in chronic infections. *Front Immunol*. (2017) 8:1895. doi: 10.3389/fimmu.2017.01895
- Boros P, Ochando J, Zeher M. Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Hum Immunol*. (2016) 77:631–6. doi: 10.1016/j.humimm.2016.05.024
- Ochando J, Conde P, Bronte V. Monocyte-derived suppressor cells in transplantation. *Curr Transplant Rep*. (2015) 2:176–83. doi: 10.1007/s40472-015-0054-9
- Luan Y, Mosheir E, Menon MC, Wilson D, Woytovich C, Ochando J, et al. Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant*. (2013) 13:3123–31. doi: 10.1111/ajt.12461
- Meng F, Chen S, Guo X, Chen Z, Huang X, Lai Y. Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. *Inflammation*. (2014) 37:1799–805. doi: 10.1007/s10753-014-9910-5
- Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. (2016) 7:12150. doi: 10.1038/ncomms12150
- Bruger AM, Dorhoi A, Esendagli G, Barczyk-Kahlert K, van der Bruggen P, Lipoldova M, et al. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunol Immunother*. (2019) 68:631–44. doi: 10.1007/s00262-018-2170-8
- Riquelme P, Amodio G, Macedo C, Moreau A, Obermajer N, Brochhausen C, et al. DHRS9 is a stable marker of human regulatory macrophages.

- Transplantation*. (2017) 101:2731–8. doi: 10.1097/TP.0000000000001814
11. Huang B, Pan P-Y, Lin Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* (2006) 66:1123–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
 12. Garcia MR, Ledgerwood L, Yang Y, Xu J, Lal G, Ochando JC. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest.* (2010) 120:2486–96. doi: 10.1172/JCI41628
 13. Ribechini E, Hutchinson JA, Hergovits S, Heuer M, Lucas J, Schleicher U. Novel GM-CSF signals via IFN- γ /IRF-1 and AKT/mTOR. *Blood Adv.* (2017) 1:947–60. doi: 10.1182/bloodadvances.2017006858
 14. Ochando JC, Chen SH. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. *Immunol Res.* (2012) 54:275–85. doi: 10.1007/s12026-012-8335-1
 15. Hock BD, Mackenzie KA, Cross NB, Taylor KG, Currie MJ, Robinson BA, et al. Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrol Dial Transplant.* (2012) 27:402–10. doi: 10.1093/ndt/gfr264
 16. Hock BD, McKenzie JL, Cross NB, Currie MJ. Dynamic changes in myeloid derived suppressor cell subsets following renal transplant: a prospective study. *Transpl Immunol.* (2015) 32:164–71. doi: 10.1093/ndt/gfr264
 17. Okano S, Abu-Elmagd K, Kish DD, Keslar K, Baldwin WM III, Fairchild RL. Myeloid-derived suppressor cells increase and inhibit donor-reactive T cell responses to graft intestinal epithelium in intestinal transplant patients. *Am J Transplant.* (2018) 18:2544–58. doi: 10.1111/ajt.14718
 18. Han C, Wu T, Na N, Zhao Y, Li W. The effect of immunosuppressive drug cyclosporine A on myeloid-derived suppressor cells in transplanted mice. *Inflamm Res.* (2016) 65:679–88. doi: 10.1007/s00011-016-0949-7
 19. Wu T, Zhao Y, Wang H, Li Y, Shao L, Wang R, et al. mTOR masters monocytic myeloid-derived suppressor cells in mice with allografts or tumors. *Sci Rep.* (2016) 6:20250. doi: 10.1038/srep20250
 20. Nakamura T, Nakao T, Yoshimura N, Ashihara E. Rapamycin prolongs cardiac allograft survival in a mouse model by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Am J Transplant.* (2015) 15:2364–77. doi: 10.1111/ajt.13276
 21. Chen X, Zhang Z, Bi Y, Fu Z, Gong P, Li Y, et al. mTOR signaling disruption from myeloid-derived suppressive cells protects against immune-mediated hepatic injury through the HIF1 α -dependent glycolytic pathway. *J Leukoc Biol.* (2016) 100:1349–62. doi: 10.1189/jlb.2A1115-492R
 22. Zhang C, Wang S, Li J, Zhang W, Zheng L, Yang C, et al. The mTOR signal regulates myeloid-derived suppressor cells differentiation and immunosuppressive function in acute kidney injury. *Cell Death Dis.* (2017) 8:e2695. doi: 10.1038/cddis.2017.86
 23. Braza MS, van Leent MMT, Lameijer M, Sanchez-Gaytan BL, Arts RJW, Perez-Medina C, et al. Inhibiting inflammation with myeloid cell-specific nanobiologics promotes organ transplant acceptance. *Immunity.* (2018) 49:819–28. doi: 10.1016/j.immuni.2018.09.008
 24. Ochando JC, Fayad ZA, Madsen JC, Netea MG, Mulder WJM. Trained immunity in organ transplantation. *Am J Transplant.* (2020) 20:10–8. doi: 10.1111/ajt.15620
 25. Mulder WJM, Ochando JC, Joosten LAB, Fayad ZA, Netea MG. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat Rev Drug Discover.* (2019) 18:553–66. doi: 10.1038/s41573-019-0025-4
 26. Moon J-S, Hisata S, Park M-A, DeNicola GM, Ryter SW, Nakahira K, et al. mTORC1-induced HK-1 dependent glycolysis regulates NLRP3 inflammasome activation. *Cell Rep.* (2015) 12:102–15. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.046

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Iglesias-Escudero, Sansegundo-Arribas, Riquelme, Merino-Fernández, Guiral-Foz, Pérez, Valero, Ruiz, Rodrigo, Lamadrid-Perojo, Hutchinson, Ochando and López-Hoyos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Increased in Lung Transplant Recipients and Regulated by Immunosuppressive Therapy

OPEN ACCESS

Edited by:

Jordi Ochando,
Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, United States

Reviewed by:

Isabel Legaz,
University of Murcia, Spain
Mark E. Snyder,
University of Pittsburgh, United States

*Correspondence:

Marcos López-Hoyos
marcos.lopez@scsalud.es

Specialty section:

This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 03 October 2021

Accepted: 17 December 2021

Published: 10 January 2022

Citation:

Iglesias-Escudero M, Segundo DS,
Merino-Fernandez D, Mora-Cuesta VM,
Lamadrid P, Alonso-Peña M, Raso S,
Iturbe D, Fernandez-Rozas S, Cifrian J
and López-Hoyos M (2022)
Myeloid-Derived Suppressor Cells
Are Increased in Lung Transplant
Recipients and Regulated by
Immunosuppressive Therapy.
Front. Immunol. 12:788851.
doi: 10.3389/fimmu.2021.788851

**María Iglesias-Escudero^{1,2}, David San Segundo^{1,3}, David Merino-Fernandez¹,
Victor M. Mora-Cuesta⁴, Patricia Lamadrid¹, Marta Alonso-Peña¹,
Sandra Raso¹, David Iturbe⁴, Sonia Fernandez-Rozas⁴, Jose Cifrian⁴
and Marcos López-Hoyos^{1,3,5*}**

