

Citar como:

Lozada-Requena I, Paredes-Inofuente D. Anticuerpos IgG, factor de necrosis tumoral alfa y agotamiento de linfocitos T en personas vacunadas para Covid-19. Rev Méd Hered. 2024; 35(3): 130-141. DOI: 10.20453/rmh.v35i3.5258

Recibido: 16/02/2024

Aceptado: 08/07/2024

Declaración de financiamiento y de conflictos de intereses:

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Contribución de los autoría:

ILR: Concepción, metodología, análisis formal, investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito, aprobación de la versión final. **DPI:** Investigación, redacción, revisión, edición del manuscrito, recolección de datos y aprobación de la versión final.

Correspondencia:

Iván Lozada-Requena, ivan.lozada@upch.pe
Teléfono: +51 966698407
Laboratorio de Inmunología # 108 – LID - FACII - Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú.



Artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

© Los autores

© Revista Médica Herediana

Nivel de anticuerpos IgG, factor de necrosis tumoral alfa y agotamiento de linfocitos T en personas vacunadas contra el SARS-CoV-2

Level of IgG antibodies, tumor necrosis factor alpha and T-cell exhaustion in persons vaccinated against SARS-CoV-2

Ivan Lozada-Requena^{1,a} , Diego Paredes-Inofuente^{1,b} 

¹ Universidad Peruana Cayetano Heredia. Laboratorio de Inmunología # 108, Laboratorios de Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias e Ingeniería. Lima, Perú.

^a Doctor en ciencias de la vida.

^b Bachiller en biología

RESUMEN

En la COVID-19, la inmunidad es fundamental. Poco se sabe de los mecanismos del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y su capacidad de estimular la producción de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. Asimismo, sobre la respuesta y agotamiento celular de los linfocitos T (LT). **Objetivo:** Evaluar el comportamiento, antes y después de la tercera dosis de vacunación, de los niveles de IgG (anti-spike), TNF- α y poblaciones linfocitarias incluyendo su agotamiento celular. **Material y métodos:** Se utilizó suero y células mononucleares de sangre periférica de sujetos con infección (G1, n=07) y asintomáticos (G2, n= 08 y G3, n=10) vacunados con la tercera dosis de la vacuna BNT162b2 (G1 y G2) o de ChAdOx1-S (G3). Se usó ELISA para determinar los niveles de IgG y TNF- α y citometría de flujo para determinar los niveles y el agotamiento celular de LT. **Resultados:** La IgG (anti-spike) antes y después de la tercera dosis no cambió. Se observó en G1 un aumento significativo de TNF- α después de recibir la tercera dosis. Los linfocitos totales (T, B y NK) mostraron una disminución significativa en G2 y, aunque los LT(CD3⁺) no variaron, en G3 sí hubo una disminución de LTCD4⁺ con aumento de PD-1⁺ y un aumento de LTCD8⁺ y PD-1⁺ antes y después de la tercera dosis, respectivamente. Se encontró una correlación positiva después de la tercera dosis en G3 entre IgG y CD4⁺PD-1⁺(p=0,034) y CD8⁺PD-1⁺(p=0,028), respectivamente. **Conclusión:** La respuesta humoral (IgG) e inflamatoria (TNF- α) no se modificó significativamente; la vacunación heteróloga (G3) incrementó los niveles de LT CD4⁺, una subpoblación que sostiene la inmunidad adaptativa antiviral. Adicionalmente, evito el agotamiento celular de LT.

PALABRAS CLAVE: Anticuerpos, citocinas, COVID-19, inmunoglobulina G, SARS-CoV-2, linfocitos T.

SUMMARY

Immunity against COVID-19 is crucial. Little is known about the mechanisms involved in stimulating antibody production against SARS-CoV-2 by the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the exhaustion of T-cells. **Objective:** To evaluate the IgG (anti-spike) response, TNF- α , T-cell subsets, and their exhaustion. **Methods:** Serum samples and peripheral mononuclear cells of subjects with infection (G1, n=07), asymptomatic (G2, n=08 y G3, n=10) vaccinated with three doses of the BNT162b2 (G1 and G2) or the ChAdOx1-S (G3) vaccines. ELISA determined the level of IgG and TNF- α , and flow cytometry determined the T-cell subsets and exhaustion. **Results:** No change was observed in the levels of IgG before and after vaccination. G1 significantly increased TNF- α levels after receiving the third vaccine dose. Total lymphocytes significantly decreased in G2, but CD3+ did not change. G3 had a reduction in LTCD4+ and an increase in PD-1+, LTCD8+, and PD-1+ before and after the third vaccine dose. A positive correlation was observed after the third vaccine dose in G3 among IgG and CD4+PD-1+(p=0.034) and CD8+PD-1+(p=0.028), respectively. **Conclusions:** Humoral (IgG) and inflammatory (TNF- α) responses were not modified significantly; the heterologous vaccine (G3) increased levels of CD4+ cells, a subset that sustains antiviral adaptative immunity, and avoids T-cell exhaustion.

KEYWORDS: Antibodies, cytokines, COVID-19, immunoglobulin G, SARS-CoV-2, T-Lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

La pandemia causada por el coronavirus tipo 2 induce el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) y causa la COVID-19 ⁽¹⁾. Al momento de este estudio, el Perú atravesaba por una segunda ola, con mayor índice de letalidad e ingreso a las unidades de cuidados intensivos (UCI) debido a las nuevas variantes del virus ⁽²⁻⁴⁾. Al mismo tiempo, la población comenzó a vacunarse, lo que disminuyó no solo las muertes sino también las estancias hospitalarias y, por el lado de la ciencia, se generó el interés por conocer lo que sucede con los mecanismos básicos del sistema inmune ante este estímulo vacunal. Un evento importante es la tormenta de citocinas IFN- α , IFN- γ (interferones tipo alfa y gamma), IL-1 β , IL-6 (interleucinas tipo 1 beta y 6), TNF- α (factor de necrosis tumoral tipo alfa) entre otras) inducida por el virus, pero promovida por distintas células inmunes, lo que lleva a reacciones hiperinflamatorias y procoagulantes. ⁽⁵⁻⁸⁾

El incremento de TNF- α en adultos mayores puede inducir apoptosis en los linfocitos T (LT) ⁽⁹⁾. La linfopenia observada en COVID-19 podría predecirse con los niveles de TNF- α . ⁽¹⁰⁾

