

Elena Morte Romea

Respuesta inmune en la
infección por SARS-CoV
-2

Director/es

Paño Pardo, José Ramón
Pardo Jimeno, Julián

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR
SARS-COV-2**

Autor

Elena Morte Romea

Director/es

Paño Pardo, José Ramón
Pardo Jimeno, Julián

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2022



Departamento de
Medicina, Psiquiatría
y Dermatología
Universidad Zaragoza

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2

ELENA MORTE ROMEA

TESIS DOCTORAL

Para optar al grado de
DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA
POR LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2022



Departamento de
Medicina, Psiquiatría
y Dermatología
Universidad Zaragoza

Tesis Doctoral

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2

Licenciada en Medicina
Elena Morte Romea

Directores
José Ramón Paño Pardo
Julián Pardo Jimeno

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
2022

Esta tesis se acompaña de la siguiente publicación:

Iratxe Uranga-Murillo*, Elena Morte*, Sandra Hidalgo*, Cecilia Pesini, Sandra García-Mulero, José L. Sierra, Llpsy Santiago, Maykel Arias, Diego De Miguel, María del Mar Encabo-Berzosa, Borja Gracia-Tello, Rebeca Sanz-Pamplona, Luis M. Martínez-Lostao, Eva M. Gálvez, José R. Paño-Pardo**, Ariel Ramírez-Labrada**, and Julián Pardo**.

Integrated analysis of circulating immune cellular and soluble mediators reveals specific COVID19 signatures at hospital admission with utility for prediction of clinical outcomes. *Theranostics* 2022; 12(1): 290-306. doi: 10.7150/thno.63463

Se puede consultar en el enlace: <https://www.thno.org/ms/acceptms>

* Estos autores han contribuido de forma igualitaria

** Estos autores comparten autoría senior y de correspondencia

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

A José Ramón, mentor, maestro, compañero y amigo. Por abrirme todas las puertas que están a tu alcance, y también las que no lo están. Por ofrecerme un millón de oportunidades y hacerme camino en el tan inaccesible mundo de las enfermedades infecciosas. Por enseñarme a ser mejor médico y mejor persona. Gracias porque al satisfacer mi vocación, me devolviste la alegría y la pasión en el trabajo. Te debo todo lo que consigo.

A Julián, por tu generosidad y tu cercanía. Gracias por dejarnos colaborar en todos tus proyectos, aunque nuestra aportación sea minúscula. Gracias por tus incansables (y adaptadas) explicaciones.

Es un regalo trabajar con vosotros, dos mentes tan brillantes y a la vez tan humildes y cercanas.

A Pilar Luque, por apoyarme siempre y cuidar de nosotros. Por tus lecciones y tus historias extraordinarias y ser siempre el hombro al que todos acudimos.

A Ariel, por tu disponibilidad y tu disposición para solucionar cualquier duda, aunque sea de lo más básico.

A Santiago, Isabel y Pepa, y a todo el equipo del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico. Gracias por acogerme y enseñarme cada día.

A mis suegros, por cuidar nietos con un pie en Sevilla y otro en Zaragoza, y a mis cuñados Lucía y Chori, por hacerlo posible.

A Víctor, por apoyarme en cada momento y con cada decisión. Por no negarme ninguna ambición laboral ni personal, por muy descabelladas que sean. Por cuidarme como me cuidas, por tu buen humor constante, tu sonrisa matutina y tu amor hacia mí y hacia mi familia. Por respetar y apoyar tanto mi vocación y no poner nunca ningún problema.

A mi padre, mis hermanas y mis cuñados. Por estar siempre disponibles, por no cansarse de llamarme para ver cómo estoy o por presentarse en casa cada vez que era necesario. Por las cenas familiares y por tantas, tantas, palabras de consuelo, de ánimo y de esperanza.

A mi madre, porque te fuiste antes de ver este proyecto finalizado, pero estoy segura de que la seguirás desde otro sitio. Te debo todo lo que soy y todo lo que sé. Gracias por enseñarnos a ser independientes, fuertes y valientes. Por ser una incondicional de nosotras, por tus lecciones de vida y tus reflexiones únicas, a las que todos acudíamos. Fuiste admirable hasta el último momento, espero poder llegar a ser como tú.

A Paula, porque, aunque te fuiste antes de llegar, me has hecho fuerte y me has enseñado, a pesar de todo, a ser agradecida con la vida. Cada nana que canto y cada cuento que lea son para ti también.

A Iker, por devolvernos la luz y la alegría en nuestra casa.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Coronavirus e infecciones por coronavirus en humanos	8
1.2 SARS-CoV-2: filogenia, principales características y origen	11
1.3 Fisiopatología de la infección por SARS-CoV-2.....	14
1.4 Clínica y mortalidad. Factores de riesgo para desarrollar una infección grave	14
1.5 Infectividad y mecanismos de transmisión	16
1.6 Respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2	18
1.6.1 Respuesta inmune innata	18
1.6.2 Respuesta inmune adaptativa	21
1.6.3 Homeostasis de la respuesta inmune	23
1.6.4 Relación entre la susceptibilidad al SARS-CoV-2 y la regulación de la respuesta inmune ...	25
1.6.5 Duración de la inmunidad frente al SARS-CoV-2.....	32
2. ANTECEDENTES	38
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	42
3.1 Hipótesis principal.....	42
3.2 Hipótesis secundarias.....	42
3.3 Objetivo general.....	42
3.4 Objetivos específicos.....	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1 Población y ámbito de realización del estudio.....	46
4.2 Diseño del estudio.....	47
4.3 Recogida de las muestras.....	51
4.4 Procesamiento de las muestras	52
4.4.1. Tinción, paneles de anticuerpos y citometría de flujo	52
4.4.2. Análisis multidimensional de los datos obtenidos por citometría de flujo.....	53
4.4.3. Análisis de proteínas plasmáticas	54
4.4.4. Actividad de granzimas en suero.....	55
4.5 Análisis clínico	55
4.6 Análisis estadístico	55
4.7 Aspectos éticos.....	57
5. RESULTADOS	62
5.1 Variables clínicas y demográficas	62
5.2 Análisis comparativo de poblaciones celulares, interleuquinas y quimioquinas entre COVID-19, no-COV-ITR e ID.....	64

5.2.1 COVID-19 en comparación con HDs	64
5.2.2 COVID-19 en comparación con no-COV-ITR.....	74
5.2.3 COVID-19 en comparación con Infección descartada.....	82
5.3 Correlación del pronóstico de la infección por SARS-CoV-2 con poblaciones celulares y niveles de citoquinas y otros inmunomoduladores solubles	87
5.3.1 Con la gravedad al ingreso.....	87
5.3.2 Con la mortalidad.....	101
5.4 Correlación entre actividad de granzimas e inflamación	108
5.5 Descripción de marcadores analíticos inflamatorios (ferritina, procalcitonina y proteína C reactiva) y de coagulación (INR, APTT, Dímero D) y su correlación con inmunomoduladores solubles	108
5.6 Análisis multivariante de marcadores predictivos del diagnóstico de la infección, evolución y mortalidad	110
6. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	115
7. DISCUSIÓN	122
8. CONCLUSIONES	134
9. ANEXO 1.....	140
10. BIBLIOGRAFÍA	144

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACE2: Enzima convertora de angiotensina tipo 2, del inglés “*Angiotensin-Converting Enzyme 2*”

APTT: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado, del inglés “*Activated Partial Thromboplastin Time*”

ARN: Ácido ribonucleico

CCL: Quimioquina con motivo CC

CXCL: Quimioquina con motivo CXC

CD: Clúster de Diferenciación

CDs: Células Dendríticas

cMon: Monocitos Clásicos

CoVs: Coronavirus

Ct: Umbral de Ciclo, del inglés “*Cycle threshold*”

CV: Carga Viral

DD: Dímero D

FCS: Suero fetal bovino, del inglés “*Fetal Calf Serum*”

FIS: Fecha de Inicio de Síntomas

Gzm: Granzima

Gzm A KO: Deficientes en Granzima A, del inglés “*Knockout Gzm A*”

HCoVs: Coronarivirus Humanos, del inglés “*Human Coronavirus*”

HCULB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa

HDs: Donantes sanos, del inglés “*Health Donors*”

ICIs: Puntos de control inmune inhibitorios, del inglés “*Immune Checkpoints*”

ID: Infección Descartada

IIS Aragón: Instituto de Investigación Sanitaria Aragón

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

iMon: Monocitos Intermedios

INR: Ratio internacional normalizado, del inglés “*International Normalized Ratio*”

ISGs: Genes estimulados por interferón, del inglés “*Interferon Stimulated Genes*”

LAG3: Gen de activación linfocitaria 3, del inglés “*Lymphocyte Activating Gen 3*”

LT: Linfocitos T

LTCD4⁺: Linfocitos T Cooperadores

LTCD8⁺: Linfocitos T Citotóxicos

LTh: Linfocitos T cooperadores o *helper*

MERS-CoV: Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio, del inglés "*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*"

MIC – A: Proteínas relacionadas con la cadena de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, del inglés "*MHC Class I chain – related proteins*"

MTs: Metaclústeres

MST: Árbol de Expansión Mínimo, del inglés "*Minimum Spanning Tree*"

n.s.: No significativo

ncMon: Monocitos no clásicos

No-CoV-ITR: Infecciones respiratorias no COVID-19

NF- κ B: Factor nuclear κ B, del inglés "*Nuclear Factor- κ B*"

NK: Células Asesinas naturales, del inglés "*Natural Killer*"

NKG2A: Receptor de células NK grupo 2 miembro A, del inglés "*NK group 2 member A*"

NKG2C: Receptor de células NK grupo 2 miembro C, del inglés "*NK group 2 member C*"

NKG2D: Receptor de células NK grupo 2 miembro D, del inglés "*NK group 2 member D*"

sNKG2DL: Ligandos solubles del receptor NKG2D (familias MIC y ULBP) del inglés "*Soluble NKG2D Ligand*"

OR: *Odds ratio*

p: Significación obtenida en las pruebas de contraste de hipótesis

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés "*Pathogen-Associated Molecular Patterns*"

PBS: Solución salina tamponada con fosfato, del inglés "*Phosphate Buffered Saline*"

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica, del inglés "*Peripheral Blood Mononuclear Cell*"

PD1: Proteína de muerte celular programada 1, del inglés "*Programmed Cell Death Protein 1*"

PCR: Proteína C Reactiva

PCT: Procalcitonina

Q: Cuartil

RBD: Dominio de Unión al Receptor, del inglés *“Receptor Binding Domain”*

Rpm: Revoluciones por minuto

RLRs: Receptores similares a RIG-I o gen inducible por ácido retinoico, del inglés *“Retinoic Acid-inducible Gene I-like Receptors”*

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, del inglés *“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”*

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones del inglés *“Pattern Recognition Receptors”*

SARS-CoV-2: Coronavirus tipo 2 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, del inglés *“Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2”*

SARS-CoV: Coronavirus tipo 1 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, del inglés *“Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 1”*

SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo

SOM: Mapa autoorganizado, del inglés *“Self-organizing map”*

TCR: Receptor para antígeno de células T, del inglés *“T Cell Antigen Receptor”*

TIM3: Mucina 3 de la inmunoglobulina de células T, del inglés *“T cell Immunoglobulin Mucin 3”*

TNF: Factor de necrosis tumoral, del inglés *“Tumor Necrosis Factor”*

TLRs: Receptores de tipo Toll, del inglés *“Toll-like Receptors”*

TMPRSS2: Proteasa de serina transmembrana 2, del inglés *“Transmembrane protease serine 2”*

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

ULBP: Proteína de Unión a UL16, del inglés *“UL16 Binding Protein”*

VRS: Virus Respiratorio Sincitial

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Coronavirus e infecciones por coronavirus en humanos

Los coronavirus (CoVs) son una familia de virus que afectan a humanos y animales y se encuentran ampliamente extendidos por el mundo. En humanos, son responsables de infecciones de vías respiratorias de gravedad variable (desde afectación leve del tracto respiratorio superior hasta neumonías graves que requieren ventilación mecánica invasiva) y, en menor frecuencia, infecciones gastrointestinales.

En el orden de los *Nidovirales*, pertenecen a la familia *Coronaviridae* (subfamilia *Orthocoronavirinae*) y se clasifican en cuatro géneros de acuerdo con su estructura genética (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*). Desde 1960, se han identificado siete coronavirus capaces de producir patología en humanos (HCoVs) entre los géneros *Alphacoronavirus* (HCoV-229E y HCoV-NL63) y *Betacoronavirus* (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio [MERS-CoV, del inglés *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*], Coronavirus tipo 1 y 2 causantes de Síndrome Respiratorio Agudo Grave [SARS-CoV y SARS-CoV-2, del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 1 and 2*]) (Tabla 1). Los HCoVs OC43, 229E, NL63 y HKU1 circulan globalmente y son responsables del resfriado común.