¹ Transplant and Autoimmunity group, Research Institute-IDIVAL, Santander, Spain, ² Immunology Department, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain, ³ Immunology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL Santander, Spain, ⁴ Pneumology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, ⁵ Molecular Biology Department, Universidad Cantabria, Santander, Spain

Lung transplantation remains as a primary treatment for end-stage lung diseases. Although remarkable improvement has been achieved due to the immunosuppressive protocols, long-term survival for lung transplant recipients (LTR) is still limited. In the last few decades, an increasing interest has grown in the study of dysregulation of immune mechanisms underlying allograft failure. In this regard, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) could play an important role in the promotion of graft tolerance due to their immune regulatory function. Here, we describe for the first time circulating subsets MDSCs from LTR at several time points and we evaluate the relationship of MDSCs with short-term lung transplant outcomes. Although no effect of MDSCs subsets on short-term clinical events was observed, our results determine that Mo-MDSCs frequencies are increased after acute cellular rejection (ACR), suggesting a possible role for Mo-MDSCs in the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). Therefore, whether MDSCs subsets play a role as biomarkers of chronic rejection remains unknown and requires further investigations. Also, the effects of the different immunosuppressive treatments on these subpopulations remain under research and further studies are needed to establish to what extent MDSCs immune modulation could be responsible for allograft acceptance.

Keywords: lung transplantation, immunosuppression, rejection, myeloid derived suppressor cells, tacrolimus

INTRODUCTION

Lung transplantation remains the primary treatment option for patients with end stage lung failure. Despite the advance in the handling of lung transplant recipients, in contrast to heart, liver and kidney transplantation, 5-year survival in lung transplant recipients (LTR) remains limited (1) by post transplant development of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) which is the prime source of chronic allograft failure (2, 3).

Due to this, predicting the risk of developing chronic lung rejection is one of the most important aims in lung transplantation. However, the current understanding of the unbalanced regulatory mechanisms underlying chronic lung rejection is incomplete and identifying potential prognostic markers is necessary to achieve this aim.

In the last few years, there has been an increasing interest in the field of research of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) due to their ability to suppress immune responses. MDSCs immunoregulatory role in transplant has been highlighted in previous studies performed in animal models that led to suggest them as potential biomarkers for promoting allograft tolerance (4, 5). MDSCs were initially described in cancer more than 10 years ago, but their value has been enhanced more recently due to the studies that point their role as important regulators in different clinical settings, such as transplant rejection, infection and autoimmunity (6–10).

In a first report of MDSCs in mice, these cells were described as a CD11b⁺ Gr1⁺ subpopulation and additional experimental models demonstrated their role in the induction of tolerance (5, 11). In renal transplant patients Luan et al. (12) featured MDSCs, as CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁻ cells. Those cells were capable of promoting a Treg phenotype *in vitro* and correlated with the percentage of Treg *in vivo*. Meng et al. (13), found that MDSCs were related to increased graft survival and those MDSCs obtained from transplant recipients were also able to expand regulatory T cells (14). Taking together, these studies point out MDSCs as main players involved in tolerance processes. Within the human MDSCs population, three main subsets have been identified: monocytic-MDSCs (Mo-MDSCs: CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁻ CD14⁺), polymorphonuclear-MDSCs (PMN-MDSCs: CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁻ CD15⁺), and a population lacking lineage surface markers described as early-stage MDSCs (e-MDSCs: CD33⁺ HLA-DR⁻ CD15⁻ CD14⁻) (15). Because of the current deficiency of specific markers, MDSCs definition needs demonstration of their regulatory function (16). Some studies have shown that MDSCs differentiation and function are affected by existing immunosuppressive drugs (14, 17, 18) but due to the scarce data regarding MDSCs in clinical organ transplantation, further investigations are required to determine their role in graft

acceptance and their potential use as biomarkers in order to assess their therapeutic potential in transplantation. Here, we monitored the MDSCs in LTR and assessed their function in association with tacrolimus treatment and also with early clinical events after lung transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

Blood was drawn from 82 patients on the waiting list for lung transplantation in the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla since 2016. The study was approved by the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Ethics Committee (CEIC), the patients received the informed consent and agreed to enroll in the study. The mean follow-up time was 239 days. The main immunological and clinical features of the lung transplant recipients (LTR) are summarized in **Table 1**. A protocol biopsy 21 days after lung transplantation was performed in all recipients. Acute rejection was assigned based on ISHLT guidelines (19). Clinical data were collected from patient records and blood was drawn at day 0 (n=82), 7 (n=52), 21 (n=73), 90 (n=67), 180 (n=61) and 360 (n=50) days after transplantation. Importantly, all the LTR were receiving a Tacrolimus-based triple immunotherapy during the first 360 days after transplantation (**Table 1**).

TABLE 1 | Main features of study population.

LTP	N = 82
Age, mean, years	56.38 (SD 10.34)
Female	27 (32.93%)
PGD	22 (26.82%)
Preexisting anti-HLA antibodies	22 (26.83%)
Class I antibodies	22 (26.83%)
Class II antibodies	3 (3.65%)
Rejection	30 (36.58%)
Basal Disease	
Bronchiectasis/Cystic fibrosis	8 (9.74 %)
In-tur-STISH-ul	44 (53.65 %)
COPD	22 (26.8 %)
PPH	5 (6.09 %)
Others	3 (3.65 %)
Intubation time	
≤3 days	66 (80.48 %)
>3 days	16 (19.51 %)
Infection (first month)	30 (36.58 %)
Induction treatment	
Basiliximab	82 (100%)
Immunosuppressive protocol	
Calcineurin inhibitor	82 (100 %)
ABDR Mismatches	
>3	68 (82.92 %)
≤3	14 (17.08 %)
Class II Mismatches	
0	3 (3.66%)
1	35 (42.68%)
2	44 (53.66%)

SD, standard deviation; PGD, primary graft dysfunction; In-tur-STISH-ul diffuse interstitial; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; PPH, primary pulmonary hypertension.

Abbreviations: 7AAD, 7-amino-actinomycin D; CNI, Calcineurin Inhibitors; e-MDSC, early stage MDSCs; HC, healthy controls; LTR, Lung Transplant Recipients; Mo-MDSCs, Monocytic MDSCs; MDSCs, Myeloid Derived Suppressor Cells; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBS, Phosphate Buffer Saline; PMN-MDSCs, Polymorphonuclear MDSCs.

Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry Analysis

The following monoclonal antibodies were used to stain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or isolated MDSCs: anti-CD3-Fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone UCHT1), Anti-CD33-Allophycocyanin (APC) (clone D3HL60.251), anti-CD11b-Phycoerythrin (PE)-cyanin 7 (Cy7) (clone Bear1) and anti-CD14-Phycoerythrin-Texas Red- (ECD) (clone RMO52) (Beckman Coulter, Marseille, France); anti-HLA-DR-Brilliant Violet 510 (BV510) (clone L243), anti-CD16-(APC)- Cy7 (clone 3G8) and anti-CD56-FITC (clone HCD56) (Biolegend, San Diego, CA); anti-CD14-FITC (clone MøP9) and anti-CD19-FITC (clone 4G7) (BD Biosciences); anti-CD4-APC-Vio770 (clone REA623) from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) and anti-CD15-Pacific Blue (PB) (clone MCS-1) (Immunostep, Salamanca, Spain). PBMCs or the cells collected after culture were incubated during 20 min, washed with Phosphate Buffer Saline (PBS) and acquired in a Cytotflex[®] flow cytometer (Beckman Coulter). Total MDSCs were defined as CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ cells as previously described (14). Further, the gating strategy suggested by Bronte et al. (15) was used to analyze MDSCs subsets by flow cytometry: Mo-MDSCs (CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ CD14⁺ CD15⁻), PMN-MDSCs (CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ CD15⁺ CD14⁻) and e-MDSCs Lin⁻ CD33⁺CD11b⁺HLADR⁻ CD14⁻CD15⁻. Fluorescence Minus One controls were used to assess the HLA DR⁺ and HLA DR^{low/-} populations. The gating strategy is summarized in **Supplementary Figure 1**.

Cell Isolation and Sorting

To test the suppressive capacity of human MDSCs *in vitro*, human PBMCs were isolated from buffy coats obtained from both Healthy Controls (HC) and LTR (under calcineurin inhibitor treatment during at least 2 years) by Ficoll density gradient centrifugation. To sort CD33⁺ HLA-DR⁻ CD14⁺ cells (Mo-MDSCs), in a first step, the CD33⁺ cells were isolated from PBMCs by magnetic-automated cell sorting (positive selection) Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Secondly, Mo-MDSCs were isolated from the CD33⁺ enriched fraction by fluorescence activating cell sorting on a FACS-ARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA). The purity of the cell sorting was tested, and > 98% efficiency was accepted for the study.

In Vitro Evaluation of MDSCs Function

CD4⁺ T cells were obtained from HC PBMCs by immunomagnetic isolation using EasySep[™] Human CD4⁺ naïve T Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies, Grenoble, France) and incubated with Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE). The CFSE-labeled T CD4⁺ cells (5 × 10⁵) were stimulated with Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Life Technologies AS, Oslo, Norway) in U-bottomed 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Hvidovre, Denmark) with complete RPMI media supplemented with 10% human AB+ serum. In order to determine the suppressive function of MDSCs subsets, autologous Mo-MDSCs were added to the culture at 1:2

ratio (CD4⁺T cells:MDSCs) and proliferation was analyzed after 5 days of culture by flow cytometry. These experiments were repeated five times for each donor. The same functional assays were replicated at least four times using blood from different donors and at least two times using blood from LTR.

Statistical Analysis

To test if the variables followed a Gaussian distribution we performed Kolmogorov Smirnov test. For those non-parametric unpaired variables, Mann-Whitney U test was used to compare two groups and Kruskal-Wallis (not matching) or Friedman (repeated measures) test were used to compare more than two groups. To check parametric unpaired variables Student's t test was used to compare two groups and more than two groups were compared using the parametric analysis of variance (ANOVA) as appropriate. Differences between two paired groups were assessed using the Student's t-test for paired data or the Wilcoxon signed-rank test when data were or not normally distributed, respectively. Multiple comparisons were assessed using Dunn or Tukey's tests. Statistical analyses were performed using Graphpad software version 8.4.3 (GraphPad Inc. San Diego, CA). To examine the relationship between variables, the Pearson correlation was calculated by using SPSS Statistics version 24.

RESULTS

Monitoring MDSCs in Lung Transplant Patients

Theoretically, MDSCs frequencies might serve as convenient biomarkers to predict clinical outcome after lung transplantation. Therefore, we quantified total MDSCs and MDSCs subsets: Mo-MDSCs, PMN-MDSCs and e-MDSCs in peripheral blood from end-stage lung disease (ESLD) and lung transplant recipients (**Figures 1–3**). Paired comparisons of MDSCs subsets frequency in different timepoints are shown in **Supplementary Figures 1, 2**.

We found that total MDSCs frequencies from ESLD patients and from short-term after transplantation patients remain at baseline levels but they are increased 90 days after transplantation up to a year follow up [ESLD (median 8.49% IQR 4.05%-21.05%) vs 90 days after transplantation (median 18.21%, IQR 12.41%-33.60%) (p=0.0002), ESLD vs 180 days after transplantation (median 22.29, IQR 12.83%-30.21%) (p<0.0001), ESLD vs 360 days after transplantation (median 22.25% IQR 11.06%-39.14%) (p<0.0001)]. (**Figure 2A**, absolute numbers in **Figure 3A**, paired tests in **Supplementary Figures 1A and 2BA**).

Similarly, we examined changes in MDSCs subsets allocation after transplantation. The evaluation of Mo-MDSCs frequencies revealed that percentages were increased promptly after transplantation and decreased progressively recovering basal levels during the time course follow up [ESLD (median 26.45%, IQR 4.96%-67.41%) vs 7 days post transplantation (median 61.16% IQR 34.12%-79.39%) (p=0.0002), 7 days vs 21 days after transplant (median 40.86 IQR 23.73%-65.37%)