La inmunidad adaptativa es un poco más lenta, ya que requiere reconocimiento, procesamiento, presentación y activación del sistema de linfocitos ⁽¹¹⁾. La inmunidad adaptativa celular no solo es importante porque los LT CD4+ estimulan la respuesta por LT CD8+ antivirales, sino también porque colaboran con la producción de anticuerpos a través de un mecanismo T-dependiente ^(12,13). Diao et al. ⁽¹⁴⁾, demostraron que en pacientes con COVID-19 se presenta una disminución de LT totales y subpoblaciones CD4+ y CD8+, además esta disminución tuvo correlación negativa con las concentraciones en suero de TNF- α , IL-6 e IL-10. Tal disminución podría promoverse por una sobre expresión de TNF- α . ^(15,16)

Por otro lado, el agotamiento celular de LT aparece ante la persistencia de antígenos en infecciones virales o cáncer y produce falla en el desarrollo de LTCD8⁺ de memoria y un deterioro en las funciones de LTCD8⁺ efectores ⁽¹⁷⁾. En la fase aguda y convaleciente de la COVID-19 el agotamiento celular se caracteriza por la pérdida gradual y progresiva de las funciones celulares; expresión sostenida de receptores inhibidores o "checkpoints" PD-1 (Receptor de muerte celular programada tipo 1), CTLA-4 (Antígeno 4 de linfocito T citotóxico), NKG2A (Subfamilia K de receptores similares a lectina de células NK) entre otros; cambios en el panorama epigenético-transcripcional y reprogramación metabólica ⁽¹⁷⁻²²⁾. En la COVID-19 se presentan altos porcentajes de LT, CD8⁺PD-1⁺ y CD4⁺PD-1⁺ con altos niveles de PD-1, lo que demuestra que el SARS-CoV-2 induce el agotamiento celular. ^(21,23,24)

En la COVID-19 existe linfopenia y pérdida de la funcionalidad de los linfocitos totales ^(21,23,25,26). Diao B et al. ⁽²³⁾, reportaron que el 82,1% de pacientes con la COVID-19 tenían linfopenia, además, 522 casos tenían alta producción de PD-1 y Tim-3 (inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3) en LT CD4⁺ y CD8⁺. Por tanto, es importante investigar el grado de agotamiento celular en personas vacunadas. Además, debido al rol cooperador de los LT sobre la producción de anticuerpos, la disminución de los niveles de LT afectaría indirectamente los niveles de anticuerpos IgG. Bajo este contexto, el objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento de los niveles de TNF- α , anticuerpos IgG y poblaciones de LT, incluyendo su agotamiento celular, antes y después de la tercera dosis de la vacunación contra el SARS-CoV-2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio exploratorio; los participantes fueron enrolados por el equipo de investigación del Laboratorio de Inmunología # 108 – LID – FACI – UPCH. Los criterios de inclusión fueron: 1. Varones o mujeres mayores de 18 años; 2. Con o sin comorbilidades; 3. Grupo G1 (n=07), contó con un esquema de vacunación de primera y segunda dosis con la vacuna de BNT162b2, tuvo infección entre 0 y 4 meses postvacunación y además recibió una tercera dosis de la misma vacuna; 4. Grupo G2 (n= 08), similar al G1 pero sin infección y 5. Grupo G3 (n=10), similar al grupo G2, pero con tercera dosis de la vacuna ChAdOx1-S. Aunque los G2 y G3 no tuvieron infección, se les catalogó como asintomáticos debido a que no fue posible comprobar la no infección con pruebas antigénicas.

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 25 personas, las cuales se colectaron antes y después de la tercera dosis de vacunación. A partir de estas muestras se obtuvo el suero y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta el momento de las mediciones y las PBMC se procesaron inmediatamente.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en suero humano

Se usaron dos tipos de ELISA cuantitativos, uno indirecto, para medir la concentración de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 (EDITM Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA kit, USA), micropozos revestidos con la proteína recombinante de la nucleocápside (N) y otro tipo sándwich, para medir la concentración de la citocina TNF- α (BD OptEIATM Human TNF ELISA kit II, USA). En ambos casos, se siguieron estrictamente las indicaciones del fabricante.

Citometría de flujo

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas en tubos con EDTA, las PBMC fueron obtenidas por gradiente de centrifugación y sembradas por 24h a 37°C y 5% CO₂ sin otro estímulo adicional. Los porcentajes linfocitarios y el agotamiento celular de LT fueron detectados usando 100 μ l de PBMC, los que fueron coloreados con anticuerpos CD3-PerCp (Cat347344/SK7); CD4-FITC (Cat561842/RPA-T4); CD8-APC (Cat561953/RPA-T8) y PD-1-PE (Cat557946/MIH4), todos de BD Biosciences, USA. Después de la tinción, las PBMC fueron medidas por citometría de flujo en un analizador celular FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos fueron analizados con el paquete de prueba gratis FlowJoTM v10 del Laboratorio de Inmunología.

La estrategia del análisis de citometría de flujo consistió en determinar la población de linfocitos totales por tamaño y granularidad (FSC/SSC) (gráfico 1A); determinación de LT (SSC/CD3⁺) (gráfico 1B); a partir de la región o "gate" de los LT CD3⁺ se determinaron las subpoblaciones de LT citotóxicos (CD8⁺CD4⁻) y helper (CD8⁻CD4⁺) (gráfico 1C) y a partir de cada subpoblación se determinó porcentualmente el nivel de agotamiento celular a través de PD-1, es decir, CD8⁺PD-1⁺ y CD4⁺PD-1⁺ (gráfico 1D y 1E).