En noviembre de 2002 se describió el primer brote causado por SARS-CoV en Guangdong, China. Se infectaron 8098 personas con una tasa de mortalidad del 9%, afectando a un total de 26 países de Asia, Europa, Canadá y Norteamérica. Su control se produjo a finales de 2003 y desde entonces sólo han tenido lugar pequeños brotes relacionados con laboratorios y contacto con animales infectados (civetas de las palmeras y murciélagos). Se transmite principalmente por gotas, aunque existen otros mecanismos menos frecuentes como el feco-oral y aéreo. Al igual que SARS-CoV-2, es responsable de infecciones graves respiratorias y posible progresión a Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA). Una de las principales claves en el control de la infección fue la baja contagiosidad de este virus durante la fase prodrómica

Alphacoronavirus	Betacoronavirus	Deltacoronavirus	Gammacoronavirus
<ul style="list-style-type: none"> • TGEV Purdue P115 • PCRV ISU-1 • Bat CoV • HKU2/GD/430/2006 • Human CoV 229E • Human CoV NL63 • Bat CoV 1^a • Bat CoV HKU8 • Hipposideros Bat CoV • HKU10 • Bat CoV CDPHE • PEDV • Scotophilus Bat CoV 512 	<ul style="list-style-type: none"> • PHEV VW572 • MHV-A59 C12 • Human CoV OC43 • Human CoV KHU1 • Bat CoV • Bat CoV HKU 4-1 • MERS CoV • SARS-CoV • Bat CoV HKU9-3 • Bat CoV HKU9-1 • SARS-CoV-2 • Bat SARS CoV Rm1 • Bat SARS CoV Rf1 • Bat SARS CoV HKU 3-1 • Bat SARS like CoV Rp3 • SARS-like CoV W1V16 • Bat SARS-like CoV 21v1 	<ul style="list-style-type: none"> • NT CoV HKU19 • Wigeon CoV HKU20 • CM CoV HKU21 • Munia CoV HKU13 • Thrush CoV HKU13 • Bulbul CoV HKU11 • White-eye CoV HKU16. 	<ul style="list-style-type: none"> • AIBV • Beluga Whale CoV Sw1

Tabla 1. Árbol filogenético de los coronavirus. Están resaltados aquellos con capacidad infectiva al ser humano.

y la ausencia de transmisión asintomática, lo que permitía aislar al enfermo una vez empezaran los síntomas y aumentara la carga viral en las secreciones respiratorias¹.

Una década después, en septiembre de 2012, apareció un nuevo coronavirus como agente causal de un brote de neumonía en Arabia Saudí. Denominado Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV, del inglés *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), afectó a más de 2400 personas en 27 países, con una tasa de mortalidad del 34.4%. Es menos transmisible que otros HCoV, y la mayor parte de los casos siguen teniendo lugar en la península arábiga o en viajeros procedentes de esta zona². Al igual que SARS-CoV, MERS-CoV puede afectar al tracto respiratorio inferior, presentando las formas más graves SDRA.

En diciembre de 2019 China informó de varios casos de neumonía de características virales de etiología no determinada. El primer brote identificado ocurrió en un mercado de animales en la ciudad de Wuhan en el que rápidamente se infectaron más de 50 personas. Se reprodujeron casos similares sin contacto con dicho mercado en las siguientes semanas, lo que sugirió la posibilidad de una transmisión entre personas³. Dos semanas más tarde se identificó el agente causal como un nuevo coronavirus (2019-nCoV). En febrero de 2020 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus lo denominó SARS-CoV-2 y la Organización Mundial de la Salud utilizó el término COVID-19 para definir la enfermedad causada por este virus⁴. A fecha de septiembre de 2021, ha afectado a 230 millones de personas en todo el mundo y causado más de cuatro millones de muertes⁵.

Retrospectivamente, en estudios serológicos de donantes de sangre de diciembre de 2019 en territorio estadounidense se encontraron anticuerpos específicos de SARS-CoV-2, un mes antes del primer caso oficialmente registrado, por lo que el virus probablemente circulaba fuera de China antes de la detección de los primeros brotes⁶.

De esta forma, SARS-CoV-2 es el tercer HCoV responsable de una epidemia/pandemia en humanos durante este último siglo.

1.2 SARS-CoV-2: filogenia, principales características y origen

SARS-CoV-2 es un *betacoronavirus*, genéticamente similar en un 80% a SARS-CoV (7), concretamente a SARS-like bat CoVs, mientras que se aleja del genoma de MERS-CoV. Comparte con SARS-like bat CoVs (RaTG13) un 96.2 % de la secuenciación genética⁸, mientras que solo alcanza un 50% con MERS-CoV⁷.

Los SARS-like bat CoVs no pueden infectar directamente a humanos, a no ser que se produzca una mutación o recombinación genética que lo permita. Tampoco su hábitat natural suele estar en contacto con áreas de actividad humana, por lo que se cree que ha sido necesario un huésped intermedio que haya permitido el salto inter-especies: se ha documentado una identidad genética del 82% entre los CoVs encontrados en los pangolines y el SARS-CoV-2, por lo que se piensa que este animal ha podido ser un hospedador intermedio que permitiera el paso para dar lugar a la infección en humanos, así como lo fueron las civetas de las palmeras y los dromedarios para SARS-CoV y MERS-CoV respectivamente⁹. Estos saltos inter-especies se generan a partir de la replicación continuada de ARN viral, acumulando mutaciones que pueden generar cambios en la secuencia de aminoácidos y codificando nuevas proteínas que permiten modificar la maquinaria del virus, posibilitando así nuevas especies capaces de infectar a otros huéspedes¹⁰. Aunque la hipótesis del salto inter-especies, con o sin un hospedador intermedio que todavía no ha sido identificado definitivamente es la más probable, el origen del salto de SARS-CoV-2 sigue sin ser conocido completamente, no pudiendo descartarse otras hipótesis como un accidente de laboratorio¹¹.

Se trata de un virus esférico de entre 65 y 125 nanómetros de diámetro, con una envuelta de bicapa lipídica y que contiene una única cadena de ARN monocatenario de una longitud de alrededor 29,9 kilo bases. El genoma de SARS-CoV-2 codifica 4 proteínas estructurales: la proteína S (*spike protein*), la proteína E (*envelope*), la proteína M (*membrane*) y la proteína N (*nucleocapsid*); y otras accesorias. La proteína N se encuentra en el interior del virión asociada al ARN viral, y las otras tres proteínas están asociadas a la envuelta viral. La proteína S (con forma de espigas) se encuentra en la

envoltura lipídica, otorgando la característica morfología de corona (Figura 1). Esta proteína contiene dos subunidades, S1 y S2, las cuales actúan como dominio de unión al receptor (RBD, del inglés *Receptor Binding Protein*) y de fusión a membranas de las células que infecta, condicionando el tropismo del virus. Dado su papel crucial en la infección de las células, dentro de S1 y S2 se encuentran varios epítomos, objetivo de los anticuerpos neutralizantes producidos por el sistema inmune del hospedador¹². Esta misma proteína alberga el Dominio Terminal-N, otro de los objetivos antigénicos de los anticuerpos. A través de estas proteínas se produce la fusión entre la membrana viral y celular, liberando el genoma viral al interior de las células humanas (Imagen 1 y 2). SARS-CoV-2 se inactiva por luz ultravioleta y por una exposición a la luz solar o por una incubación de al menos 30 minutos a más de 56°C. Además, es sensible a la mayoría de los desinfectantes habituales¹³.

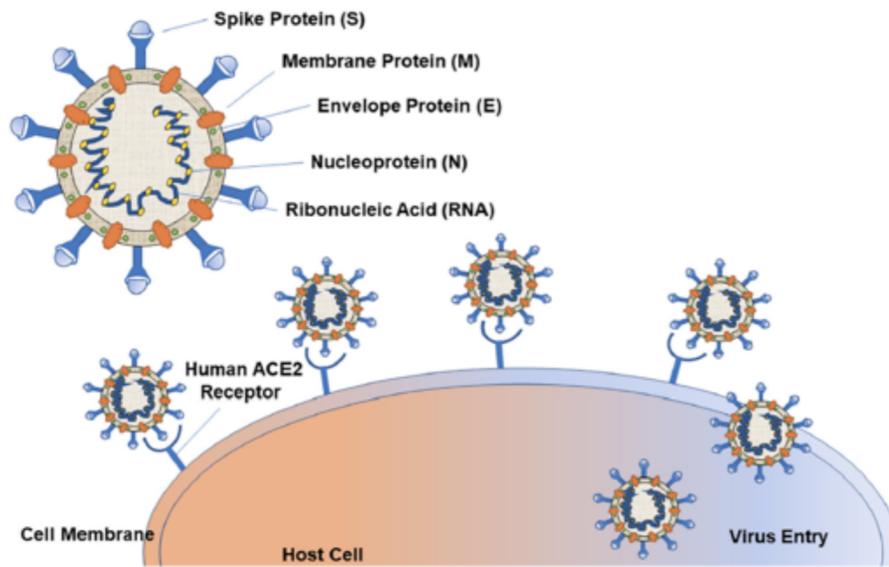


Figura 1 (12). Representación esquemática de la estructura viral y su mecanismo de entrada a la célula huésped.

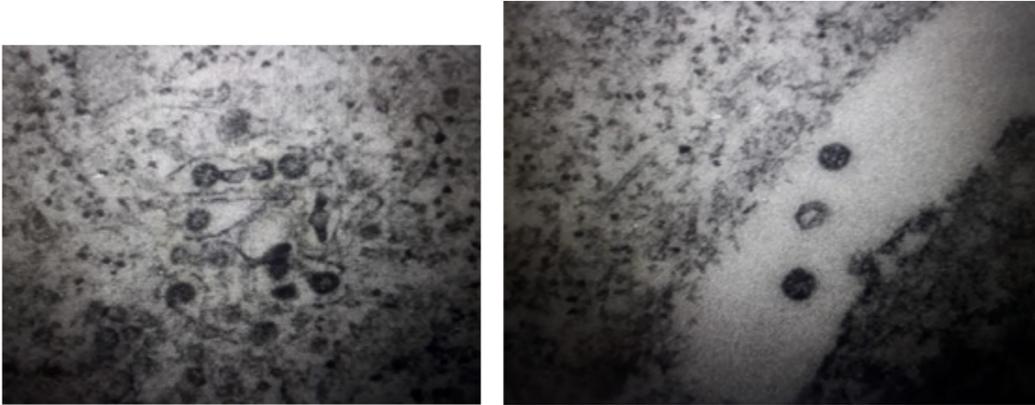


Imagen 1 y 2. Microscopia electrónica de SARS-CoV-2 en un cultivo de células VERO, aislado en mayo de 2020 de un paciente con COVID-19 del HCULB (cedidas por Julián Pardo).

Desde su detección inicial en diciembre de 2019, se han identificado numerosas variantes genéticas de SARS-CoV-2, alarmantes por su posible mayor virulencia, habilidad de transmisión o escape inmunitario. Algunas de ellas se han producido bajo determinadas circunstancias (zonas geográficas y momentos concretos) que han favorecido la replicación de estas variantes y su expansión mundial. Se piensa que estas variantes han podido surgir como consecuencia de la evolución adaptativa natural del virus a través de la replicación viral mantenida en un mismo individuo que podría tener deficiencias en la inmunidad o estar sometido a algún tipo de presión selectiva mediante un tratamiento antiviral. Las variantes más preocupantes presentan mutaciones en el RBD de la proteína S, contra las cuales se ha visto que existe una menor capacidad neutralizante de sueros convalecientes que contra la versión original de SARS-CoV-2, lo que ha posibilitado la expansión global de estas variantes incluso entre población con inmunidad previa. La variante *Alpha* o B.1.1.7, inicialmente conocida como variante británica y mundialmente extendida, se generó a partir de la variación genética N501Y en la RBD. Esta variante tiene una mayor habilidad de transmisión y diseminación y se supone más contagiosa. Han surgido otras múltiples variantes preocupantes, principalmente por la posible reducción en la neutralización inmune, como la *Beta* B.1.351 (Sudafricana), portadora también de mutaciones en la RBD (N501Y, E484K), la *Gamma* (Brasileña), la *Delta* (India), la *Kappa*... ¹⁴.

1.3 Fisiopatología de la infección por SARS-CoV-2

La enzima convertidora de Angiotensina 2 (ACE2, del inglés *Angiotensin-Converting Enzyme 2*), proteína transmembrana considerada el receptor celular de SARS-CoV, también es la molécula receptora de SARS-CoV-2 y condiciona el tropismo del huésped. Está distribuida en diferentes tejidos, como células del epitelio respiratorio (incluido tracto olfatorio), cardíacas, renales, digestivas y endotelio vascular, lo que explica los síntomas y las complicaciones más habituales de la infección.

La interacción entre SARS-CoV-2 y ACE2 está mediada por el RBD de la proteína S, a través de la cual el virión se une a la célula. Posteriormente se produce una fusión entre la membrana viral y celular, de forma que cada virión puede verter su material genético en la célula, entre el que se encuentra una ARN polimerasa capaz de replicar el ARN viral. Esta fusión de membranas requiere de un cambio conformacional en la proteína S mediante la activación proteolítica de algunos miembros de la familia de proteasas de las catepsinas, enzimas presentes en casi todas las células humanas. A diferencia de otros HCoV, SARS-CoV-2 posee además otras secuencias genómicas extra que codifican puntos de corte diferentes en la proteína S que permiten la acción de otras proteasas como la furina y la proteasa de serina transmembrana de tipo 2 (TMPRSS2, del inglés *Transmembrane protease serine 2*). Éstas actúan de modo secuencial sobre los nuevos viriones replicados, activando así su proteína S para fusionarse directamente con otras células humanas, condicionando un mayor tropismo del virus por las células y generando una transmisión más eficiente¹⁵.