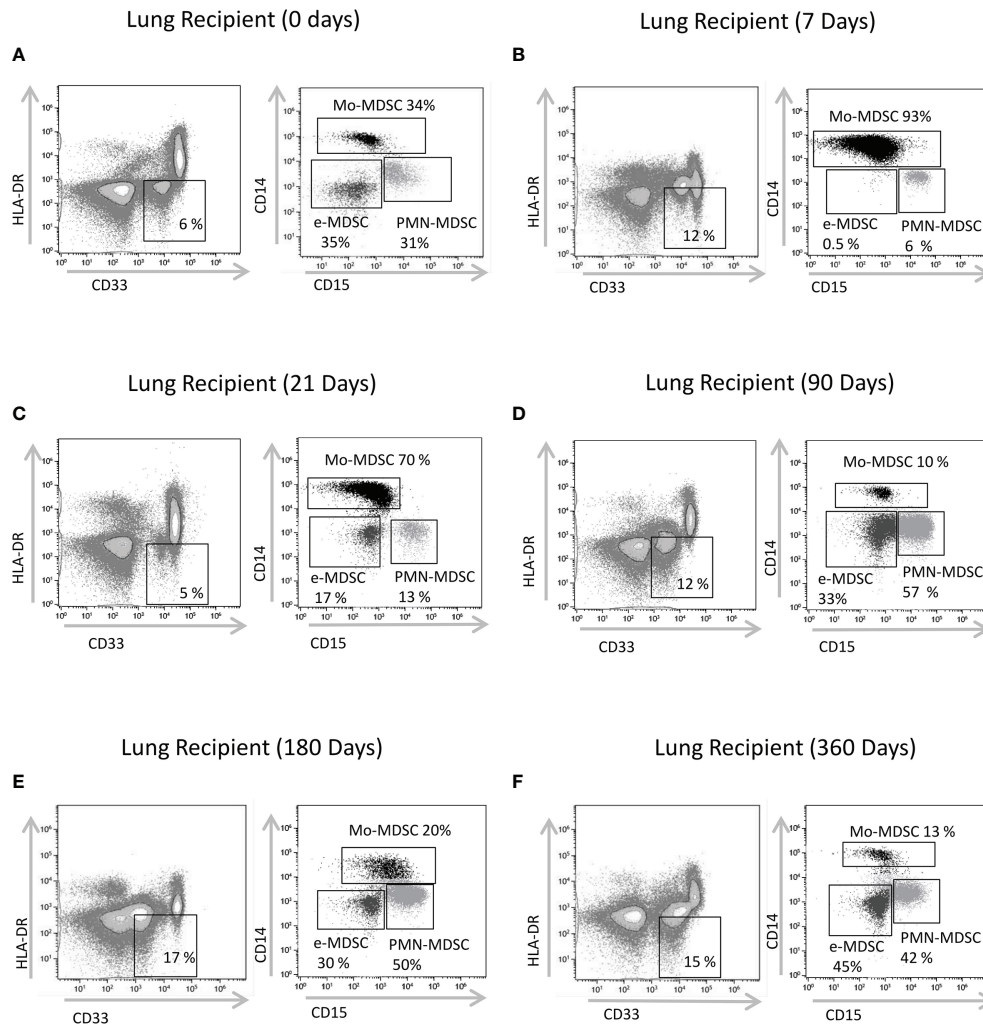


FIGURE 1 | Characterization of MDSCs subsets by flow cytometry. CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁺ myeloid cells were selected from live cells after doublets and debris exclusion (CD11b expression not shown). To define monocytic (Mo-MDSCs), early-stage (e-MDSCs) and polymorphonuclear (PMN-MDSCs) MDSCs, the CD14 and CD15 expression was analyzed on cells selected from CD33⁺HLA-DR⁺ MDSCs. Representative flow cytometry data of MDSCs from (A) patients on the day of transplantation (day 0); lung transplant recipients on days (B) 7, (C) 21, (D) 90, (E) 180 and (F) 360 post-transplantation is shown. % subsets calculated from total MDSCs.

($p < 0.0001$), 7days vs 90 days after transplantation (median 13.56% IQR 5.41%-34.47%) ($p < 0.0001$), 7days vs 180 (median 12.63% IQR 5.22%-31.02%) ($p < 0.0001$) and 7days vs 360 days after transplant (median 15.27%, IQR 6.26%-33.39%) ($p < 0.0001$) (Figure 2B, absolute numbers in Figure 3B, paired tests in Supplementary Figures 1B and 2B).

On the other hand, PMN-MDSCs frequencies on the short-term after transplantation were significantly lower up to 90 days; then they stayed increased during the time course follow up [7 days after transplantation (median 29.03%; IQR 12.22%-49.03%) vs 90 days (median 69.95% IQR 39.99%-81.04%) ($p < 0.0001$), 7 days vs 180 days (median 58.28% IQR 33.93%-81.47%) ($p = 0.0007$). 21 days (median 26.19% IQR 11.95%-45.58%) vs 90 days ($p < 0.0001$), 21 vs 180 days ($p < 0.0001$) and 21 vs 360 days (median 59.38% IQR

22.34%-73.13%) ($p = 0.0184$)] (Figure 2C, absolute numbers in Figure 3C, paired tests in Supplementary Figures 1C and 2C).

The effect of transplantation on e-MDSCs frequencies was calculated as well. We observed e-MDSCs basal levels are low at baseline and post transplant compared to PMN-MDSCs and Mo-MDSCs. Nevertheless, 21 days after transplantation there is an increase (median 7.742%; IQR 2.5%-19.63%) compared to pre transplant levels (median 3.92%; IQR 1.35%-8.06%) ($p = 0.0375$) and 7 (median 2.04%; IQR 0.84%-3.93%) ($p < 0.0001$) (Figure 2D, absolute numbers in Figure 3D, paired tests in Supplementary Figures 1D and 2D).

No significant differences were found when comparing MDSCs frequencies from ESLD and HC ($n = 59$) matched by sex and age (data not shown).

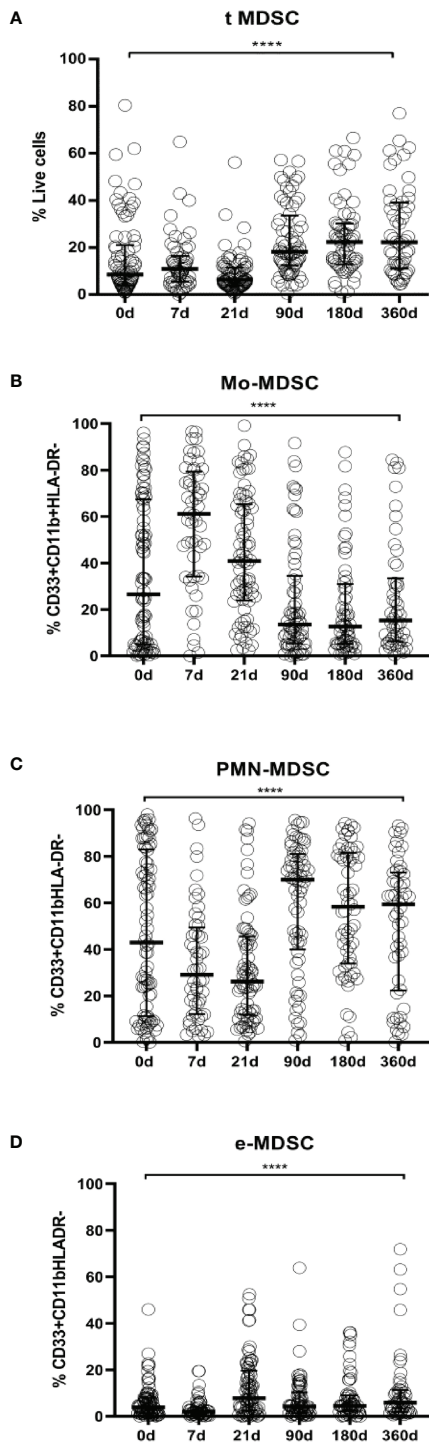


FIGURE 2 | MDSCs frequencies in LTR. (A) Frequencies of total myeloid-derived suppressor cells (t-MDSCs) from live peripheral blood mononuclear cells (PBMC); (B) monocytic-MDSCs (Mo-MDSCs); (C) polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSCs) and (D) early stage-MDSCs (eMDSCs) are shown. Differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test (**** $p < 0.0001$). % of subsets was calculated from total MDSC. Blood was drawn at day 0 ($n=82$), 7 ($n=52$), 21 ($n=73$), 90 ($n=67$), 180 ($n=61$) and 360 ($n=50$) post-transplantation.