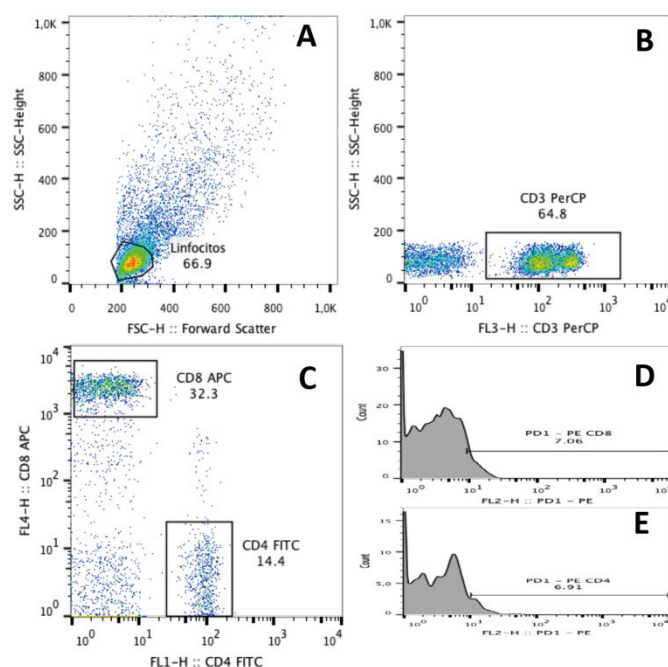


Gráfico 1. Estrategia de análisis de citometría de flujo. **A.** Determinación de la población de linfocitos totales (T, B y NK) de acuerdo con su tamaño y granularidad (FSC/SSC). **B.** A partir del gating o región de linfocitos totales, se determinó la población de LT (SSC/CD3⁺) de acuerdo con su granularidad (SSC) y la señal de fluorescencia del fluorocromo CD3-PerCP. **C.** Mediante gatings o regiones de cuadrados, se seleccionaron las subpoblaciones de LT, CD8⁺CD4⁻ y CD8⁻CD4⁺. **D y E.** A partir de cada subpoblación de LT se realizó una gráfica de histograma que representa el porcentaje de LT, CD8⁺PD-1⁺ y CD4⁺PD-1⁺, respectivamente. El análisis fue realizado con FlowJo X 10.0.7.

Análisis estadístico

Se usó el paquete de prueba gratis GraphPad versión 9 del Laboratorio de Inmunología. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para estimar la distribución de los datos. Cuando los datos de las variables a evaluar pasaban la prueba de normalidad ($p > 0,05$) se eligieron pruebas paramétricas como la prueba t pareada (igual cantidad de datos por grupos a comparar) o no pareada (diferente cantidad de datos por grupos a comparar) y el ANOVA de una vía o "one way" seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples y cuando no pasaban la prueba de normalidad ($p < 0,05$) se eligieron pruebas no paramétricas como la prueba de Wilcoxon. Adicionalmente, cuando fue necesario, se aplicó la prueba de "outliers" para descartar los valores que no seguían el comportamiento de los grupos evaluados. Para graficar los resultados se realizaron gráficas de violín y gráficas de símbolos y líneas. En todos los casos se determinaron valores de mediana con intervalos de confianza al 95%. La correlación estadística fue evaluada con la prueba de Pearson cuando los datos de las variables seguían una distribución normal y con la

prueba de Spearman cuando los datos de las variables no seguían una distribución normal. En ambos tipos de correlaciones se tomó en cuenta el valor de r (Rho) para un intervalo de confianza del 95% y la significancia estadística ($p < 0,05$).

Aspectos éticos

Todos recibieron información del estudio y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Institucional de Ética de UPCH (CONSTANCIA E-111-19-23).

RESULTADOS

Niveles de anticuerpos IgG (anti-N) antes y después de la tercera dosis de vacunación

En G1 fue 572,5 U/ml; IC95% 331,2-1343 y 463,0 U/ml; IC95% 337,6-1024,0 antes y después, respectivamente; en G2 fue 773,5 U/ml; IC95% 238,3-1384,0 y 463,7 U/ml; IC95% 259,7-1348,0 y en G3 (540,9 U/ml; IC95% 268,3-895,4 y 618,9 U/ml; IC95% 385,8-857,7 no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la mediana de concentración de anticuerpos IgG anti-

nucleocápside antes y después de la tercera dosis de vacunación. La mediana del tiempo transcurrido entre antes y después de la vacunación fue G1= 42 días (IC95% 30 – 122 días); G2= 89 días (IC95% 26 – 136 días) y G3= 47,5 días (IC95% 27-135 días) (gráfico 2, tabla 1).

Niveles de TNF- α antes y después de la tercera dosis de vacunación

Únicamente el grupo G1 presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,05$) con una mediana de la concentración de TNF- α mayor después de la tercera dosis (0 pg/ml; IC95%: -8,6-65,29 vs 60,85 pg/ml; IC95% 29,67-83,09); mientras que en los grupos G2 (79,95 pg/ml; IC95% 5,19-153 vs 36,36 pg/ml; IC95% -20,75-342,7) y G3 (0 pg/ml; IC95% -4,14-20,30 vs 0 pg/ml; IC95% -1,6-6,4) no hubo diferencia

entre las medianas antes y después de la tercera dosis (gráfico 3, tabla 1).

Niveles porcentuales de linfocitos totales (T, B y NK), LTCD3⁺, subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ y su agotamiento celular PD-1⁺

El porcentaje de linfocitos totales aumentó significativamente después de la tercera dosis en el grupo G2 (gráfico 4A); no se encontró diferencia en los LT en los grupos de vacunación (gráfico 4B); los porcentajes de LT helper aumentaron y los citotóxicos disminuyeron significativamente (gráfico 4C y D); mientras que el nivel porcentual de agotamiento celular (PD-1⁺) de ambas subpoblaciones disminuyó significativamente después de la vacunación en el grupo G3 (gráfico 4E y F, tabla 1).