1.4 Clínica y mortalidad. Factores de riesgo para desarrollar una infección grave

El espectro clínico de la enfermedad por SARS-CoV-2 es muy amplio: se calcula que alrededor de un 20% de las infecciones son asintomáticas, aunque la falta de una definición homogénea y de un diagnóstico y seguimiento adecuado de esta subpoblación probablemente hagan que esta cifra sobreestime la realidad¹⁶. El tiempo

medio de incubación de la enfermedad es de 5 días, aunque en algunos casos se puede prolongar hasta 10-12 días.

De entre aquellas que son sintomáticas, se consideran leves o moderadas (con o sin neumonía) alrededor de un 80%, graves (por desarrollo de SDRA) en un 15% y críticas en el 5%¹⁷. En pacientes hospitalizados la mortalidad alcanza un 28%, siendo mayor en aquellos pacientes que desarrollan insuficiencia respiratoria, son mayores de 80 años, tienen mayor carga de comorbilidad o cuando reciben atención médica con un sistema sanitario saturado¹⁸. La clínica más habitual de presentación es fiebre, tos, artromialgias, ageusia y anosmia, con posible evolución a neumonía bilateral. Los casos graves pueden ocurrir al comienzo de la infección, aunque las observaciones clínicas sugieren una enfermedad de “dos pasos”, comenzando con una presentación leve-moderada, seguida por un deterioro respiratorio que tiene lugar entre el noveno y duodécimo días tras el inicio de los síntomas. Este deterioro respiratorio coincide con la aparición radiológica de infiltrados pulmonares, linfopenia y elevación de reactantes inflamatorios¹⁹. Los síntomas digestivos (diarrea, náuseas y vómitos) son menos frecuentes, y suelen presentarse especialmente al inicio de la infección y en población pediátrica. Las formas más graves de la enfermedad evolucionan a neumonía bilateral con SDRA y fracaso respiratorio. Se han descrito también formas fulminantes de infección por SARS-CoV-2 con disfunción multiorgánica y elevada mortalidad, denominada por algunos autores como “sepsis viral”²⁰. Las complicaciones más frecuentemente recogidas son el tromboembolismo pulmonar y el SDRA. También se han descrito manifestaciones neurológicas mediadas por autoanticuerpos como el síndrome de Guillain-Barré y situaciones de hiperinflamación en niños, similares a la enfermedad de Kawasaki^{21,22}.

Los factores de riesgo asociados a las formas más graves de la infección, necesidad de ingreso en unidades de cuidados intensivos y mortalidad son el sexo masculino, la edad avanzada, el tabaquismo y enfermedades de base como la hipertensión arterial, la enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus, obesidad y enfermedad onco-hematológica²³.

1.5 Infectividad y mecanismos de transmisión

La afinidad de SARS-CoV-2 por su receptor ACE2 en tracto respiratorio y conjuntiva es hasta 20 veces superior que la mostrada por SARS-CoV, lo que se traduce en una diseminación mucho más eficiente. Esto es debido tanto a diferencias estructurales en las proteínas de superficie que confieren una mayor capacidad de adhesión e invasión de las células respiratorias²⁴, como a la adquisición del punto de corte de la furina.

El principal mecanismo de transmisión de SARS-CoV-2 es respiratorio, a través de gotas eliminadas por las secreciones de una persona infectada que entran en contacto con las mucosas de otra persona, especialmente en contactos estrechos y prolongados. La contaminación de objetos o superficies por estas partículas genera fómites con capacidad infectiva al entrar en contacto de forma directa o indirecta (manos) con las mucosas de otra persona. Sobre superficies u objetos contaminados, y en determinadas circunstancias ambientales puede permanecer viable hasta 72 horas²⁵. El riesgo de transmisión depende de muchos factores, entre los que se encuentran el grado de contacto, la ventilación, el grado de infectividad (cantidad de carga viral y producción de síntomas) y otros factores socioeconómicos, siendo esta transmisión especialmente eficiente en reuniones socio-familiares. La tasa de infección secundaria entre convivientes se establece entre un 4 y un 35%²⁶.

La contribución de la transmisión por aire a la expansión de la pandemia en condiciones ambientales naturales ha sido fuente de controversia. La transmisión aérea se produce a través de la inhalación de partículas virales más pequeñas que las gotas respiratorias (aerosoles), capaces de permanecer suspendidas y viables en el aire durante un determinado tiempo y distancia. Se ha encontrado ARN de SARS-CoV-2 viable en muestras de aire tomadas tras la producción controlada de aerosoles en condiciones experimentales hasta durante 3 y 16 horas^{25,27}. La transmisión a través de este mecanismo es posible en procedimientos hospitalarios generadores de aerosoles en ausencia de medidas de protección eficaces. Fuera de este entorno en el análisis de determinados brotes y eventos de supertransmisión, se ha demostrado la existencia de

este mecanismo combinado seguramente con transmisión respiratoria. Todos ellos ocurrieron tras una estancia prolongada en lugares cerrados con escasa ventilación y aglomeración de personas^{28,29,30}.

SARS-CoV-2 se elimina también por heces y orina³¹, aunque hasta la fecha parece que este mecanismo de transmisión es poco relevante.

Se ha detectado presencia de ARN viral en el tracto respiratorio entre dos y tres días antes del inicio de los síntomas, con un nivel pico el mismo día de inicio de los síntomas y una curva rápida en descenso durante los siguientes 8 días en la mayor parte de los pacientes. Pacientes oligo-sintomáticos y pre-sintomáticos son portadores de una gran cantidad de carga viral en su tracto respiratorio, similar a la encontrada en pacientes con infección grave. Esta transmisión asintomática o pre-sintomática probablemente colabore en la gran capacidad de diseminación de SARS-CoV-2^{26,32}.

Este ARN, detectado a través de frotis nasofaríngeo mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR, del inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) puede estar presente durante varias semanas tras la infección, sin implicar la presencia de virus viable. Esto es debido a que pueden quedar detritus virales residuales no competentes asociados a vesículas intracelulares que les protegen de la degradación enzimática. La habilidad de SARS-CoV-2 para replicar en cultivos celulares probablemente sea un marcador más fiable de viabilidad, aunque no es una técnica práctica y reproducible en los laboratorios asistenciales. Se ha visto que la contagiosidad desaparece en la mayor parte de los pacientes leves y moderados en el día décimo tras el inicio de los síntomas y alrededor del día decimoquinto en los pacientes críticos e inmunodeprimidos. La máxima duración de virus viable se documentó inicialmente en el día vigésimo tras el inicio de los síntomas³³, aunque más tarde se reportó el caso de infección por SARS-CoV-2 persistente en un varón inmunodeprimido, encontrando virus viable en cultivo en el día 143 tras el diagnóstico³⁴.

1.6 Respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2

1.6.1 Respuesta inmune innata

En términos generales, una vez un virión es integrado en la célula se activa su replicación viral. Las células infectadas detectan la presencia del virus mediante el reconocimiento de ARN aberrante procedente de esta replicación y otros productos virales como glicoproteínas, polisacáridos o lipoproteínas, los cuales se conocen como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Estos PAMPs son reconocidos por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*), los cuales activan la respuesta inmune mediante la transcripción de genes señalizadores que se codificarán en proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria, conocidas como citoquinas. En concreto, el ARN de SARS-CoV-2 es reconocido, entre otros, por PRRs de la familia Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*) y Receptores similares a RIG-I o gen inducible por ácido retinoico (RLRs, del inglés *Retinoic Acid-inducible Gene I-like Receptors*), principales implicados de la detección de la invasión de virus ARN (Influenza, VIH, *West Nile*...) ^{35,36}. Las citoquinas son proteínas secretadas por macrófagos, mastocitos, neutrófilos y otras células implicadas en la respuesta inmune innata, que actúan sobre otras células favoreciendo la activación o inhibición de los mecanismos de defensa. En el caso de la respuesta antiviral, se producen citoquinas conocidas como Interferón tipo I (IFN-I) y la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor- κ B*), el cual induce la proliferación celular y la expresión de otras citoquinas, como las interleuquinas (IL) y las quimioquinas (CCL, CXCL). Las IL se encargan de regular funciones moduladoras inflamatorias en la respuesta inmune como la activación, diferenciación y proliferación de otras células defensoras. Por su parte, las quimioquinas regulan la migración y extravasación celular hacia los tejidos inflamados.

El IFN-I es una citoquina producida mayoritariamente por células epiteliales, células dendríticas (CDs) y monocitos, tras el reconocimiento de PAMPs del patógeno. Sus dos tipos principales, α y β , son señales cruciales en la generación de un ataque inmunológico adecuado frente a las infecciones virales. Estimula también la

transcripción de genes estimulados por IFN (ISGs del inglés, *Interferon Stimulated Genes*) en otras citoquinas proinflamatorias que se encargan directamente de la inhibición viral y el reclutamiento de células inmunológicas para reparar tejidos dañados y generar una respuesta adaptativa prolongada.

A través de la vía del IFN-I y NF- κ B se dispara la respuesta inmune innata del huésped, con la generación y diferenciación de otras células inflamatorias como monocitos y CDs que actuarán como células presentadoras de los antígenos a los linfocitos T (LT). Los monocitos se clasifican en tres grandes grupos según la expresión en su superficie de los clústeres de diferenciación (CD) CD14 y CD16: la población mayoritaria expresa niveles altos de CD14, pero no de CD16 y son denominados monocitos clásicos (cMon); los monocitos no clásicos (ncMon) expresan niveles bajos de CD14 y elevados de CD16; los monocitos intermedios (iMon) expresan ambos clústeres. La función de los cMon es madurar hacia macrófagos que se encargarán de funciones fagocitarias, mientras que la función de los ncMon es reparar lesiones endoteliales³⁷.

Monocitos, macrófagos y CDs van a producir nuevas citoquinas como IL1, IL6, IL12 e IL15, otros IFNs y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor*), las cuales activan los procesos de angiogénesis y hematopoyesis, estimulando la proliferación de otras células defensoras como células Asesinas Naturales o células NK (del inglés, *Natural Killer*) y neutrófilos que volverán de nuevo al epitelio respiratorio para hacer frente al virus. Esta primera respuesta es la responsable de la fase inicial de inflamación en el tracto respiratorio superior.

Las células NK o células asesinas naturales son linfocitos con actividad citotóxica que no requiere la presentación del antígeno y no disponen de Receptor de Antígeno de Células T (TCR, del inglés *T Cell Antigen Receptor*)^{38,39}. Se caracterizan fenotípicamente por la expresión en su membrana del clúster de diferenciación CD56, y la ausencia del marcador característico de las células T, CD3. Existen diferentes subpoblaciones de células NK que muestran distintos estados de maduración. Las dos principales subpoblaciones se identifican por los niveles de expresión de CD56 y CD16: la mayoría tienen un nivel de expresión bajo de CD56 y elevado de CD16 (NK^{CD56Dim}), mientras que

el resto tienen niveles elevados de expresión de CD56 y bajos de CD16 (NK^{CD56Bright}). La primera de las subpoblaciones suele estar ligada a una mayor actividad citotóxica (secreción de perforina, granzimas o ligandos de muerte), mientras que la segunda se corresponde con funciones de inmunorregulación (producción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α). Las células NK pueden presentar en su superficie receptores de diferenciación (CD57) que se expresan tras una exposición previa a determinados antígenos o citoquinas generando un tipo específico de células NK adaptativas con funciones de memoria inmunitaria. También pueden presentar receptores de activación (Ej.: NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2C) e inhibición (Ej.: KIRDLs, ILT2, NKG2A) los cuales reconocen ligandos específicos en la membrana de otras células, a través de los que se regula la maduración y activación de las células NK. Algunos de estos receptores activadores e inhibidores también se encuentran en los LT y son conocidos como puntos de control inmune inhibitorios (ICIs, del inglés *Immune Checkpoints*). Se definen como cualquier molécula involucrada en la regulación de la respuesta inmune, tanto en referencia en un sentido positivo como negativo, que se encargan de regular la tolerancia de las células de defensa frente a tejidos sanos y asegurar una respuesta eficiente contra las células dañadas. De este modo, si las señales de activación que recibe la célula NK son superiores a las de inhibición, la célula NK se activará y ejercerá sus funciones efectoras sobre la célula infectada o transformada (38). También existen ligandos solubles (sNKG2DL, del inglés *Soluble NKG2D Ligand*) de los receptores de activación que se secretan al medio extracelular y que tras unirse a los receptores de activación en la membrana de las células NK o LTCD8⁺ pueden bloquear su función impidiendo el reconocimiento de las células dañadas. Los más conocidos son las formas solubles de los ligandos de las familias MIC (Proteínas relacionadas con la cadena de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad [MIC, del inglés *MHC Class I chain – related proteins*]) y ULBP (Proteína de Unión a UL16 [ULBP del inglés *UL16 Binding Protein*]), que se unen al receptor de activación NKG2D compitiendo con los ligandos de la membrana de la célula diana y bloqueando las señales de activación de este receptor. Estos ligandos solubles están expresados en niveles muy bajos o ausentes en sujetos sanos, pudiendo aumentar su producción ante situaciones de estrés celular como una infección viral o una transformación celular⁴⁰. Existe un subtipo de LT, perteneciente al sistema inmune innato que comparte características comunes de células NK y linfocitos

T, y que se caracteriza por la expresión de CD56 y CD3 (Imagen 3).