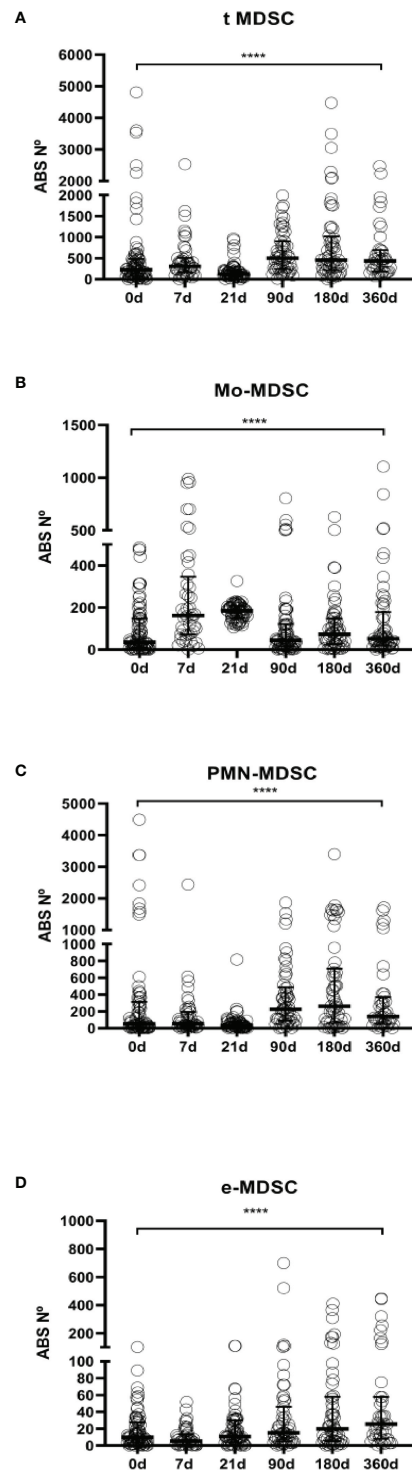


FIGURE 3 | MDSCs absolute numbers in LTR. (A) Frequencies of total myeloid-derived suppressor cells (t-MDSCs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); (B) monocytic-MDSCs (Mo-MDSCs); (C) early stage-MDSCs (e-MDSCs) and (D) polymorphonuclear MDSCs (PMN-MDSCs) are shown. Differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test; **** $p < 0.0001$. Blood was drawn at day 0 ($n=76$), 7 ($n=45$), 21 ($n=61$), 90 ($n=55$), 180 ($n=56$) and 360 ($n=39$) post-transplantation.

MDSCs From Tacrolimus Treated LTR Effectively Suppress T Cell Proliferation *In Vitro*

Because of the lack of specific markers, MDSCs need to be identified upon demonstration of their regulatory function. Then, we determined the cell-suppressive ability of MDSCs from healthy controls and tacrolimus treated LTR. Moreover, as LTR were under Tacrolimus treatment, it is important to evaluate the potential effect of the immunosuppressive treatment on MDSCs.

The suppressive capacity of Mo-MDSCs was analyzed using an *in vitro* assay of polyclonally-activated T cell proliferation. Sorted Mo-MDSCs were added at a 1:2 ratio to autologous CD3/CD28-stimulated CD4⁺ T cells. Two patients under long-term tacrolimus treatment and four HC were tested (Figure 4). Results indicate that Mo-MDSCs obtained from tacrolimus treated LTR were significantly more suppressive in comparison with HC. This suggests that Mo-MDSCs from transplant patients exhibit potent suppressive function *in vitro* despite of the immunosuppressive treatment.

MDSCs and Clinical Events

To evaluate if MDSCs can modulate the balance between rejection and graft acceptance, we next examined the effect of MDSCs subsets frequency on clinical events. In our cohort, we found no association between MDSCs levels and acute cellular rejection (ACR). In spite of this, we observed an immediate increased of Mo-MDSC post ACR (90 days posttransplant ACR: n=23, median 22.58 IQR 8.96- 83.74; No ACR: n=44, median 10.63 IQR 5.15-20.63) (p=0.0336) and 180 days post-transplant: ACR: n=23, median 17.8 IQR 6.82- 46.28; No ACR n=36, median 8.6 IQR 4.53-20.02) (p=0.0342) (Figure 5). Whether this effect is a consequence of the rejection itself or it is produced by the treatment, remains unknown. We found no differences when we studied MDSCs subsets from patients previously sensitized, primary graft dysfunction (PGD), primary disease

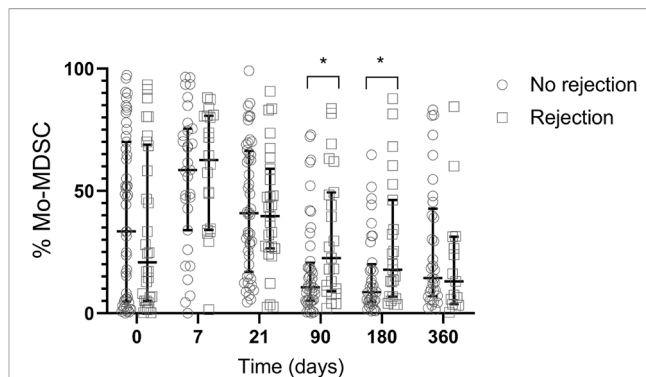


FIGURE 5 | Frequency of Mo-MDSCs and acute rejection. Comparison of median frequency of Mo-MDSCs in lung transplant recipients with rejection (white squares) and no rejection (white circles). At 90 and 180 days post-transplant Mo-MDSCs percentages were lower in patients who do not reject compared to those who reject. Box represents median and 25th and 75th percentiles and whiskers were calculated by the Tukey method; *p < 0.05.

(Supplementary Figure 3), sex or gender. No correlation was observed when we studied tacrolimus levels in peripheral blood and MDSCs frequencies (data not shown).