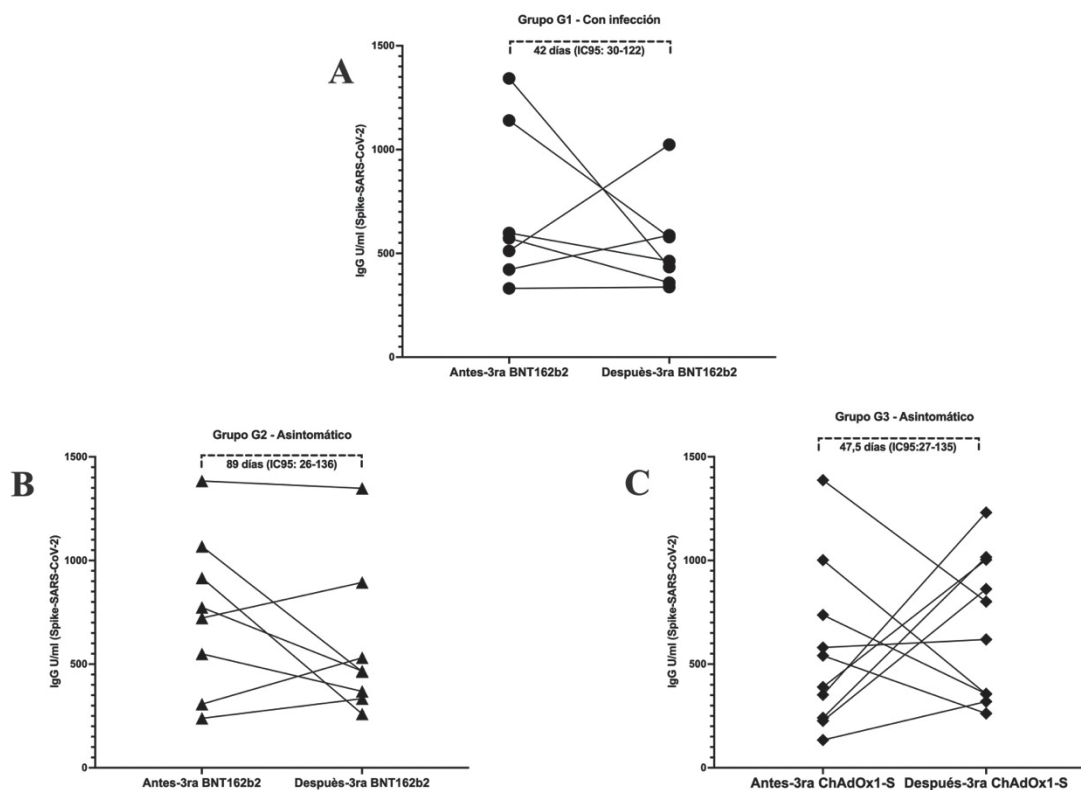


Gráfico 2. Anticuerpos IgG (anti-N-SARS-CoV-2) antes y después de la tercera dosis de vacunación.

Concentración de IgG (U/ml) mediante ELISA en suero antes y después de la tercera dosis de vacunación **A.** G1, n=07. Luego de 0 a 4 meses de haber tenido infección, recibieron la tercera dosis de la vacuna BNT162b2. **B.** G2, n=08. Al momento de la tercera dosis de la vacuna BNT162b2 no tenían infección (asintomáticos). **C.** G3, n=10 al momento de la tercera dosis de la vacuna ChAdOx1-S no tenían infección (asintomáticos). Se indica la mediana y el IC95% de los días transcurridos entre las tomas de muestra.

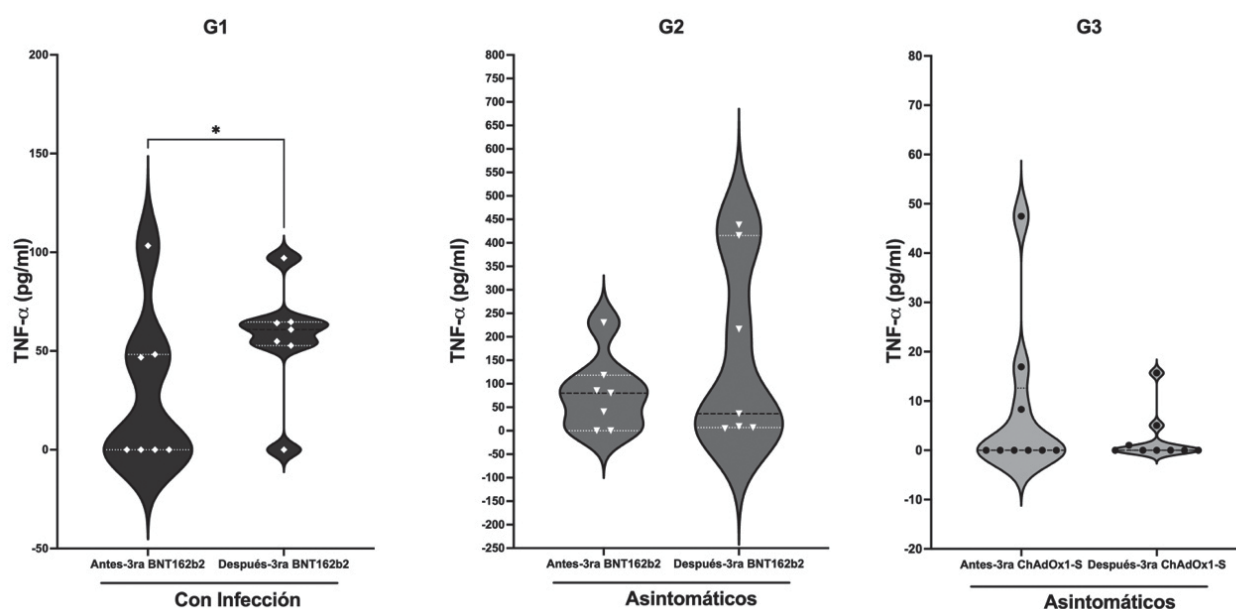


Gráfico 3. TNF- α antes y después de la tercera dosis de vacunación. Concentración de TNF- α (pg/ml) mediante ELISA en suero obtenido antes y después de la tercera dosis de vacunación. Donde G1, n=07 luego de 0 a 4 meses de haber tenido infección recibieron tercera dosis de la vacuna BNT162b2; G2, n=08 al momento de la tercera dosis de la vacuna BNT162b2 no tenían infección (asintomáticos) y G3, n=10 al momento de la tercera dosis de la vacuna ChAdOx1-S no tenían infección (asintomáticos). Significancia estadística si * $p < 0,05$, Prueba t pareada. Se representa la línea mediana de concentración de TNF- α y los límites superior e inferior representan el intervalo de confianza al 95% en gráficos de violín.

Correlación entre IgG (anti-N), TNF- α y poblaciones linfocitarias antes y después de la tercera dosis de vacunación

Se realizó la correlación estadística entre las variables IgG vs. TNF- α ; IgG vs. LTCD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ e IgG vs. LTCD4⁺PD-1⁺/LTCD8⁺PD-1⁺ (datos no publicados). Únicamente se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa después de la tercera dosis de vacunación en el grupo G3 entre la concentración de anticuerpos IgG y las subpoblaciones de CD4⁺PD-1⁺ ($p=0,034$; $r=0,6848$) y CD8⁺PD-1⁺ ($p=0,028$; $r=0,6485$), respectivamente (gráfico 5).