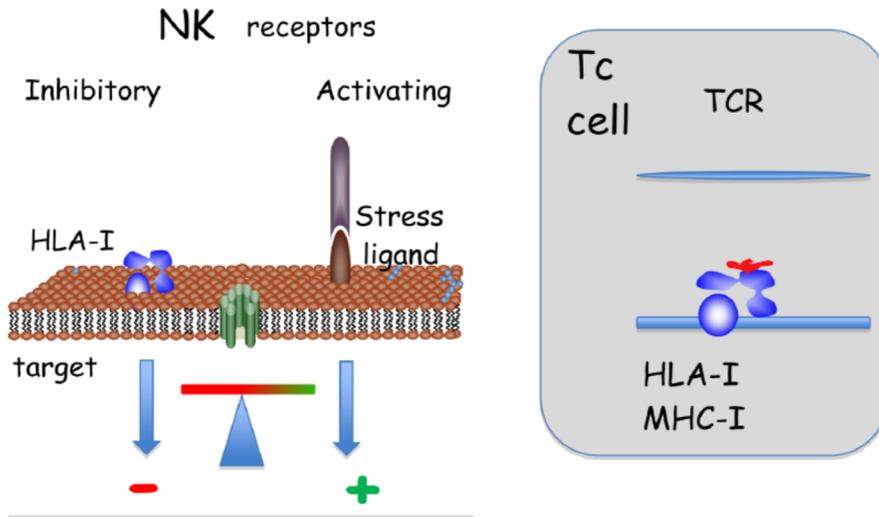


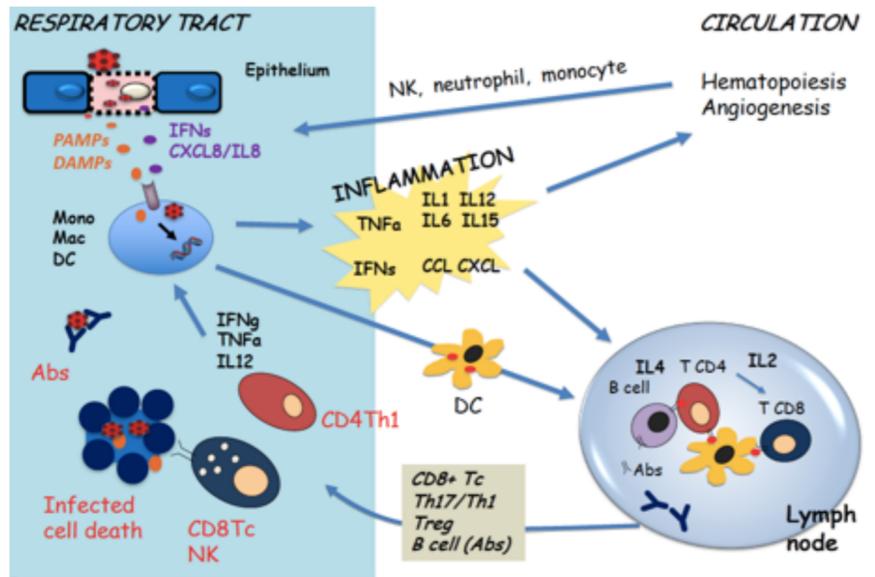
Imagen 3. Las células NK regulan sus funciones de activación e inhibición al entrar en contacto sus receptores con células dañadas o ligandos solubles. Los Linfocitos T se pueden activar directamente por contacto del antígeno con el TCR.

1.6.2 Respuesta inmune adaptativa

En la segunda fase de respuesta inmune adaptativa, los antígenos virales procesados a partir de proteínas del virus son presentados por CDs y monocitos en los ganglios linfáticos a los LT. Estos, caracterizados por la expresión diferencial en su membrana de CD3, se activarán por contacto del antígeno con el TCR, expresando en su membrana marcadores de activación (HLA-DR⁺, CD38⁺) y convirtiéndose así en LT efectores productores de otras citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL2), quimioquinas (CXCL9, CXCL10, CXCL11) y moléculas citotóxicas (perforina y granzimas)⁴¹. Los linfocitos T CD4⁺ (LTCD4⁺) se denominan linfocitos T *cooperadores o helper* (LTh) y existen varios tipos; en la respuesta antiviral los más importantes son los Th1, especializados en la defensa contra patógenos intracelulares⁴¹. Producirán nuevamente citoquinas (IFN- γ , TNF- α e IL12) que retornarán al lecho respiratorio para tratar de inhibir la replicación viral. Los linfocitos T CD8⁺ (LTCD8⁺) tienen funciones citotóxicas, destruyendo células epiteliales infectadas por el virus a través de enzimas proteolíticas vertidas por gránulos (granzimas y perforina). Estos mecanismos de citotoxicidad son compartidos por células NK. Las

granzimas tienen un papel protector frente a infecciones y cáncer, aunque en algunos procesos infecciosos como la sepsis bacteriana se ha demostrado su papel patogénico. Se trata de una familia de serin proteasas producidas entre otros por LT y células NK con actividad citotóxica e inflamatoria. Las granzimas A (Gzm A) y B (Gzm B) son las más frecuentes y mejor caracterizadas en humanos: Gzm A ejerce una acción predominantemente extracelular mediante la atracción de citoquinas, y Gzm B presenta una actividad citotóxica mediante la penetración en la célula a través de la perforina y la lisis celular. Producidas de forma descontrolada, dan lugar a un estado de hiperinflamación que acaba provocando daño tisular y orgánico característico de las respuestas desproporcionadas a la infección, como una sepsis o un shock séptico. En modelos animales y humanos sus niveles se encuentran elevados en este tipo de infecciones y se han asociado a un peor pronóstico⁴². Ratones deficientes en Gzm A (GzmA KO, del inglés GzmA *knockout*) mostraban una mayor supervivencia tras provocarles una infección intraabdominal por inoculación intraperitoneal de *Brucella microti* o punción cecal, con menor expresión de marcadores inflamatorios en suero y líquido peritoneal, sin verse afectado el control de la carga bacteriana^{41,43}. En una cohorte de pacientes con sepsis secundaria a peritonitis, la Gzm A también se encontraba elevada⁴³. En el caso de la infección por SARS-CoV-2, todavía se desconoce el papel que pueden tener estas proteasas.

Más tarde, los linfocitos B se diferenciarán en células plasmáticas capaces de producir anticuerpos específicos. En algunos casos estos anticuerpos tendrán capacidad neutralizante, y podrán contener y neutralizar partículas virales extracelulares, consiguiendo así el control de la replicación viral y su eliminación. Algunos de los LT efectores se convertirán en linfocitos T de memoria en la fase de convalecencia, los cuales se recuperarían también ante una reinfección. La respuesta adaptativa se genera entre el sexto y el décimo día desde el inicio de la infección, debido a la necesidad de proliferación y diferenciación de las células naïve en células T y B efectoras (Imagen 4).



The inflammatory immune response in patients with COVID19 and its prognostic value. Pardo Jimeno J. The 2020 ECCVID Congress.

1.6.3 Homeostasis de la respuesta inmune

En condiciones normales una vez el virus ha sido aclarado, la cascada inflamatoria debe autolimitarse para evitar respuestas inflamatorias desproporcionadas. Para ello, se debe generar una muerte inducida por activación celular mediante la apoptosis programada de las células inflamatorias que estará condicionada a la unión de ligandos (FasL, TNF- α , TRAIL) con los respectivos receptores de muerte celular que existen en dichas células. Existen otros mecanismos que contribuyen a esta inactivación como la generación de citoquinas antiinflamatorias (como por ejemplo el TGF- β) o los denominados puntos de control inmune inhibitorios (ICIs) como TIM3 (Mucina 3 de la inmunoglobulina de células T; del inglés *T cell Immunoglobulin Mucin 3*), LAG3 (Gen Activador de Linfocitos 3; del inglés *Lymphocyte Activating Gen 3*) o PD1 (Proteína de muerte celular programada 1; del inglés *Programmed Cell Death Protein 1*)^{44,45}. Estos ICIs son moléculas reguladoras que, mediante la unión a su ligando, llevan al “agotamiento” funcional de los linfocitos T y células NK, perdiendo éstos su capacidad de proliferar y diferenciarse. Tras la inactivación de la respuesta inmune únicamente persistirá la memoria inmunológica, que es la que confiere inmunidad a largo plazo a través de linfocitos B, LTCD4⁺ y LTCD8⁺ de memoria de SARS-CoV-2 y NK adaptativas, las cuales se activarán si el patógeno entra

en contacto de nuevo con el epitelio respiratorio.

La activación regulada y eficiente de una respuesta inmune es clave para el control de las infecciones virales, antes de que el patógeno aumente su replicación y dispare una respuesta inmune exacerbada y desregulada que acabe produciendo daño tisular y progresión de la enfermedad. Esta situación daría lugar a una producción excesiva de citoquinas, la cual generaría a su vez una proliferación descontrolada de otras células inflamatorias, pudiendo causar SDRA y fracaso respiratorio. Ocurre de forma similar en la respuesta inmune generada en las infecciones bacterianas, cuando se produce fracaso renal, disfunción vascular o coagulopatía. Paradójicamente, esta excesiva respuesta inflamatoria conduce posteriormente a un agotamiento y anergia celular (alteración de las poblaciones linfocitarias, disminución en la capacidad de presentación de antígenos y cambios en el perfil de citoquinas), con el consiguiente estado de inmunosupresión y, por tanto, un aumento de otras infecciones secundarias⁴².

Esta dicotomía entre control inmune de la infección e inmunopatogénesis está representada en algunas infecciones por HCoV. La patogenia de la infección por SARS-CoV ha sido estudiada mediante la inoculación de cepas adaptadas en ratones. En las formas más severas de la infección se documentó una intensa respuesta inmune innata atribuida a una hiperactivación de macrófagos y monocitos y producción suprafisiológica de IL y CCL/CXCL, además de una disminución en los LTCD8⁺ efectores. Esta pérdida de LTCD8⁺ se relacionó con la gravedad de la infección. Así, el trasplante de LTCD8⁺ sobre modelos animales infectados aceleró el aclaramiento de la carga viral y mejoró la situación clínica⁴⁶. Estudios en humanos también correlacionaron el daño tisular pulmonar con elevados niveles de IL y CC/CXCL más allá del séptimo día de evolución de la enfermedad. También se observó la capacidad de SARS-CoV de antagonizar señales de activación medidas por IFN-I o inhibir los receptores de PAMPs, desarrollando una habilidad conocida como “inmuno-evasión viral”. Este retraso en la generación de una señal antiviral innata adecuada mediada por IFN-I producía una desregulada respuesta de IL, quimioquinas y células inflamatorias como monocitos y macrófagos que se acumulaban en el pulmón, lo que podía ser causa de la inmunopatogénesis⁴⁷.

1.6.4 Relación entre la susceptibilidad al SARS-CoV-2 y la regulación de la respuesta inmune

Desde un punto de vista clínico, la infección por SARS-CoV-2 presenta una naturaleza dual: desde infecciones letales en algunos pacientes hasta sorprendentemente benignas en otros. La explicación a estas profundas diferencias, incluso estratificadas por edad, son desconocidas y probablemente, multifactoriales. La gravedad de la presentación es más comprensible en el caso de la presencia de algún factor de riesgo. Por ejemplo, en el caso de los ancianos, el pool de células T naïve se encuentra reducido, por lo que es más complicado desarrollar una respuesta adaptativa rápida y eficaz que reconozca el nuevo virus y generar anticuerpos neutralizantes⁴⁸.

En aquellos pacientes que desarrollan una infección grave, SARS-CoV-2 provoca una respuesta inmune distinta y probablemente patogénica⁴⁹. La autopsia pulmonar de pacientes fallecidos por COVID-19 muestran cambios provocados por actividad inflamatoria como daño alveolar difuso bilateral, formación de membranas hialinas, infiltrado inflamatorio intersticial mononuclear y descamación celular similar a lo encontrado en SARS-CoV y MERS-CoV⁵⁰. También se halla daño vascular con trombosis pulmonar a nivel micro y macrovascular⁵¹ secundaria a oclusiones producidas por agregados de células inflamatorias y probable actividad pro-coagulante de algunas de las proteínas estructurales de SARS-CoV-2⁵².