DISCUSSION

MDSCs represent a varied group of myeloid regulatory cells known for their role in immune regulation (20, 21). Previously published studies performed in animal models that point to them as potential players in the induction of graft acceptance in transplantation (22, 23). Although some studies about MDSCs in human organ transplantation have been reported (6, 12, 13, 18, 24, 25), this is the first study concerning the monitoring of MDSCs in human LTR. In the current study, MDSCs frequencies in 82 LTR were analyzed at multiple time points over the first year after transplantation. In our cohort, we found that total

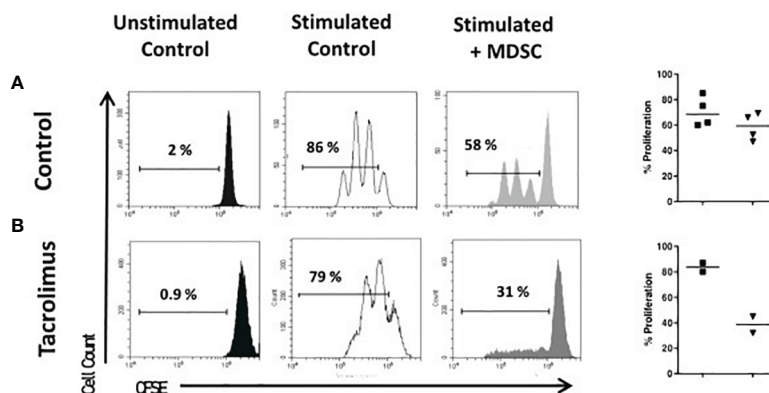


FIGURE 4 | Suppressive function of MDSCs. Sorted CD4⁺ T cells were stained with carboxyfluorescein-succinimidyl ester (CFSE) and cultured under polyclonal activation alone or with autologous monocytic-myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs). Representative flow cytometry plots of two independent experiments with Mo-MDSCs from healthy volunteers (A) and two lung transplant recipients under tacrolimus treatment (B) are shown. The summary of % of proliferation stimulated (black squares) and with MDSCs (black triangles) of 4 healthy controls (top panel) and 2 LTR with tacrolimus treatment (bottom panel).

MDSCs percentages increase 3 months post lung transplant up to a year follow up. When we evaluated the changes on MDSCs subsets, we observed increased percentages promptly after transplantation that decreased gradually during the monitoring. On the other hand, the frequencies of those cells with PMN-MDSCs phenotype decreased in the short-term post transplantation and increased during the follow up, although no changes were observed compared to pre-transplant levels. E-MDSCs were significantly increased after transplant compared to ESLD. Previously, we examined the function and the dynamic changes in the frequencies of MDSCs in a cohort of 38 kidney transplant recipients (KTR) at different time-points. Our previous data indicate that Mo-MDSCs frequencies increase at 6 months and remain increased up to a year of follow up (14). Agreeing with our results, Luan et al. (12) reported that MDSCs frequencies were elevated from 3 to 12 months after transplant. Utrero-Rico et al. (24), described Mo-MDSCs cells counts were increased within the first days after transplant in KTR, in spite of the use of induction and immunosuppressive therapy and these cells counts remained high for one year after transplant.

Hock et al. showed that MDSCs subsets increased promptly after transplant in KTR and then underwent some variations during the first year of follow-up (6). Interestingly, in a different study from the same group, the authors found that most of those patients with long term transplants had increased MDSCs numbers, which suggests that MDSCs expand on the long term (26). Taken together, these reports point towards an increase in the frequency of MDSCs rapidly after transplantation, peaking after immunosuppressive therapy administration. Furthermore, when MDSCs from donors who had undergone parallel surgical methodologies to the recipients were analyzed, the evidence suggested that the changes observed in KTRs were likely due to the immunosuppressive therapy rather than the inflammation caused by the surgery (26). Aligned with these results, the release of neutrophils from the bone marrow secondary to glucocorticoids is well established (27) and the induction of anti-inflammatory monocytes resembling MDSCs (28, 29) in response to glucocorticoids has also been described. In essays performed in the immunomonitoring group in the Hospital Klinikum (HKR) in Regensburg (30) it was observed a reduction in HLA-DR expression in monocytes after dexamethasone exposure. As a consequence, after dexamethasone treatment these monocytes acquired a Mo-MDSCs phenotype. This supports the hypothesis that corticosteroids are increasing Mo-MDSCs population in peripheral blood rapidly after transplantation. In addition, these increases suggest that MDSCs numbers are not negatively affected by the tacrolimus-based maintenance therapy.

In a previous report from our group we evaluated the function of MDSCs obtained from KTR under calcineurin (tacrolimus) or mTOR (rapamycin) inhibition at 360 days of immuno-suppressant maintenance and we observed that MDSCs from tacrolimus, but not rapamycin treated KTR, were able to reduce effectively CD4⁺ T cell proliferation *in vitro* (14). Calcineurin inhibitors are immunosuppressive drugs regularly used in transplantation primarily to prevent T cell activation and expansion, hence understanding their effect on MDSCs is critical to develop strategies to promote allograft acceptance in transplantation. In a

mouse model of skin transplant, cyclosporine A (CsA) treatment increased the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and enhanced the suppressive function of MDSCs in allograft recipients (30). Here, we report that the suppressive capacity of cells with a Mo-MDSCs phenotype obtained from long-term tacrolimus treated LTR is enhanced compared to the suppressive function of MDSCs obtained from healthy donors.

Heigl et al. featured MDSCs in LTR to determine if MDSCs can serve as a potential target in the field (25). They showed functional G-MDSCs obtained from LTR and described a mild correlation with CNI levels, as previously reported (17, 31).

It has been described that FK binding protein (FKBP) is expressed in MDSCs and PMN-MDSCs from tumoral animal models and modulates their suppressive function (32). Altogether, studies on the functional activity and number of MDSCs in transplantation, suggest that immunosuppressive treatments such as glucocorticoids and CNI are able to modulate mobilization and function of MDSCs.

Mycophenolic acid (MPA) is a non-competitive inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase widely used in immunosuppression regimens. MPA avoids the conversion of inosine monophosphate to guanine monophosphate. Thus, by blocking the *de novo* synthesis of purines, MPA acts as a potent inhibitor of the proliferation of lymphocytes (33). Among its anti-inflammatory effects, the effects of MPA on monocyte-macrophage lineage cells have been described (34): decreased recruitment of monocytic lineage cells into sites of graft rejection, decreased production of IL-1 β and increased production of the IL-1 receptor antagonist (35). However, although mycophenolic acid is likely to be involved in MDSCs development, this effect has not been explored in this report. Also, other limitation of the present study is that our cohort of LTR was under the same immunosuppressive treatment, and differences in the effect of immunosuppressive drugs can not be assessed to establish to what extent the drugs are modulating MDSCs effects differentially.

As MDSCs frequencies could serve as biomarkers to predict clinical outcome after lung transplantation, we collected data regarding the presence of some clinical events and we examined those clinical outcomes in relation to MDSCs frequencies. In contrast to some studies (13, 24), we describe here that the frequencies of Mo-MDSCs 90 and 180 days post-transplant are higher in patients that suffered acute cellular rejection (ACR) of the graft compared to those who did not.

Similarly to previous results, when Mo-MDSCs were treated with dexamethasone (30), Okano et al. (18) reported that MDSCs numbers increased to 6 times in an intestinal transplant patient on day 3 after methylprednisolone treatment for ACR. Hence, these post transplant changes in MDSCs frequency related to clinical outcomes might be reflecting changes in glucocorticoid treatment. Interestingly, in a long-term retrospective study, in those patients with more than 10-year standing kidney grafts and low immunosuppression, Mo-MDSCs were significantly higher than in short-term renal recipients, and Mo-MDSCs levels correlated with survival rates (36, 37). According to previous mentioned studies that point out MDSCs are regulated by immunosuppressive treatments such as CNI, we also found slightly higher levels of tacrolimus in

peripheral blood of patients with rejection, suggesting that MDSCs frequencies could also be modulated by the tacrolimus-based maintenance therapy.