DISCUSIÓN

El estudio es de tipo exploratorio y pretende contar con evidencia que permita ahondar en el estudio de los mecanismos inmunes afectados antes y después de la tercera dosis de vacunación homóloga o heteróloga contra el SARS-CoV-2.

En el análisis individual de las variables medidas se encontró un aumento estadísticamente significativo de TNF- α después de la tercera dosis de la vacuna de BNT162b2 en G1; sin embargo, analizando el valor estadístico de $p=0,05$ y el tamaño muestral bajo llegamos a la conclusión que no se puede aseverar certeramente el resultado de que la vacuna induce el aumento de una citocina pro inflamatoria, el que es posible que sea un rezago de la etapa de infección con SARS-CoV-2 por la que atravesó el grupo G1 (tuvo infección entre 0 a 4 meses después de las dos primeras dosis de la vacuna de BNT162b2). Otro aspecto a tener en cuenta es que, los niveles encontrados son tan bajos (<100 pg/ml) que no se puede atribuir a esta citocina un efecto tal como un shock tóxico e inflamación o agotamiento celular sobre células como los LTCD4⁺ como lo indican Aguillón JC. et al. ⁽²³⁾ y Diao B. et al. ⁽²⁷⁾, respectivamente.

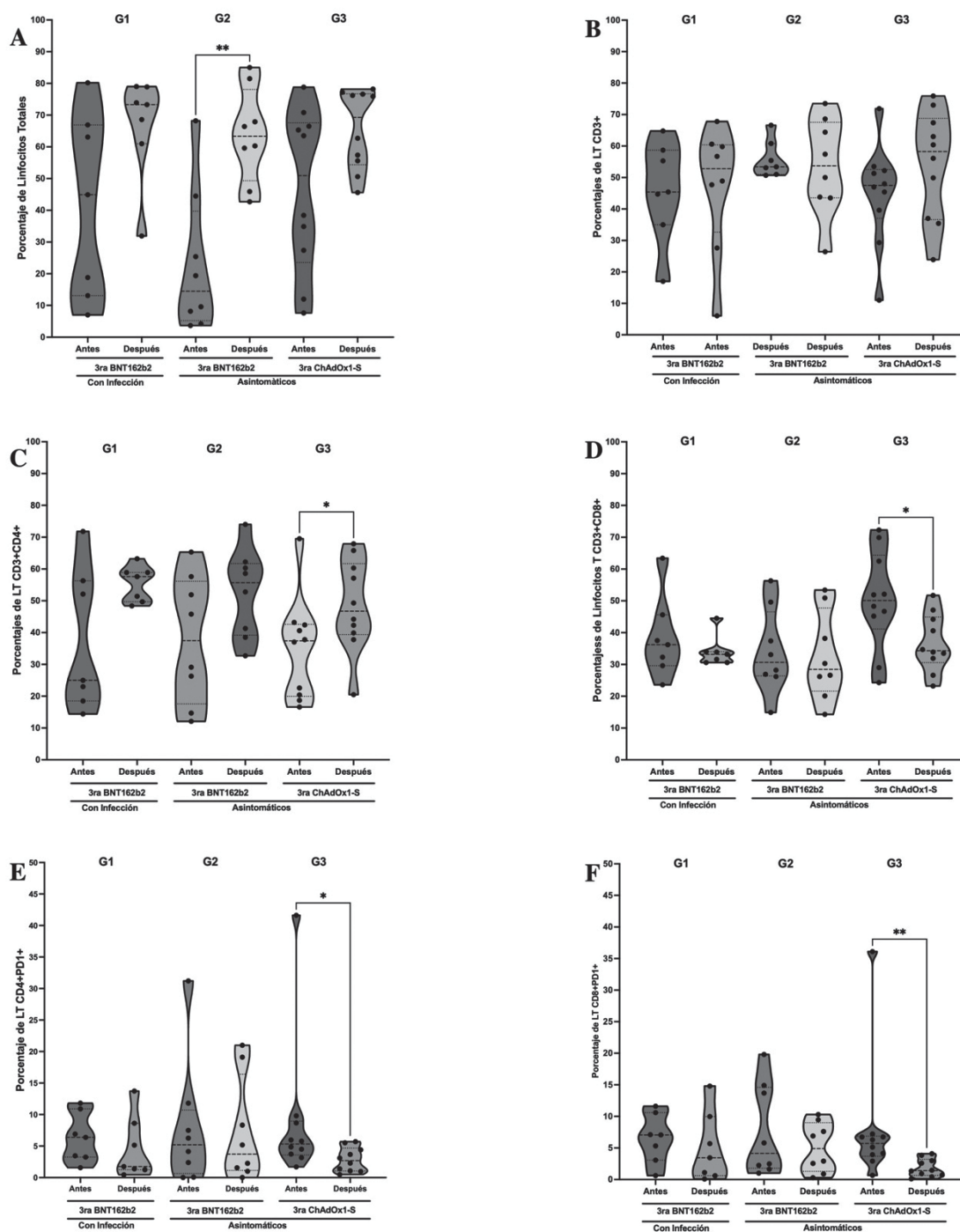


Gráfico 4. Porcentajes de linfocitos totales, LT, subpoblaciones y su nivel de agotamiento celular antes y después de la tercera dosis de vacunación. Porcentajes poblacionales de linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad (FSC/SSC) para linfocitos totales (A) y fluorescencia para LT, CD3+ (B), subpoblaciones CD4+ (C) y CD8+ (D) y agotamiento celular PD-1+ (E y F) antes y después de la tercera dosis de vacuna. Donde G1, n=07 luego de 0 a 4 meses de haber tenido infección, recibieron tercera dosis de vacuna BNT162b2; G2, n=08 al momento de la tercera dosis de vacuna BNT162b2 no tenían infección (asintomáticos) y G3, n=10 al momento de la tercera dosis de vacuna ChAdOx1-S no tenían infección (asintomáticos). Significancia estadística si * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$. Prueba T pareada (A, G2; (C y D), G3 y Prueba de Wilcoxon pareada (E y F), G3. Se representa la línea mediana de concentración del porcentaje poblacional y los límites superior e inferior representan el intervalo de confianza al 95% en gráficos de violín.