Algunas de los factores que podrían explicar esta heterogeneidad en la respuesta clínica y justificar una activación inmune patogénica son los siguientes:

- **Variabilidad en el inóculo viral:** Una carga viral (CV) alta en el tracto respiratorio superior puede condicionar una ausencia en el control inmune inicial y una peor evolución de la infección. La estimación de esta carga viral se está realizando de forma indirecta mediante la medición de los valores de umbral de ciclo o Ct (en inglés, *Cycle threshold*) que se extraen de la RT-PCR nasofaríngea. Cada Ct hace referencia al número de ciclos en un ensayo de RT-PCR necesario para amplificar

el ARN viral y alcanzar un nivel detectable. De esta forma, cuanto menor es el Ct, menor es el número de ciclos necesarios para detectar una mayor carga viral. En una cohorte de 678 pacientes hospitalizados entre los meses de marzo y abril de 2020 en un hospital de Nueva York, se vio que niveles elevados de carga viral, definidos por valores de umbral de ciclo menos de 25 se asociaban a mayor riesgo de intubación y mortalidad⁵³. En otro estudio en el que se recogieron 3497 muestras respiratorias de pacientes afectados y se estimó la CV mediante RT-PCR, se vio que los sujetos graves también presentaban mayor CV, con una duración más prolongada y con un nivel pico más retrasado que los pacientes leves⁵⁴.

- **Susceptibilidad genética al virus:** La susceptibilidad individual al virus puede estar determinada genéticamente, como se ha visto en otras infecciones como la gripe u otros virus respiratorios. Variantes congénitas que condicionen alguna pérdida de funcionalidad implicada en la respuesta inmune pueden conllevar infecciones fatales en población joven. En la cohorte de GenOMICC (Genetics Of Mortality in Critical Care)⁵⁵ se ha analizado el genoma de 2244 pacientes críticos a causa de la COVID-19, tratando de encontrar rasgos genéticos que se asocien a una mayor gravedad de la infección. En primer lugar, se encontró que una expresión elevada del gen IFNAR2 era un factor protector contra la gravedad de la infección. Este gen codifica el receptor del IFN-I, principal responsable de la respuesta inmediata antiviral. En segundo lugar, algunas variantes en el grupo de genes OAS, encargados de traducirse en proteínas implicadas en la inhibición de la replicación viral, se mostraron más susceptibles a la enfermedad. También se encontraron modificaciones en el gen que codifica la dipeptidil peptidasa 9, la cual se traduce en una serin proteasa que corta a CXCL10, clave en la migración de las células inflamatorias y en la presentación del antígeno. Otra variante encontrada fueron niveles elevados de expresión del gen TYK2, el cual codifica una tirosin kinasa perteneciente a la familia de proteínas *Janus kinasas*, responsables de la señalización y transducción de IL. Esto podría explicar los altos niveles de IL-2, IL-6 o IL-10 encontrados en pacientes con infección grave. Este hallazgo ha servido de base para plantear a los fármacos inhibidores de *Janus*

kinasas como posibilidad terapéutica⁵⁶.

- **Deficiencias funcionales en la respuesta mediada por IFN-I:** Las señales mediadas por IFN-I son cruciales en generar una respuesta inmune adecuada frente a las infecciones virales. SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, a diferencia de otros CoVs, son capaces de bloquear el IFN-I (α y β) a través de complejos mecanismos^{7,57}. Pacientes con alteraciones congénitas de los TLRs desarrollan una respuesta deficiente mediada por IFN-I presentando una enfermedad más grave y con mayor mortalidad en pacientes jóvenes⁵⁸. Esta reducción en la activación inmunológica precoz mediada por IFN-I puede conducir a un desequilibrio en la respuesta del huésped y traducirse en la incapacidad para aclarar el virus⁴⁹. También pacientes con errores congénitos en la vía del IFN-I y autoanticuerpos dirigidos contra esta citoquina predisponen a una mayor severidad en la infección: *Zhang et al* encontraron que 23 de 659 pacientes (3.5%) con COVID-19 grave presentaban mutaciones que les impedían producir o responder una señal mediada por IFN-I; *Bastard et al* documentaron que 135 de 987 pacientes (13.7%) con infección grave por SARS-CoV-2 presentan autoanticuerpos contra IFN-I, siendo el 94% de ellos hombres^{59,60}. El grupo de infección leve o asintomática y sólo un 0,3% de los controles sanos, poseían este tipo de autoanticuerpos. Este bloqueo del IFN-I puede dar lugar a una inmunoevasión viral y relacionarse con la gravedad de la infección. Los estudios clínicos disponibles muestran que esta evasión inmunológica en los primeros 10 días de la infección corresponde al período de mayor intensidad de replicación viral. Esta pérdida de control de la replicación viral permite al virus progresar al tracto respiratorio inferior, atrayendo a dicho nivel a monocitos y macrófagos que generan una gran cantidad de citoquinas y que resultan en daño tisular⁶¹ y fracaso respiratorio agudo. En una serie de 50 pacientes con infección por SARS-CoV-2, los niveles de IFN-I (α y β) e ISGs fueron significativamente inferiores en aquellos con infección grave, comparados con los que sufrían una infección leve o moderada. Este descenso precedía al empeoramiento clínico y deterioro respiratorio. La CV en sangre, marcador subrogado de control de la infección, se encontraba también más elevada en aquellos con infección severa, mientras que

los datos de RT-PCR en frotis nasofaríngeo eran similares en pacientes leves, moderados o con infección grave. Estos niveles bajos de IFN-I se correlacionaron de forma significativa con el riesgo de evolución a infección grave. La proporción de CD₈, la mayor fuente de producción de IFN, estaba reducida en todos los grados de infección por SARS-CoV-2 en comparación con el grupo de sanos⁶². Se desconoce si este descenso en la producción de IFN-I está presente en el huésped antes de la infección, se produce un retraso en su activación o se agota después del primer pico viral. El IFN-I se ha considerado como una posible terapia antiviral: *in vitro* ha demostrado la inhibición de la replicación de SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV, así como en algunos modelos animales cuando se administra de forma precoz⁶³. Actualmente su uso se está evaluando dentro de ensayos clínicos en la infección por SARS-CoV-2, si bien por ahora no se ha observado un efecto clínicamente beneficioso.

De esta forma, si esta respuesta inmune innata se retrasa o es demasiado prolongada debido a la evasión viral, la generación de la respuesta adaptativa dependiente de LTCD4⁺, LTCD8⁺ y células B puede fallar. A su vez, la ausencia de un control adaptativo eficaz puede provocar una respuesta inmune inespecífica masiva, creando un circuito de retroalimentación inflamatoria⁶⁴ (Figura 2).

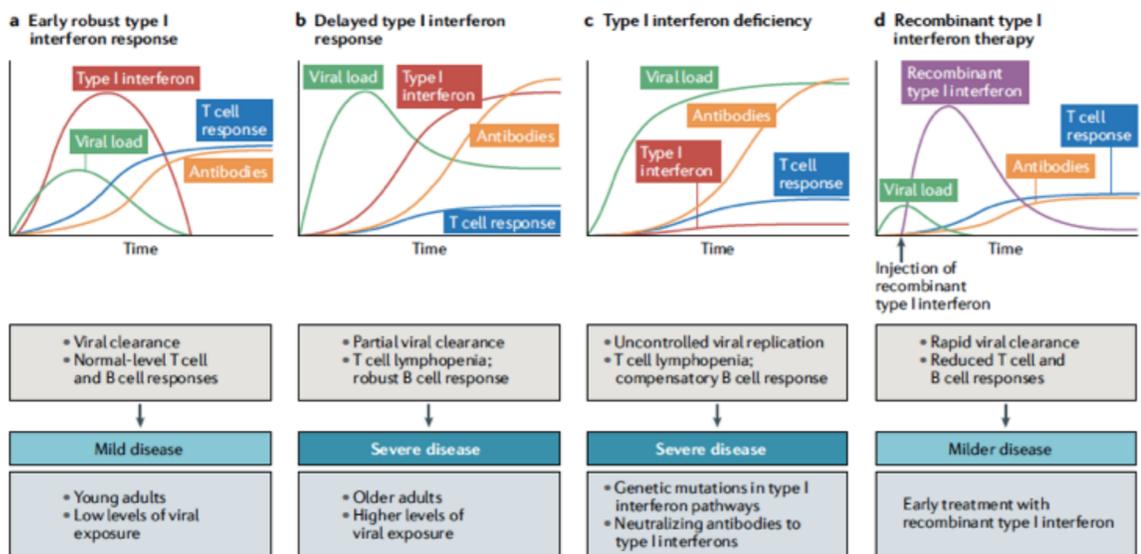


Figura 2¹¹². Modelos de infección por SARS-CoV-2 en función de la respuesta mediada por IFN-I. **A)** Una respuesta fuerte y precoz permite un control adecuado de la CV, resultando en enfermedad leve y niveles normales de LT y B. **B)** Si la respuesta generada por IFN-I está reducida o se retrasa, la CV no se controla y es posible una desregulada activación inmune. **C)** En individuos basalmente deficientes en IFN-I, la replicación de SARS-CoV-2 está descontrolada y se hiperactiva una respuesta inmune patológica, insuficiente para evitar la progresión a COVID-19 crítico. **D)** La profilaxis post-exposición de IFN-I puede reducir la CV y evitar la progresión de la enfermedad.

- **Papel protector de la inmunidad cruzada frente a otros HCoVs:** Se ha pensado que podía existir inmunidad cruzada contra SARS-CoV-2 en aquellos pacientes con infecciones por otros HCoVs, al encontrar LTCD4⁺ específicos para SARS-CoV-2 en un 30-40% pacientes estudiados no expuestos a esta infección⁶⁵. No obstante, esta teoría ha sido puesta en duda por estudios posteriores. Por ejemplo, *Anderson et al* estudiaron muestras de sangre procedentes de 456 participantes y recogidas antes de la pandemia por COVID-19. Todas ellas presentaban anticuerpos frente al coronavirus estacional OC43 y un 23% de las muestras poseía anticuerpos que podían reconocer a SARS-CoV-2, los cuales probablemente se desarrollaron como respuesta a la infección por OC43. En un seguimiento posterior, se vio que estos pacientes desarrollaron igualmente infección por SARS-CoV-2, requiriendo hospitalización⁶⁶.
- **Apoptosis de linfocitos T inducida por la infección:** En varios estudios la linfopenia se ha correlacionado con la severidad de la infección^{19,67}. *Hadjadj et al* analizaron 50 pacientes con infección por SARS-CoV-2 y 18 controles sanos. Al ingreso, la severidad de COVID-19 fue categorizada en leve-moderada, grave y crítica. En correspondencia a lo publicado previamente, observaron una disminución en las poblaciones linfocitarias tipo T, en especial de LTCD8⁺ y células NK, siendo este descenso más marcado en pacientes graves y críticos. Cuando evaluaron la funcionalidad de estas células mediante el uso de marcadores de activación (CD25, CD38⁺ y HLA-DR⁺) y agotamiento (PD1, TIM3), se vio que PD1 y TIM3 estaban moderadamente aumentados en pacientes graves y críticos. También se encontraban sobre expresados los genes relacionados con el agotamiento y la apoptosis celular, así como los niveles de fosfatidilserina en la parte externa de la membrana celular (marcador de muerte celular). Todo esto soportaría la teoría de una apoptosis-linfocitaria T inducida por la infección⁶².
- **Variabilidad en los grados de activación, proliferación y agotamiento de la respuesta adaptativa celular:** En el estudio publicado por *Mathew et al* analizaron las poblaciones linfocitarias B y T en 125 pacientes hospitalizados por

COVID-19 mediante citometría de alta dimensión, y los compararon con aquellos que habían resuelto la infección y controles sanos. Encontraron una gran heterogeneidad en el tipo de respuesta celular inmunitaria, pudiendo agrupar los resultados obtenidos en tres patrones de inmunotipos relacionados con distinta gravedad: el inmunotipo 1 se asoció con enfermedad crítica y mostró una activación y proliferación robustas de LTCD4⁺, una hiperactivación y agotamiento precoz de LTCD8⁺ y una estimulación de LTCD8⁺ CD45RA⁺, caracterizados por escasa capacidad de proliferación y diferenciación pero potente actividad citotóxica y productora de citoquinas. El inmunotipo 2 se caracterizó por una menor activación de LTCD4⁺ y una mayor proliferación de células B de memoria, en relación con una menor gravedad de la infección. El inmunotipo 3, presente en pacientes con enfermedad leve, apenas mostraba activación de LT y linfocitos B. Los autores concluyen que la activación intensa de LTCD4⁺ y LTCD8⁺, un fenotipo exhausto y una elevada producción de citoquinas pueden ser responsables de la patogénesis en las formas graves⁶⁸.