In summary, the results of this study demonstrate that mobilization of MDSCs subsets is differentially regulated by yet undetermined stimulus, but immunosuppressive therapy is likely involved in the modulation of MDSCs numbers and function after transplant.

Also, the increases in Mo-MDSCs after acute rejection raise the question whether MDSCs could be implicated in the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). This study confirms the ability of Mo-MDSCs subsets from tacrolimus treated LTR to suppress T cell proliferation and raise the possibility that MDSCs may play an important role in suppressing allogeneic immune responses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by 2019.222 (PI19/01509) the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Ethics Committee (Santander, Spain). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MI-E: data acquisition, analysis and interpretation, investigation, methodology, writing, and original draft. DS: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, supervision, writing, review, editing, and final approval of the version to be published. DM-F: data acquisition, analysis and interpretation, investigation, and methodology. VMM-C: investigation, methodology (provided and cared for study patients), and clinical data interpretation. PL: investigation and methodology. MA-P: investigation and methodology. SR: investigation and methodology. DI-F: investigation, methodology (provided and cared for study patients), and clinical data interpretation. SR-F: investigation, methodology (provided and cared for study patients), and clinical data interpretation. JC: investigation, methodology (provided and cared for study patients), and clinical data

interpretation. ML-H: conceptualization, funding acquisition, formal analysis, supervision, writing, review, editing, and final approval of the version to be published. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from the FIS-ISCIII (PI16/01585) to ML-H and NVAL16/22 to DS.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to María José Ortiz González (IDIVAL, Santander, Spain) for her excellent technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.788851/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Paired comparison of MDSCs subsets. Paired analysis of total-Myeloid derived Suppressor cells (t-MDSCs) **(A)**, Monocytic (Mo)-MDSCs **(B)**, Poly morpho nuclear (PMN)-MDSCs **(C)**, and early stage (e)-MDSCs **(D)** at day 0 and 7 days after transplant (left panels); at day 7 and day 21 (center-left panels); at day 21 and 90 (center panels); at day 90 and 180 (center-right panels) and at day 180 and 360 days (right panels). Mean values of each MDSC subset are showed in each timepoint. The central number is the difference (in percent) between the means of the two time points. Differences between time points were calculated using the following formula: (mean posTx - mean previous timepoint)/mean previous timepoint. Paired t-test was performed, and p value depicted in each panel.

Supplementary Figure 2 | Paired comparisons of MDSC subset frequency changes to pre transplant levels: Paired analysis of total-Myeloid derived Suppressor cells (t-MDSCs) **(A)**, Monocytic (Mo)-MDSCs **(B)**, polymorphonuclear (PMN)-MDSCs **(C)**, and early e-MDSCs **(D)** at day 0 and 7 days after transplant (left panels); at day 0 and day 21 (center-left panels); at day 0 and 90 (center panels); at day 0 and 180 (center-right panels) and at day 0 and 360 days (right panels). Mean values of each MDSCs subset are showed in each timepoint. The central number is the difference (in percent) between the means of the two time points. Differences between time points were calculated using the following formula: (mean posTx - mean preTx)/mean preTx. Paired t-test was performed, and p value depicted in each panel.

Supplementary Figure 3 | MDSCs frequencies in LTR and clinical events. Frequencies of total myeloid-derived suppressor cells (t-MDSCs), monocytic (Mo)-MDSCs, polymorphonuclear (PMN)-MDSCs, early stage (e)-MDSCs in PBMC were studied and compared with clinical events such as **(A)** rejection **(B)** primary graft dysfunction (PGD), **(C)** basal disease, **(D)** anti-HLA antibodies development. Differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test (*p<0.05).

REFERENCES

1. Annual Data Report of the US Organ Procurement and Transplantation Network. Preface. *Am J Transplant: Off J Am Soc Transplant Am Soc Transplant Surgeons* (2014) 14:5–7. doi: 10.1111/ajt.12626
2. Burton CM, Carlsen J, Mortensen J, Andersen CB, Milman N, Iversen M. Long-Term Survival After Lung Transplantation Depends on

Development and Severity of Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *J Hear Lung Transplant* (2007) 26(7):681–6. doi: 10.1016/j.healun.2007.04.004

3. Copeland CAF, Snyder LD, Zaas DW, Jackson Turbyfill W, Davis WA, Palmer SM. Survival After Bronchiolitis Obliterans Syndrome Among Bilateral Lung Transplant Recipients. *Am J Respir Crit Care Med* (2010) 182(6):784–9. doi: 10.1164/rccm.201002-0211OC