Tabla 1. Niveles de anticuerpos IgG, citocinas TNF- α y porcentajes poblacionales de LT antes y después de la tercera dosis de vacunación homóloga o heteróloga.

Parámetro	Grupos	Antes tercera dosis (mediana, U/ml)	IC95% (U/ml)	Después tercera dosis (mediana, U/ml)	IC95% (U/ml)	p
IgG (U/ml)	G1	572,5	331,2 – 1343	463,0	337,6 – 1024	0,4648
	G2	773,5	238,3 – 1384	463,7	259,7 – 1348	0,2188
	G3	540,9	268,3 – 895,4	618,9	385,8 – 857,7	0,8203
TNF- α (pg/ml)	G1	0,0	-8,6 – 65,29	60,85	29,67 – 83,09	0,0500*
	G2	79,95	5,19 – 153	36,6	20,75 – 342,7	0,3700
	G3	0	-4,14 – 20,30	0	-1,6 – 6,4	0,3730
LTotales (%)	G1	44,9	14,96 – 69,05	73,30	51,35 – 81,96	0,1562
	G2	14,49	3,80 – 41,98	63,35	51,10 – 76,23	0,0046*
	G3	50,95	28,14 – 64,90	69,30	56,57 – 74,63	0,1309
LT CD3 ⁺ (%)	G1	45,40	30,91 – 60,78	53,40	50,47 – 61,25	0,2164
	G2	52,80	29,79 – 64	53,70	40,41 – 66,49	0,1380
	G3	47,50	33,40 – 56,44	58,25	41,80 – 66,60	0,2341
LT CD4 ⁺ (%)	G1	25	16,61 – 57,99	57,60	50,27 – 60,62	0,0530*
	G2	37,45	21,09 – 54,61	55,70	40,86 – 64,24	0,1485
	G3	37,40	23,38 – 46,38	46,75	38,06 – 58,96	0,0364
LT CD8 ⁺ (%)	G1	36,20	26,28 – 50,35	33,20	29,59 – 38,52	0,4688
	G2	30,65	22,85 – 45,30	28,45	20,79 – 44,21	0,5538
	G3	50,10	39,05 – 61,39	34,30	30,28 – 43,20	0,0273*
LT CD4 ⁺ PD1 ⁺ (%)	G1	6,38	2,71 – 9,94	1,73	0,03 – 9,16	0,5966
	G2	5,19	-0,62 – 16,45	3,72	0,35 – 14,25	0,6406
	G3	5,30	0,57 – 17,35	2,69	1,48 – 4,22	0,0371*
LT CD8 ⁺ PD1 ⁺ (%)	G1	7,06	2,87 – 10,09	3,45	0 – 10,20	0,6491
	G2	4,14	1,56 – 13,83	4,91	1,83 – 8,39	0,3849
	G3	5,71	0,77 – 15,20	1,41	0,82 – 2,87	0,0059

IC95%: Intervalo de confianza al 95%; U/ml= Unidades por mililitro; IgG= Inmunoglobulina G; TNF- α = Factor de necrosis tumoral tipo alfa; LT= Linfocitos T; CD= Cluster of differentiation (grupos de diferenciación); PD-1= Receptor de muerte celular programada tipo 1; p= valor de significancia estadística; *= valor estadísticamente significativo.

La concentración de anticuerpos IgG (anti-N) en todos los grupos de vacunación no cambió después de la tercera dosis de vacuna, lo que significa que al menos en la mediana de tiempo de los tres grupos (47,5 días; IC95% 42-89 días) los niveles de anticuerpos se mantienen y pueden proteger a los vacunados independientemente del esquema de vacunación.

Nuestro resultado concuerda con los estudios sobre la cinética de anticuerpos inducidos por la vacunación que indican que después de las dos primeras dosis se alcanza un pico de producción de anticuerpos que con un booster o tercera dosis se puede mantener títulos constantes de anticuerpos. ⁽²⁸⁾