- **Variabilidad en la producción de citoquinas:** Se ha propuesto que esta excesiva producción de citoquinas podía ser responsable del deterioro respiratorio de estos pacientes^{69,70}. La respuesta inmune normal debe ser proporcional a la carga patogénica, y volver de forma natural a una homeostasis basal, mientras que una respuesta aberrante puede derivar en un estado fisiológico perjudicial. Niveles elevados de IL6 se han asociado a progresión a ventilación mecánica y aclaramiento más lento de la CV^{71,72}. En un estudio de 1484 pacientes con COVID-19, se encontró que los niveles elevados de IL6, IL8 y TNF al momento de la hospitalización eran predictores fuertes e independientes de mortalidad⁷³. En otros múltiples estudios se han confirmado estos resultados, demostrado niveles incrementados de IL y quimioquinas como CXCL10, IL-6, IL-10 e IL-18 en las formas más críticas de la enfermedad^{49,74}. Esta generación de citoquinas produce una atracción pulmonar de monocitos y macrófagos, que son los que pueden generar el daño tisular y precipitar un SDRA. En abril de 2020 esta respuesta inflamatoria se calificó “tormenta de citoquinas”, un término previamente utilizado para describir el síndrome de liberación de citoquinas presente en

algunos tratamientos de inmunoterapia y en sepsis, consistente en una cascada inflamatoria “suprafisiológica” que genera una producción descontrolada de IL6, IL10 y TNF- α , los cuales perpetúan un estímulo antigénico y prolongan el estado inflamatorio (58). Esta anormal cantidad de citoquinas provoca disfunción endotelial por aumento de la permeabilidad vascular y, entre otros, daño pulmonar. Por estos motivos, bloquear la vía de la IL6 se convirtió de forma compasiva durante la primera ola de la pandemia en una atractiva posibilidad terapéutica⁷⁵. En uno de los ensayos RECOVERY, 2104 pacientes fueron aleatorizados a recibir dexametasona y 4321 fueron asignados a tratamiento estándar. El uso de dexametasona durante 10 días resultó en una menor mortalidad a los 28 días que el tratamiento estándar en pacientes que requerían oxígeno o ventilación mecánica. Sin embargo, no hubo evidencia de beneficio entre aquellos pacientes que no requerían soporte respiratorio. Estos resultados apoyarían la idea de que una hiperestimulación inmune puede ser la base de las formas graves de COVID-19 y de que la terapia inmunomoduladora puede reportar beneficios únicamente en los pacientes de mayor gravedad⁷⁶. Más tarde, el término “tormenta de citoquinas” fue criticado en alusión a que los niveles presentes de citoquinas en la COVID-19 son significativamente inferiores a los que existe en otras condiciones como por ejemplo una sepsis bacteriana o una parada cardiorrespiratoria^{77,78}.

El modelo de respuesta inmune que está emergiendo es complejo y probablemente reúna varias alteraciones causantes de un desequilibrio en la respuesta innata, con un menor control de la replicación viral inicial y una ineficaz y descoordinada respuesta adaptativa.

La variedad en la presentación clínica de COVID-19 sugiere una distinta dinámica de respuesta inmune entre pacientes leves y graves. En un análisis longitudinal se comprobó que esta elevación de citoquinas se corregía alrededor del décimo día tras el inicio de los síntomas en pacientes moderados, mientras que se mantenían elevadas en pacientes graves, encontrando varios inmunofenotipos de respuesta inflamatoria en función de la severidad de la infección. En aquellos pacientes con infección moderada y

baja mortalidad se encontraron niveles bajos de marcadores inflamatorios y un enriquecimiento de aquellos encargados de la reparación tisular. El grupo de pacientes con infecciones graves y elevada mortalidad mostró una alta expresión de citoquinas como IFN λ , IL6, IL23 e IL33, y marcadores ligados a daño coagulopático, así como un descenso más lento en el aclaramiento viral⁷⁹. Estos resultados sugieren que la evolución de COVID-19 más allá de los siete días tras el inicio de síntomas puede estar conducida por una respuesta inmunológica inherente al hospedador, y, por tanto, variable; concepto denominado firma inmunológica⁷⁴.

1.6.5 Duración de la inmunidad frente al SARS-CoV-2

La eficacia y durabilidad de la respuesta inmune adaptativa que genera SARS-CoV-2 también se encuentra bajo un intenso análisis. El 90% de los pacientes infectados seroconvierten entre los 7-14 días de presentar la infección⁸⁰ y generan respuesta celular tipo T específica. Los anticuerpos producidos son de tipo IgG, IgA e IgM: el 90% están dirigidos contra la proteína *Spike* y el resto contra la proteína N y otras accesorias. Aquellos pacientes que generan LTCD4⁺ y LTCD8⁺ específicos presentan mejor evolución⁷⁷ y en la mayoría de ellos, tanto la respuesta inmunitaria humoral como celular específicas se mantiene hasta por lo menos 6 meses más tarde⁸¹. Títulos elevados de anticuerpos neutralizantes se han correlacionado con una mayor gravedad de la infección, probablemente por una respuesta celular B más intensa frente a una mayor carga antigénica^{44,82}, mientras que los títulos de IgG son más bajos en pacientes asintomáticos o paucisintomáticos⁸³. No obstante, es necesario señalar que en el ensayo clínico RECOVERY se observó que la mortalidad entre los pacientes hospitalizados con COVID-19 era significativamente mayor entre aquellos que en el momento de la aleatorización no presentaban IgG frente a la proteína S. Este efecto se observó también entre los pacientes que no recibieron el fármaco en investigación, lo que sugiere un papel protector de la inmunidad humoral en la evolución de la infección⁸⁴.

Es posible que, al igual que ocurre con otros HCoVs, la generación de inmunidad de memoria se reduzca con el tiempo, aunque no está claro el impacto de esta reducción en la gravedad de las posibles reinfecciones. Especialmente dado que la mayoría de los

estudios ha analizado la presencia de anticuerpos en suero sin estudiar la presencia de linfocitos B y T de memoria, los cuales podrían jugar un papel clave en prevenir el desarrollo de reinfecciones graves. Las infecciones producidas por HCoV-229E o HCoV-OC43 generan anticuerpos cuyos títulos comienzan a descender a partir del año. Aún cuando el sujeto presente anticuerpos neutralizantes en sangre, las reinfecciones y la diseminación del virus son posibles, aunque puede existir una correlación inversa entre los títulos de anticuerpos preexistentes y la probabilidad de desarrollar una infección sintomática. En la infección por SARS-CoV, sólo el 55% de los pacientes presenta niveles de IgG detectables a partir de los 3 años, sin hallar células B específicas de memoria en sangre periférica. No obstante, en el 70-100% de los pacientes se encontraron a los 6 años LTCD4⁺ y LTCD8⁺ específicos de memoria, incluso en aquellos en los que no se identificaban células B, lo que reportaría una mayor longevidad en la respuesta adaptativa dependiente de células T. En lo que se refiere a MERS-CoV, en aquellos pacientes que se recuperaron de una forma grave de la enfermedad se encontraron anticuerpos detectables a los 2 años de la infección, mientras que aquellas formas leves o subclínicas perdían los títulos siendo casi indetectables en el mismo período⁴⁷.

En cuanto a SARS-CoV-2, se han documentado reinfecciones en pacientes que ya habían desarrollado anticuerpos, si bien la incidencia de estas reinfecciones es muy baja. Aunque no se realizó cultivo viral, las cepas responsables de ambos episodios se secuenciaron genéticamente y se encontró que pertenecían a diferentes linajes. No se ha visto una tendencia definida de gravedad en el segundo episodio (desde asintomáticos hasta requerir hospitalización y ventilación invasiva)⁸⁵, aunque la gravedad de la reinfección podría estar influenciada por factores como la edad, la intensidad de la infección inicial o la exposición a una nueva variante del virus. En una cohorte de 9119 pacientes se documentaron 63 reinfecciones (0.7%) durante un período de seguimiento de 12 meses, estando relacionadas con factores como el tabaquismo o la patología respiratoria crónica. Aunque la frecuencia de neumonía fue menor en las reinfecciones, se recogieron 2 fallecimientos (3.2%)⁸⁶.

Existen por tanto todavía muchas áreas de desconocimiento para comprender adecuadamente la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped ante la infección

por SARS-CoV-2, en especial aquellas que pudieran tener utilidad para monitorizar la evolución clínica y predecir la gravedad de la infección. Un mayor entendimiento de esta respuesta también permitiría desarrollar nuevos tratamientos más precisos en el aclaramiento de la respuesta viral y la prevención de la inmunopatogénesis.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

La infección por SARS-CoV-2 se ha convertido en la primera gran pandemia del siglo XXI y ha puesto a prueba la capacidad de respuesta del mundo en múltiples sentidos: la velocidad en el desarrollo de pruebas diagnósticas, la implementación de medidas de control de la infección, la selección y desarrollo de pautas terapéuticas adecuadas y, por último, la creación de vacunas seguras y eficaces. A nivel social, la concienciación del riesgo individual y de la posibilidad de transmisión de la infección ha supuesto un reto para profesionales, medios y autoridades sanitarias. Para su control, ha sido necesario someter a la población a un drástico cambio en el modo de vida, con modificaciones del comportamiento y restricciones de muchas actividades socio-económico-familiares que antes considerábamos usuales.

No es la primera vez que el ser humano se enfrenta a una crisis de tal magnitud. Otras pandemias como la peste negra en 1347 o la gripe española en 1918 alcanzaron una mortalidad de hasta un 40% entre la población europea. Afortunadamente y, a diferencia de las anteriores, la pandemia por SARS-CoV-2 se ha caracterizado por una meteórica carrera científica en la generación de información y conocimiento de la infección.

Comprender la respuesta inmune en la COVID-19 está suponiendo un reto para la población científica. Especialmente, entender mejor la dicotomía entre las vías moleculares que regulan la respuesta inmunológica responsable de la eliminación de la infección o de la patogénesis de la enfermedad. Este punto, que todavía resulta un enigma en patologías infecciosas similares como la sepsis, resulta clave para poder desarrollar tratamientos eficaces y seguros de la COVID-19 grave o incluso para evitar la progresión de las formas más leves a neumonía bilateral, así como para reducir los efectos a largo plazo de la enfermedad. La variedad que presenta en la gravedad y en la presentación clínica y evolutiva hace pensar en un patrón de respuesta distinto entre infecciones leves-moderadas y graves. La identificación de patrones que se

correlacionen con la gravedad de la infección nos podría ayudar a predecir qué pacientes y en qué momento tienen mayor riesgo de mala evolución y muerte.

Tal y como se ha indicado en la introducción, pese a los grandes avances en los dos últimos años desde que se declaró la pandemia, todavía se desconocen los mecanismos inmunológicos responsables de las formas más graves de la enfermedad y, por tanto, no existe ningún tratamiento inmunomodulador que haya demostrado una eficacia asegurada para el tratamiento de los pacientes con COVID-19 que requieren hospitalización. La comprensión de estos mecanismos puede derivar en la selección de nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de otras estrategias de tratamiento.

En este trabajo hemos estudiado múltiples parámetros de la respuesta inmune mediante el análisis de sangre periférica en pacientes valorados en urgencias por COVID-19, comparados con donantes sanos (HDs del inglés, *health donors*) y otros pacientes atendidos por infecciones respiratorias no COVID-19 (no-COV-ITR) y otras patologías (ID). Específicamente se han estudiado las principales células responsables de la inmunidad viral (monocitos, LTCD8⁺ y NK) y diferentes familias de factores solubles inflamatorios que regulan su actividad (IL, quimioquinas, granzimas y ligandos de células NK).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis principal

La respuesta inmune en pacientes con COVID-19 leve difiere de aquellos con infección más grave y, por tanto, se podrían diferenciar en función del tipo y/o niveles de marcadores inflamatorios solubles y de la respuesta inmune celular.

3.2 Hipótesis secundarias

Las hipótesis secundarias que se derivan son:

- En la COVID-19 se produce un tipo de respuesta inmunológica distinta a la encontrada en otras infecciones respiratorias no provocadas por SARS-CoV-2 pero con un patrón clínico similar y a la de otras patologías sin etiología respiratoria.
- La identificación de patrones inflamatorios puede ayudar a predecir qué pacientes tienen mayor riesgo de fracaso respiratorio y de muerte.
- La gzmA extracelular puede ser responsable de la situación de hiperinflamación encontrada en los pacientes más graves de la infección.

3.3 Objetivo general

El objetivo principal es la caracterización del perfil inmunológico de los pacientes con COVID-19 al momento de la hospitalización para mejorar la comprensión de la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped y tratar de encontrar patrones inmunológicos útiles para diferenciar COVID-19 de otras infecciones y predecir la gravedad y el riesgo de muerte en la infección por SARS-CoV-2.

3.4 Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune innata (monocitos, células NK) y adaptativa, en especial la mediada por LTCD8⁺, en función de marcadores de activación y agotamiento en pacientes COVID-19, otras infecciones y patologías y controles sanos.
2. Cuantificar quimioquinas e IL séricas en pacientes COVID-19, otras infecciones y patologías y controles sanos y correlacionar sus niveles.
3. Cuantificar los niveles séricos de ligandos solubles de receptores de activación de células NK.
4. Determinar la concentración y actividad de granzimas en pacientes con COVID-19, en comparación con otras infecciones y patologías y controles sanos.
5. Analizar la respuesta inmune celular en función de la gravedad de pacientes con infección por SARS-CoV-2.
6. Analizar la correlación de los niveles de IL y quimioquinas séricas con la gravedad y riesgo de mortalidad de COVID-19.
7. Correlacionar los niveles y la actividad de las granzimas con la gravedad y riesgo de mortalidad en COVID-19.
8. Determinar la capacidad de los niveles de granzimas, poblaciones celulares y moléculas inflamatorias para diagnóstico de infección por SARS-CoV-2, estratificar gravedad al ingreso y mortalidad a los 30 días.
9. Describir los valores de marcadores séricos inflamatorios (ferritina, procalcitonina, proteína C reactiva) y de coagulación (Dímero D, Tiempo de tromboplastina parcial activado) y analizar su correlación con la gravedad de la infección por SARS-CoV-2 y la mortalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población y ámbito de realización del estudio

Se trata de un estudio observacional, descriptivo y analítico multiparamétrico para evaluar la respuesta inmune provocada por la infección por SARS-CoV-2, en lo referente a respuesta celular y marcadores inflamatorios, y compararla con la producida por otras infecciones respiratorias no causadas por SARS-CoV-2 (no-COV-ITR), otras patologías de causa no respiratoria (ID) y la observada en donantes sanos (HDs).