4. Zhang W, Li J, Qi G, Tu G, Yang C, Xu M. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Transplantation: The Dawn of Cell Therapy. *J Trans Med* (2018) 16:19. doi: 10.1186/s12967-018-1395-9
5. Scalea JR, Lee Y, Davila E, Bromberg JS. Myeloid-Derived Suppressor Cells and Their Potential Application in Transplantation. *Transplantation* (2017) 1:359–67. doi: 10.1097/TP.0000000000002022
6. Hock BD, MacKenzie KA, Cross NB, Taylor KG, Currie MJ, Robinson BA, et al. Renal Transplant Recipients Have Elevated Frequencies of Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Nephrol Dial Transplant* (2012) 27 (1):402–10. doi: 10.1093/ndt/gfr264
7. Jeong HJ, Lee HJ, Ko JH, Cho B-J, Park SY, Park JW, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate Inflammation Resolution in Humans and Mice With Autoimmune Uveoretinitis. *J Immunol* (2018) 200(4):1306–15. doi: 10.4049/jimmunol.1700617
8. Dorhoi A, Du Plessis N. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Chronic Infections. *Front Immunol* (2018) 8:1895. doi: 10.3389/fimmu.2017.01895
9. Le Page A, Garneau H, Dupuis G, Frost EH, Larbi A, Witkowski JM, et al. Differential Phenotypes of Myeloid-Derived Suppressor and T Regulatory Cells and Cytokine Levels in Amnesic Mild Cognitive Impairment Subjects Compared to Mild Alzheimer Diseased Patients. *Front Immunol* (2017) 8:783/full. doi: 10.3389/fimmu.2017.00783/full
10. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Plasticity of Human Th17 Cells and Itregs Is Orchestrated by Different Subsets of Myeloid Cells. *Blood* (2011) 117(24):6532–41. doi: 10.1182/blood-2010-11-317321
11. Huang B, Pan P-Y, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1⁺ CD115⁺ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Res* (2006) 66(2):1123–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
12. Luan Y, Mosheir E, Menon MC, Wilson D, Woytovich C, Ochando J, et al. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Renal Transplant Patients and Mediate CD4⁺ Foxp3⁺ Treg Expansion. *Am J Transplant* (2013) 13(12):3123–31. doi: 10.1111/ajt.12461
13. Meng F, Chen SY, Guo X, Chen Z, Huang X, Lai Y, et al. Clinical Significance of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Renal Transplantation With Acute T Cell-Mediated Rejection. *Inflammation* (2014) 37(5):1799–805. doi: 10.1007/s10753-014-9910-5
14. Iglesias-Escudero M, Sansegundo-Arribas D, Riquelme P, Merino-Fernández D, Guiral-Foz S, Pérez C, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Kidney Transplant Recipients and the Effect of Maintenance Immunotherapy. *Front Immunol* (2020) 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00643
15. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for Myeloid-Derived Suppressor Cell Nomenclature and Characterization Standards. *Nat Commun* (2016) 7(1):12150. doi: 10.1038/ncomms12150
16. Bruger AM, Dorhoi A, Esendagli G, Barczyk-Kahlert K, van der Bruggen P, Lipoldova M, et al. How to Measure the Immunosuppressive Activity of MDSC: Assays, Problems and Potential Solutions. *Cancer Immunol Immunother* (2019) 68(4):631–44. doi: 10.1007/s00262-018-2170-8
17. Han C, Wu T, Na N, Zhao Y, Li W, Zhao Y. The Effect of Immunosuppressive Drug Cyclosporine A on Myeloid-Derived Suppressor Cells in Transplanted Mice. *Inflamm Res* (2016) 65(9):679–88. doi: 10.1007/s00011-016-0949-7
18. Okano S, Abu-Elmagd K, Kish DD, Keslar K, Baldwin WM, Fairchild RL, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Increase and Inhibit Donor-Reactive T Cell Responses to Graft Intestinal Epithelium in Intestinal Transplant Patients. *Am J Transplant* (2018) 18(10):2544–58. doi: 10.1111/ajt.14718
19. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Bohler A, Burke MM, et al. Revision of the 1996 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection. *J Hear Lung Transplant* (2007) 26(12):1229–42. doi: 10.1016/j.healun.2007.10.017
20. Zhao Y, Wu T, Zhao Y. The Roles of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* (2014) 10:1385–94. doi: 10.1586/1744666X.2014.948424
21. Escors D, Liechtenstein T, Perez-Janices N, Schwarze J, Dufait I, Goyvaerts C, et al. Assessing T-Cell Responses in Anticancer Immunotherapy: Dendritic Cells or Myeloid-Derived Suppressor Cells? *Oncoimmunology* (2013) 2:10.e26148. doi: 10.4161/onci.26148
22. Ochando JC, Chen SH. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Transplantation and Cancer. *Immunol Res* (2012) 54:275–85. doi: 10.1007/s12026-012-8335-1
23. Ochando J, Conde P, Utrero-Rico A, Paz-Artal E. Tolerogenic Role of Myeloid Suppressor Cells in Organ Transplantation. *Front Immunol* (2019) 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00374
24. Utrero-Rico A, Laguna-Goya R, Cano-Romero F, Chivite-Lacaba M, Gonzalez-Cuadrado C, Rodriguez-Sánchez E, et al. Early Posttransplant Mobilization of M-MDSC Correlates With Increase in Soluble Immunosuppressive Factors and Predicts Cancer in Kidney Recipients. *Transplantation* (2020) 104:2599–608. doi: 10.1097/TP.0000000000003179
25. Heigl T, Singh A, Saez-Gimenez B, Kaes J, Van Herck A, Sacreas A, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Lung Transplantation. *Front Immunol* (2019) 10(APR). doi: 10.3389/fimmu.2019.00900
26. Hock BD, McKenzie JL, Cross NB, Currie MJ. Dynamic Changes in Myeloid Derived Suppressor Cell Subsets Following Renal Transplant: A Prospective Study. *Transpl Immunol* (2015) 32(3):164–71. doi: 10.1016/j.trim.2015.05.001
27. Mintzer DM, Billet SN, Chmielewski L. Drug-Induced Hematologic Syndromes. *Adv Hematol* (2009) 2009:495863. doi: 10.1155/2009/495863
28. Varga G, Ehrchen J, Tsianakas A, Tenbrock K, Rattenholl A, Seeliger S, et al. Glucocorticoids Induce an Activated, Anti-Inflammatory Monocyte Subset in Mice That Resembles Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Leukoc Biol* (2008) 84(3):644–50. doi: 10.1189/jlb.1107768
29. Ehrchen J, Steinmüller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, et al. Glucocorticoids Induce Differentiation of a Specifically Activated, Anti-Inflammatory Subtype of Human Monocytes. *Blood* (2007) 109(3):1265–74. doi: 10.1182/blood-2006-02-001115
30. Riquelme PP. Exploring the Relationship Between Circulating M-MDSC Numbers and Risk of Posttransplant Malignancy. *Transplantation* (2020) 104(12):2475–7. doi: 10.1097/TP.0000000000003180
31. Wang X, Bi Y, Xue L, Liao J, Chen X, Lu Y, et al. The Calcineurin-NFAT Axis Controls Allograft Immunity in Myeloid-Derived Suppressor Cells Through Reprogramming T Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* (2015) 35(3):598–609. doi: 10.1128/MCB.01251-14
32. Yang F, Li Y, Zhang Q, Tan L, Peng L, Zhao Y. The Effect of Immunosuppressive Drugs on MDSCs in Transplantation. *J Immunol Res* (2018) 2018:1–16. doi: 10.1155/2018/5414808
33. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of Action of Mycophenolate Mofetil in Preventing Acute and Chronic Allograft Rejection. *Transplantation* (2005) 80 (2 Suppl):S181–90. doi: 10.1097/01.tp.0000186390.10150.66
34. Cohn RG, Mirkovich A, Dunlap B, Burton P, Chiu S-H, Eugui E, et al. Mycophenolic Acid Increases Apoptosis, Lysosomes and Lipid Droplets in Human Lymphoid and Monocytic Cell Lines. *Transplantation* (1999) 68:411. doi: 10.1097/00007890-199908150-00014
35. Waters RV, Webster D, Allison AC. Mycophenolic Acid and Some Antioxidants Induce Differentiation of Monocytic Lineage Cells and Augment Production of the IL-1 Receptor Antagonist. *Ann N Y Acad Sci* (1993) 696:185. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb1151.x
36. Kim Y-S, Kim Y-J, Lee J-M, Kim E-K, Park Y-J, Choe S-K, et al. Functional Changes in Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) during Tumor Growth: FKBP51 Contributes to the Regulation of the Immunosuppressive Function of MDSCs. *J Immunol* (2012) 188(9):4226–34. doi: 10.4049/jimmunol.1103040
37. Du XX, Guo YL, Zhao YP, Yang M, Chang S, Liu B, et al. Accumulation of High Levels of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Enhances Graft Survival in Almost-Tolerant Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc* (2018) 50(10):3314–20. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.04.043

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Iglesias-Escudero, Segundo, Merino-Fernandez, Mora-Cuesta, Lamadrid, Alonso-Peña, Raso, Iturbe, Fernandez-Rozas, Cifrian and López-Hoyos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is

permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.