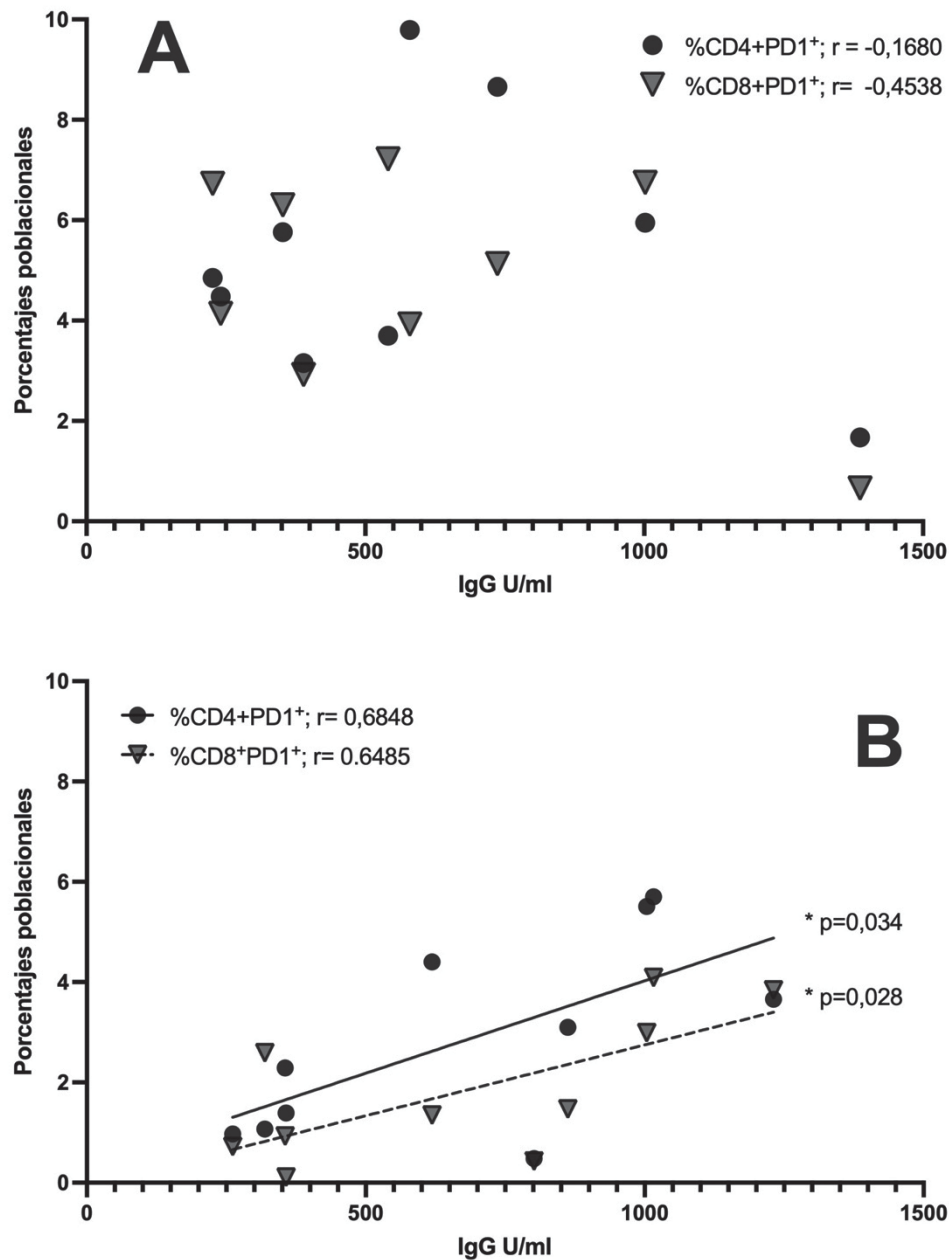


Gráfico 5. Correlación entre la concentración de anticuerpos IgG (anti-N-SARS-CoV-2) y los porcentajes poblacionales de LT, CD4+PD-1+ y CD8+PD-1+ después de la tercera dosis de vacunación. Correlación estadística de Pearson entre la concentración de IgG (U/ml) y los porcentajes de CD4+PD-1+ y CD8+PD-1+, respectivamente antes (A) y después (B) de la tercera dosis de vacuna. G3, n=10 al momento de la tercera dosis de vacuna ChAdOx1-S no tenían infección (asintomáticos). Significancia estadística si $p < 0,05$; Rho (r) para un intervalo de confianza de 95%.

La evaluación de los niveles porcentuales de LT indica que el mejor esquema de vacunación es el G3 o heterólogo, en el que después de la administración de la vacuna de ChAdOx1-S se incrementan los LT helper, que son vitales para sostener la respuesta de anticuerpos y LT citotóxicos, pero además reduce el

agotamiento celular de ambas subpoblaciones de LT, lo que mejoraría la respuesta celular contando con células con señales de coestimulación activen más eficientemente cuando el sistema inmune se enfrente a una infección por SARS-CoV-2.

En este estudio exploratorio se planteó la posibilidad de la existencia de una correlación entre las variables del eje IgG-TNF- α -LT, en la que la inducción de TNF- α podría causar linfopenia con lo que habría una disminución o agotamiento celular de LT, que a su vez afectaría la producción de anticuerpos antivirales. Únicamente se encontró que a mayor concentración de IgG (anti-SARS-CoV-2) mayor agotamiento celular en las subpoblaciones porcentuales de LT. Este resultado es contradictorio porque se esperaría que los LT mejoren su nivel de activación, pero el incremento de células PD-1⁺, una molécula inhibidora de la activación del LT, indicaría lo contrario; sin embargo, para corroborar esta hipótesis se tendría que evaluar LT-antígeno específicos contra SARS-CoV-2. Esta contradicción en el agotamiento celular de subpoblaciones de LT cuando se evalúan individualmente o comparados a una variable como la concentración de IgG anti-SARS-CoV-2 se debería dilucidar con LT antígeno-específicos a SARS-CoV-2, ya que es posible que LT que presentan mayor agotamiento celular a mayor concentración de IgG anti-SARS-CoV-2 se deba a LT con otras especificidades. De comprobarse este agotamiento celular antígeno-específico, se podría corregir la falta de funcionalidad de los LT con inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-PD-1 en el tratamiento de la COVID-19, como lo experimentó Roy S. et al.⁽²⁹⁾ en un modelo animal de herpes ocular.

En personas con cáncer, los efectos de la vacunación (Sinopharm) sobre el tratamiento anti-PD-1 no son afectados y, más bien, la administración de ambos mejora las señales coestimuladoras y reduce la regulación co-inhibidora.⁽³⁰⁾

Tras los resultados obtenidos, se plantea la pregunta si es necesario, medidas profilácticas adicionales como el uso de anticuerpos monoclonales, además de las dosis de refuerzo.

Existen LT que aumentan su nivel de agotamiento celular y, por lo tanto, la investigación futura es importante para determinar la respuesta inmune a largo plazo a dosis adicionales de la vacuna.

Dentro de las principales limitaciones de este estudio se encuentran, no haber podido catalogar laboratorialmente como sujetos sin infección a los grupos G2 y G3, limitándonos a describir lo indicado por el donante, por tal razón, preferimos denominarlos asintomáticos; el bajo tamaño muestral, lo que probablemente influye en las diferencias estadísticas

encontradas particularmente en la medición de TNF- α (G1) donde a pesar de existir una diferencia significativa ($p=0,05$), el valor limítrofe impide concluir con certeza un evento pro inflamatorio postvacunación en el grupo G1. Es posible que se requieran más puntos de medición en el tiempo para las variables, concentración de anticuerpos y citocinas. Además, de TNF- α sería interesante medir otras citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1. En el caso de IL-6 se conoce su influencia sobre la producción de anticuerpos; sin embargo, con este estudio se abren nuevas vías de estudio en la infección por SARS-CoV-2.

En conclusión, en este estudio exploratorio se observó que el esquema de vacunación heterólogo del grupo G3 fue el mejor, ya que incrementó los niveles de LT CD4⁺, una subpoblación que sostiene la inmunidad adaptativa antiviral y evitó el agotamiento celular de las subpoblaciones de LT con lo que se evidencia una mejora de la respuesta inmune celular; sin embargo, es posible que el costo de mantener el nivel de anticuerpos se correlacione positivamente con el agotamiento celular de las subpoblaciones de LT. Ninguno de los esquemas de vacunación modificó significativamente la respuesta humoral (IgG) e inflamatoria (TNF- α), manteniéndolas en un nivel de normalidad frente a la vacunación.