Criterios de selección de pacientes:

- Criterios de inclusión: pacientes de dieciocho o más años de edad, valorados en el servicio de urgencias del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) por sospecha clínica de infección por SARS-CoV-2, confirmada o no por pruebas microbiológicas (RT-PCR, test rápido de detección de anticuerpos, serología IgM y/o IgG). La sospecha clínica de COVID-19 consiste en la aparición de cualquiera de los síntomas de tos, fiebre ($> 37.5^{\circ}\text{C}$), artromialgias, dificultad respiratoria, anosmia, ageusia y/o diarrea, con o sin infiltrados pulmonares sugestivos de neumonía en la radiografía de tórax.
- Criterios de exclusión:
 - Ausencia de muestras de sangre total en el momento de la valoración en urgencias.
 - Neoplasia hematológica basal (leucemia).

Tamaño muestral

Al tratarse de un estudio realizado durante un período limitado de tiempo (abril y mayo de 2020) y en unas condiciones socio-sanitarias extremas provocadas por el confinamiento y la sobrecarga hospitalaria, se incluyeron todos los pacientes que cumplían los criterios previamente citados durante dicho período.

Ámbito de realización del estudio.

El estudio se diseñó en el seno del “Grupo de Inmunoterapia, Inflamación y Cáncer” y de “Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas” del Instituto de Investigación Biomédica Aragón (IIS Aragón), liderado por Julián Pardo y José Ramón Paño respectivamente, a través de la recogida de muestras de pacientes valorados por sospecha de infección por SARS-CoV-2 en el Servicio de Urgencias del HCULB durante los meses de abril y mayo de 2020.

4.2 Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal en un único corte de tiempo (al día cero o día en el que el paciente es valorado en urgencias), que relaciona los valores analíticos inmunológicos con las variables clínicas y la evolución a día cero, día siete y a los treinta días, registradas de forma prospectiva.

Selección de pacientes.

A todos aquellos pacientes valorados en urgencias durante el período del estudio por sospecha de COVID-19 se les solicitaba un perfil analítico concreto. La inclusión en el estudio se realizó de todos aquellos pacientes que cumplían criterios de inclusión y tenían solicitado dicho perfil analítico, con la siguiente recogida y estudio de las muestras de sangre.

Se seleccionaron de forma consecutiva 150 pacientes con sospecha de COVID-19 que requirieron atención en urgencias y posible ingreso hospitalario en el HCULB. Se distribuyeron entre los grupos: infección por SARS-CoV-2 confirmada (COVID-19), no-COV-ITR o ID. La infección por SARS-CoV-2 fue confirmada por RT-PCR en frotis nasofaríngeo, test rápido de detección de anticuerpos en sangre o elevación de IgM y/o IgG específicos. El grupo de pacientes denominado no-COV-ITR presentaba un cuadro que desde el punto de vista clínico, analítico y radiológico hizo al clínico responsable sospechar infección por SARS-CoV-2, pero fue descartada por pruebas microbiológicas

(RT-PCR en frotis nasofaríngeo, test rápido de anticuerpos en sangre e IgM y/o IgG en sangre negativos). Aquellos pacientes con ID requirieron atención en urgencias o ingreso hospitalario por un motivo distinto al COVID-19. Se escogieron 48 controles sanos adultos que no presentaran síntomas compatibles con COVID-19 y en los cuales se descartó esta infección mediante un estudio de IgM e IgG en suero.

Recogida de datos

Los datos clínicos se obtuvieron a través de la Intranet del HCULB y de la Historia Clínica Electrónica, accesible desde el Servicio de Enfermedades Infecciosas únicamente mediante contraseña y recogidos por los investigadores de forma anonimizada en un cuaderno de datos online, protegido y estandarizado.

Las variables clínicas recogidas fueron:

- Motivo del ingreso: COVID-19, no-COV-ITR o ID.
- Edad.
- Sexo.
- Fecha de inicio de los síntomas (FIS).
- Fecha de ingreso.
- Fecha de extracción de la muestra.
- Fecha de alta/éxito.
- Gravedad respiratoria: se clasificó según una escala respiratoria (Anexo 1) en leve, moderado o grave, con 1, 2-3 y 4-8 puntos respectivamente.
- Pronóstico a los treinta días: hospitalizado, dado de alta o muerte.

Las variables analíticas realizadas en los estudios inmunológicos son las siguientes (se muestran recogidas en la tabla 2, distribuidas en Grupo 1 [marcadores solubles] y Grupo 2 [poblaciones celulares] utilizados para el análisis estadístico):

Marcadores solubles (Grupo 1)	Poblaciones celulares (Grupo 2)
<ul style="list-style-type: none"> • Fibronectina • $\alpha 2$ - macroglobulina • Antitrombina • MICA • MICB • ULBP1 • ULBP2/5/6 • ULBP3 • IL12 • IL25 • IL2 • IL15 • IL1α • IL6 • IL1B • IL18 • IL1RA • IL36B • IL33 • IL31 • IL7 • IL10 • CXCL8 • CXCL10 • CCL2 • CXCL2 • CXCL9 • CCL8 • IFN-$\lambda 2$ • IFN-$\lambda 3$ • IFNα • IFNβ • IFNγ • TNFα • TRAIL • Concentración de Gzm A • Actividad de Gzm A (pM/min) • Concentración de Gzm B • Actividad de Gzm B (pM/min) 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T (LTCD3⁺) • LT cooperadores (LTCD3⁺CD4⁺) • LT citotóxicos (LTCD3⁺CD8⁺) • LT reguladores (LTCD3⁺ CD4⁺ CD127⁻ CD25⁺) • Células NK (LTCD3⁻CD56⁺) • Células NK^{CD56Dim} (CD3⁻ CD56⁺ CD16⁺) • Células NK^{CD56Dim} NKG2C⁺ • Células NK^{CD56Dim} NKG2A⁺ • Células NK^{CD56Dim} NKp30⁺ • Células NK^{CD56Dim} NKp46⁺ • Células NK^{CD56Dim} NKG2D⁺ • Células NK^{CD56Dim} adaptativas o de memoria (NKG2A⁻ CD57⁺NKG2C⁺) • Células NK^{CD56Bright} (CD3⁻ CD56⁺⁺ CD16⁻) • Células NK^{CD56Bright} NKG2C⁺ • Células NK^{CD56Bright} NKG2A⁺ • Células NK^{CD56Bright} NKp30⁺ • Células NK^{CD56Bright} NKp46⁺ • Células NK^{CD56Bright} NKG2D⁺ • Células NK^{CD56Bright} adaptativas o de memoria (NKG2A⁻ CD57⁺NKG2C⁺) • Células NK^{CD56dim} Gzm B^{High} (activadas): <ul style="list-style-type: none"> ○ NK^{CD56Dim} GZM B^{High} /TIM3⁺ ○ NK^{CD56Dim} GZM B^{High} /LAG3⁺ ○ NK^{CD56Dim} GZM B^{High} /PD1⁺

Tabla 2. Poblaciones celulares, IL y CCL/CXCL analizadas. Distribución de las variables por grupos (1 y 2) utilizados para los análisis univariante y multivariante.

Poblaciones celulares (Grupo 2)	Poblaciones celulares (Grupo 2)
<ul style="list-style-type: none"> • Células NK^{CD56dim} Gzm B^{low} (exhaustas) <ul style="list-style-type: none"> ○ NK^{CD56dim} Gzm B^{low} /TIM3+ ○ NK^{CD56dim} Gzm B^{low} /LAG3+ ○ NK^{CD56dim} Gzm B^{low} /PD1+ • Células NK^{CD56Bright} Gzm B^{High} (activadas) • Células NK^{CD56Bright} Gzm B^{low} exhaustas: <ul style="list-style-type: none"> ○ NK^{CD56Bright} Gzm B^{low} /TIM3+ ○ NK^{CD56Bright} Gzm B^{low} /LAG3+ ○ NK^{CD56Bright} Gzm B^{low} /PD1+ • Células NKT (CD3⁺ CD56⁺) • Monocitos • cMon (CD14⁺⁺CD16⁻) • iMon (CD14⁺⁺CD16⁺) • ncMon (CD14⁺CD16⁺⁺) • cMon: <ul style="list-style-type: none"> ○ TIM3⁺ ○ LAG3⁺ ○ PD1⁺ • iMon: <ul style="list-style-type: none"> ○ TIM3⁺ ○ LAG3⁺ ○ PD1⁺ • ncMon: <ul style="list-style-type: none"> ○ TIM3⁺ ○ LAG3⁺ ○ PD1⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T CD8⁺ Activados (CD38⁺ HLA-DR⁺) <ul style="list-style-type: none"> ○ CD38⁺HLA-DR⁺ TIM3⁺ ○ CD38⁺HLA-DR⁺ LAG3⁺ ○ CD38⁺HLA-DR⁺ PD1⁺ • Linfocitos T CD8⁺ exhaustos: <ul style="list-style-type: none"> ○ Gzm B^{low} /TIM3⁺ ○ Gzm B^{low} /LAG3⁺ ○ Gzm B^{low} /PD1⁺
	Grupos 1 y 2
	<ul style="list-style-type: none"> • Edad • Sexo • Recuento linfocitario (LTCD3⁺)

Tabla 2 (cont.) Poblaciones celulares, IL y CCL/CXCL analizadas. Distribución de las variables por grupos (1 y 2) utilizados para los análisis univariante y multivariante.

- Poblaciones celulares: niveles de LTCD4⁺, LTCD8⁺, células T asesinas naturales (NKT), células *Natural Killer* (NK), monocitos.
- Subpoblaciones de células NK: NK^{CD56Dim} (citotóxicas), NK^{CD56Bright} (inmunorreguladoras), NK adaptativas
- Concentración de las poblaciones celulares en función de marcadores de activación y agotamiento (TIM3, LAG3, PD1).
- Subpoblaciones de monocitos: clásicos e intermedios, monocitos no clásicos.
- Mediadores solubles reguladores de procesos inflamatorios: CCL/CXCL, IL, Granzimas extracelulares, ligandos solubles.

También se seleccionaron las siguientes variables analíticas obtenidas de controles rutinarios evolutivos de los pacientes:

- Ferritina
- Procalcitonina (PCT)
- Proteína C Reactiva (PCR)
- Ratio internacional normalizado (INR, del inglés *International Normalized Ratio*)
- Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT, del inglés *Activated Partial Thromboplastin Time*)
- Dímero D (DD)

4.3 Recogida de las muestras

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de los participantes durante las primeras 24 horas tras valoración en urgencias y antes del inicio de cualquier tratamiento. Estas muestras fueron proporcionadas y custodiadas por el Biobanco del Sistema Aragonés de Salud, integrado en la Red Nacional de Biobancos. Fueron procesadas siguiendo los procedimientos operativos estándar y de acuerdo con la aprobación del Comité de Ética de Investigación de Aragón (CEIC Aragón, número PI20/165).

4.4 Procesamiento de las muestras

La sangre periférica fue recogida en tubos de heparina sódica y centrifugada durante al menos 10 minutos a 2600 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente, para separar la fracción celular del plasma. El plasma fue extraído del pellet celular y almacenado a -80°C para su uso posterior.

El pellet celular fue diluido a proporción 1:1 en un medio celular para cultivo de células humanas (RPMI medio 1640) y añadido cuidadosamente al medio Histopaque® – 1077 (Sigma) para el aislamiento de linfocitos y otras células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Se seleccionó la capa de PBMC, se lavaron con RPMI 1640 y se dividieron en alícuotas para su tinción y análisis mediante citometría de flujo. Todos los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo usando PBMC frescos. Una alícuota de PBMC aislado fue guardado en ARNlater a -80°C para la extracción posterior de mRNA para los estudios de secuenciación genómica de ARN (ARNseg).

Para minimizar la variabilidad inter-experimental entre pacientes, todas las muestras de PBMC fueron adquiridas, procesadas y analizadas en fresco durante cuatro semanas consecutivas desde abril a junio de 2020. Las muestras de suero y plasma fueron congeladas a -80°C y posteriormente analizadas el mismo día.