Agradecimientos:

El grupo de investigación del Laboratorio de Inmunología # 108, Facultad de Ciencias e Ingeniería, UPOCH agradece al Dr. César Núñez Ponce, Director de IMUNEN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? J Med Virol. 2020 Jul 1;92(7):719–25.
2. Agencia EFE. Segunda ola lleva a Perú a rebasar los 100,000 fallecidos en pandemia respecto a años anteriores | PERU | GESTIÓN. [citado el 20 de junio de 2023]; Disponible en: <https://gestion.pe/peru/segunda-ola-lleva-a-peru-a-rebasar-los-100000-fallecidos-en-pandemia-respecto-a-anos-antiguos-noticia/>
3. Ministerio de Salud. Minsa declara el fin de la quinta ola de la COVID-19 en el país – CDC MINSA [Internet]. [citado el 20 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/informativo/prensa/minsa-declara-el-fin-de-la-quinta-ola-de-la-covid-19-en-el-pais/>
4. Ministerio de Salud. Minsa descarta una sexta ola de covid-19 en el país - Noticias - Ministerio de Salud -

- Plataforma del Estado Peruano [Internet]. [citado el 20 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/741412-minsa-descarta-una-sexta-ola-de-covid-19-en-el-pais/>
5. Ragab D, Salah Eldin H, Taemah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org [Internet]. 2020 [citado el 17 de junio de 2023];1:1446. Disponible en: www.frontiersin.org
6. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(6):e46–7. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30216-2. Epub 2020 Apr 27.
7. Fara A, Mitrev Z, Rosalia RA, Assas BM. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! *Open Biol*. 2020;10(9) :200160. doi: 10.1098/rsob.200160. Epub 2020 Sep 23.
8. Sarzi-Puttini P, Giorgi V, Sirotti S, Marotto D, Ardizzone S, Rizzardini G, et al. COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(2):337–42. doi: 10.55563/clinexprheumatol/xcday. Epub 2020 Mar 22.
9. Gupta S, Bi R, Kim C, Chiplunkar S, Yel L, Gollapudi S. Role of NF- κ B signaling pathway in increased tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. *Cell Death Differ* [Internet]. 2005 [citado el 18 de junio de 2023];12:177–83. Disponible en: www.nature.com/cdd
10. Chen DP, Wen YH, Lin WT, Hsu FP. Association between the side effect induced by COVID-19 vaccines and the immune regulatory gene polymorphism. *Front Immunol*. 2022 Oct 26;13: 941497. doi: 10.3389/fimmu.2022.941497.
11. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 10Th ed. Philadelphia: Elsevier. 2021.
12. Jordan SC. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. 2021 Jun; 204(3):310–320. doi: 10.1111/cei.13582. Epub 2021 Mar 4.
13. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. Jun;26(6):845–848. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
14. 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 May 1; 11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
15. Morris G, Bortolasci CC, Puri BK, Olive L, Marx W, O'neil A, et al. The pathophysiology of SARS-CoV-2: A suggested model and therapeutic approach. *Life Sci*. 2020 Oct 1; 258:118166. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118166. Epub 2020 Jul 31.
16. Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell*. 2020;183(1):143–157.e13.
17. Rha MS, Shin EC. Activation or exhaustion of CD8 + T cells in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2021;18. Doi: 10.1038/s41423-021-00750-4
18. Alahdal M, Elkord E. Exhaustion and over-activation of immune cells in COVID-19: Challenges and therapeutic opportunities. *Clin Immunol*. 2022; 245:109177. Doi:10.1016/j.clim.2022.109177.
19. Shahbaz S, Xu L, Sligl W, Osman M, Bozorgmehr N, Mashhour S, et al. The Quality of SARS-CoV-2-Specific T Cell Functions Differs in Patients with Mild/Moderate versus Severe Disease, and T Cells Expressing Coinhibitory Receptors Are Highly Activated. *J. Immunol*. 2021 Aug 15;207(4):1099–111. Doi: 10.4049/jimmunol.2100446
20. Gurshaney S, Morales-Alvarez A, Ezhakunnel K, Manalo A, Huynh TH, Abe JI, et al. Metabolic dysregulation impairs lymphocyte function during severe SARS-CoV-2 infection. *Commun Biol*. 2023 Dec 1; 6(374). Doi: 10.1038/s42003-023-04730-4.
21. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front. Immunol*. 11:580237. doi: 10.3389/fimmu.2020.580237.
22. Haanen JB, Cerundolo V. NKG2A, a New Kid on the Immune Checkpoint Block. *Cell*. 2018 Dec 13;175(7):1720–1722. Doi: 10.1016/j.cell.2018.11.048.
23. 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 May 1; 11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
24. 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 May, 17(5): 533–535. Doi: 10.1038/s41423-020-0402-2

25. Jafarzadeh A, Jafarzadeh S, Nozari P, Mokhtari P, Nemati M. Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID-19: Possible mechanisms. *Scand J Immunol.* 2021 Feb;93(2):e12967. doi: 10.1111/sji.12967. Epub 2020 Sep 14.
26. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J Clin Invest.* 2020 Sep 1;130(9):4694-4703. doi: 10.1172/JCI138554.
27. Aguillón J, Escobar A, Ferreira F, Aguirre A, Ferreira L, Molina M, et al. Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated ex vivo blood culture assays. *Eur Cytokine Netw.* 2001 Mar;12(1):105-10.
28. Cheng ZJ, Huang H, Zheng P, Xue M, Ma J, Zhan Z, et al. Humoral immune response of BBIBP COVID-19 vaccination before and after the booster immunization. *Allergy.* 2022 Aug;77(8):2404-2414. doi: 10.1111/all.15271. Epub 2022 Mar 16.
29. Roy S, Coulon PG, Srivastava R, Vahed H, Kim GJ, Walia SS, et al. Blockade of LAG-3 immune checkpoint combined with therapeutic vaccination restore the function of tissue-resident anti-viral CD8+ T cells and protect against recurrent ocular herpes simplex infection and disease. *Front Immunol.* 2018 Dec 17; 9:2922. doi: 10.3389/fimmu.2018.02922.
30. Mei Q, Hu G, Yang Y, Liu B, Yin J, Li M, et al. Impact of COVID-19 vaccination on the use of PD-1 inhibitor in treating patients with cancer: A real-world study. *J Immunother Cancer* 2022 Mar;10(3):e004157. doi:10.1136/jitc-2021-004157.