4.4.1. Tinción, paneles de anticuerpos y citometría de flujo

Para la tinción de la superficie celular, PMBCs fueron suspendidas en 50 μ L de solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *Phosphate buffered Saline*) con 5% de Suero fetal bovino (FCS, del inglés *Fetal Calf Serum*) y teñidas con los diferentes paneles de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Se lavó en un segundo tiempo con PBS + 5% FCS y después fue mezclada durante 30 minutos a 4°C en oscuridad usando paraformaldehído al 2%.

Las células que requerían tinción intracelular fueron permeabilizadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad usando un kit tampón de factor de transcripción FoxP3 (Miltenyi®). Posteriormente, las células fueron lavadas en dos ocasiones con tampón de permeabilización y suspendidas en 50 μ L de dicho tampón con tinción y fijación posterior con anticuerpos intracelulares durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Todas las muestras fueron procesadas con Gallios (Beckman Coulter) Flow Cytometer®. La lista de anticuerpos utilizados para el fenotipado de células inmunes fue: Miltenyi Biotec, CD14-VioBlue (130-110-524), CD16-FITC (130-113-392), CD25-APC (130-113-280), CD3-VioGreen (130-113-134), CD38-FITC (130-113-426), Treg detection kit CD4/CD25/CD127 (130-096-082), CD56-PerCP Vio700 (130-100-681), CD57-APC-Vio770 (130-111-813), CD8-PerCP Vio700 (130-110-682), FoxP3 Staining Buffer Set(130-093-142), GzmB-PE (130-116-486), HLADR-APC-VIO770 (130-111-792), LAG3-APC (130-105-453), NKG2A-PE-VIO615 (130-120-035), NKG2C-PE (130-103-635), NKP46-APC (130-092-609), TIM3-PE vio770 (130-121-334); Biolegend, NKp30-PE/Cy7 (325214), PD1-Alexa Fluor700 (329952), CD45-Brilliant Violet 421 (304032); BD, NKG2D-BV421 (743558).

La tinción por citometría de flujo se separó en cuatro paneles diferentes. La estrategia de bloqueo utilizada fue determinar la población celular homogénea eliminando la inestabilidad de flujo mediante geometría de tiempo y pulso, así como las técnicas de dispersión delantera y lateral para eliminar los desechos celulares. Los diferentes paneles utilizados fueron los siguientes: Panel 1 (Células Treg): CD3, CD4, CD127, CD25; Panel 2 (Receptores de Células NK de activación/inhibición): CD3, CD56, CD16, CD57, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp46; Panel 3 (Monocitos y células NK activadas/exhaustas): CD3, CD56, CD16, CD14, GzmB, TIM3, LAG3, PD1, HLA-DR; Panel 4 (LTCD8⁺ activados/exhaustos): CD3, CD8, GzmB, TIM3, LAG3, PD1, CD38, HLA-DR.

4.4.2. Análisis multidimensional de los datos obtenidos por citometría de flujo

Los datos obtenidos por citometría de flujo fueron analizados mediante viSNE y Mapas autoorganizados denominados FlowSOM (del inglés *Self-organizing map*) de Cytobank. El mapa viSNE es una imagen bidimensional, siendo el global la representación del total

de las células analizadas en los tres grupos de diagnóstico. Las zonas coloreadas corresponden a HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR.

FlowSOM es una herramienta no supervisada que integra los resultados en patrones celulares que se repiten caracterizados por la mayor o menor expresión de múltiples marcadores, concepto conocido como metaclúster (MT). La primera parte del mapa consiste en la selección de los MTs más frecuentes en el conjunto de los tres grupos de diagnóstico. En la segunda parte de la imagen se aprecia la diferente presencia de cada MT en los distintos grupos comparados.

Los MTs obtenidos se representan también en forma de Árboles de Expansión Mínimo (MST, del inglés *Minimun Spanning Tree*), gráfico enraizado con un nodo y aristas cuya unidad de representación es el clúster. A mayor tamaño de los clústeres, mayor es la expresión de ese MT en cada grupo de diagnóstico.

4.4.3. Análisis de proteínas plasmáticas

El plasma se descongeló en hielo y se centrifugó (3000 rpm, 1 min) para eliminar los restos celulares. Se recogieron 100 μ L en duplicado y se llevó a cabo un ensayo de Luminex usando un panel de citoquinas humanas (R&D Systems, catalogue nº LXSAMH). Se incluyeron las siguientes proteínas: IFN α , IFN β , IFN γ , IL28A/IFN λ 2, IL28B/IFN λ 3, IL2, IL1 β , IL18/IL1F4, IL1RA, IL33, IL36 β /IL1F8, IL7, IL10, IL31, IL6, IL12/IL23 p40, IL15, IL17E/IL25, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL8, CXCL9, CXCL2, MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2/5/6, ULBP-3, TNF α , GzmA y GzmB. Los sobrenadantes se mezclaron con perlas recubiertas con anticuerpos de captura y se incubaron en una placa de filtro de 96 pocillos durante 2 horas. Las perlas se lavaron e incubaron con anticuerpos de detección marcados con biotina durante una hora, seguido de una incubación final con estreptavidina. Las placas de ensayo se midieron con Luminex 200 (Thermofisher, catalogo nº APX10031). La adquisición de los datos y el análisis se realizaron usando xPONENT software.

4.4.4. Actividad de granzimas en suero

Las muestras de suero fueron utilizadas para evaluar la actividad de GzmA y GzmB utilizando substratos fluorescentes basados en Transferencia de Energía por Resonancia de Förster o FRET (FAM-VANRSAS-DABCYL y FAM-IEPDNLV-DABCYL péptidos). A estas muestras de suero se añadieron los buffers correspondientes (HCl). A la placa de lectura se añadieron 50 μL de los substratos de GzmA y GzmB. La fluorescencia de la placa fue leída al tiempo cero, a la hora para GzmA y a las 24 horas para GzmB. La actividad de las Gzms fue calculada basándose en una curva de calibración con concentraciones conocidas de carboxifluoresceína.

4.5 Análisis clínico

El motivo de consulta hospitalaria (COVID-19, no-COV-ITR o ID) fue estudiado en función de las variables clínicas y analíticas obtenidas de ese mismo día. Posteriormente, se analizó la gravedad de la infección también a día cero en el grupo de COVID-19 correlacionando la situación respiratoria y las poblaciones celulares, niveles de IL y CCL/CXCL al ingreso, clasificando clínicamente a los pacientes en leves (1 punto), moderados (2 o 3 puntos) y graves (4-8 puntos) en función de la escala de situación respiratoria (Anexo 1). A continuación, en aquellos pacientes que requirieron ingreso hospitalario se evaluó la evolución respiratoria al séptimo día, definida por un aumento (empeoramiento) o disminución (mejoría) en la escala de parámetros respiratorios, tratando de analizar si existían diferencias entre ambos patrones de evolución y la respuesta inmunológica que presentaban inicialmente. También se analizaron estas diferencias según el pronóstico a los treinta días (éxitus, hospitalización, alta).

4.6 Análisis estadístico

Las variables cualitativas se describen con frecuencias absolutas y porcentajes. Las diferencias en su distribución se han analizado mediante la prueba de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, según corresponda. La comparación entre proporciones de columnas para más de dos categorías se ha ajustado por el método de Bonferroni.

Las variables cuantitativas se expresan con la mediana y los cuartiles 1 y 3 (Q1, Q3) como medidas de centralización y dispersión, salvo en los casos en que específicamente se indique la media y la desviación típica. Esta mediana representa el porcentaje de células que expresan un determinado marcador relativas a una población celular concreta. Las diferencias encontradas entre los grupos de comparación no se deben al efecto de las variaciones en el número y porcentaje de otras poblaciones celulares, dado que los porcentajes están referidos a cada población celular específica, lo cual elimina la influencia en las variaciones de otras poblaciones. En las figuras de cajas y barras se representa también la mediana, Q1-Q3, cifra máxima y mínima. Se ha testado la normalidad de las variables continuas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para aplicar las pruebas paramétricas o no paramétricas oportunas en la comparación entre grupos (t-Student, Mann-Whitney, ANOVA de un factor y Kruskal-Wallis, según la normalidad de las variables y el número de grupos comparados) y en la correlación entre variables continuas (coeficientes de correlación r de Pearson o ρ de Spearman, de acuerdo con su distribución).

El análisis de los factores de riesgo asociados al diagnóstico de la infección, a la evolución y a la mortalidad, se ha realizado mediante regresiones logísticas univariantes y multivariantes: en los análisis univariantes se analizaron todas aquellas variables clínicamente relevantes y/o que en los análisis previos mostraran una asociación con un valor de $p < 0.1$. En los modelos multivariantes se incluyeron las variables clínicamente relevantes y/o que en los análisis de regresión logística univariantes alcanzaran un valor de $p < 0.1$, seleccionando variables capaces de predecir el diagnóstico, la evolución y la mortalidad. Estos dos análisis se aplicaron sobre dos diferentes grupos de variables: factores solubles (Grupo 1) y poblaciones celulares (Grupo 2), mientras que la edad, el sexo y el recuento linfocitario se incluyeron en ambos grupos (excepto en la comparación realizada entre COVID-19 y HDs, ya que no se disponían de estos valores en HDs). La distribución de ambos grupos se ha mostrado en la tabla 2.

Los modelos de regresión logística multivariantes finales se obtuvieron con el método “por pasos hacia atrás” y se acompañan del porcentaje corregido de la variabilidad

explicada por el modelo (R^2 Nagelkerke), bondad de ajuste (prueba de Hosmer-Lemeshow), porcentaje correctamente clasificado y AUC resultante de la función de regresión.

Se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY) y para todas las pruebas se ha considerado el valor de significación estadística p o significación obtenida en la prueba de contraste < 0.05 (bilateral).

4.7 Aspectos éticos

El estudio se ha elaborado siguiendo las normas de Buena Práctica Clínica y cumpliendo la legislación y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos, en base a las normas deontológicas reconocidas por la Declaración de Helsinki.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEIC Aragón, número PI20/165).

Los investigadores niegan tener cualquier conflicto de interés con la realización del estudio. El proyecto estuvo financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la convocatoria extraordinaria de Proyectos de Investigación sobre el SARS-CoV-2 y la enfermedad COVID-19 de abril de 2020.

Las determinaciones analíticas formaron parte de la evaluación y seguimientos rutinarios del paciente, por lo que este estudio no ha supuesto pruebas exploratorias innecesarias al paciente.

De la misma forma, la inclusión en este estudio no condicionó ningún cambio en la actitud diagnóstica o terapéutica.

Los datos que han sido recogidos son confidenciales, y ninguna persona ajena al equipo investigador tuvo acceso a ellos.

Debido a la situación socio - sanitaria excepcional y al análisis posterior de las muestras, que hizo que la mayor parte de los pacientes estuvieran dados de alta cuando se reclutaban, no se solicitó consentimiento informado para la realización del estudio.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Variables clínicas y demográficas

Se han incluido un total de 150 pacientes que cumplían los criterios de selección: 86 de ellos (57.4 %) tuvieron una infección por SARS-CoV-2 confirmada microbiológicamente (COVID-19), 27 (17.4 %) mostraban clínica, analítica y radiografía compatibles con infección viral pero las pruebas microbiológicas para SARS-CoV-2 fueron negativas (no – COV-ITR) y en 37 de ellos (24.7 %) se descartó la infección y requirieron valoración en urgencias u hospitalización por otros motivos (ID). Se han analizado muestras de 48 voluntarios sanos.

En las tablas 3 y 4 se muestran las características basales de los pacientes, la cronología de los síntomas, la estancia hospitalaria y su comorbilidad. En la tabla 5 se recogen los diagnósticos al alta de los pacientes clasificados como ID.

Sexo		COVID-19	No-COV-ITR	ID	<i>p</i>
	Mujer; N (%)	50 (58.1%)	16 (59.3%)	15 (40.5%)	0.166
	Varón; N (%)	36 (41.9%)	11 (40.7%)	22 (59.5%)	
Edad; Media en años (DT)	71.2 (17.9)	63.7 (22.6)	72 (17.3)	0.392	
Inicio de síntomas-ingreso; Media en días (DT)	6.14 (5.4)	8.04 (13.8)	9.09 (12.4)	0.714	
Inicio de síntomas – extracción; Media en días (DT)	6.12 (5.4)	8.36 (13.6)	9.25 (12.3)	0.915	
Estancia hospitalaria; Media en días (DT)	12.4 (12.9)	6.5 (10.7)	13.5 (16.5)	0.036	
Mortalidad N (%)	22 (25.6)	4 (14.8)	9 (24.3)	0.507	

Tabla 3. Características basales de los pacientes: características demográficas básicas y datos clínicos en el momento del ingreso. No-CoV-ITR: Infecciones respiratorias no causadas por SARS-CoV-2. ID: Otras patologías que motivaron ingreso hospitalario.

No se han detectado diferencias significativas entre los diferentes grupos y el sexo, la edad, la comorbilidad o el intervalo entre FIS e ingreso o extracción de la muestra de

sangre. La estancia hospitalaria es significativamente superior en los pacientes con COVID-19, en comparación con no-CoV-ITR.

		COVID-19		No-COV-ITR		ID		p
		N	%	N	%	N	%	
Comorbilidad (cualquiera)		69	80.2	20	74.1%	29	78.4	0.792
Comorbilidad	Obesidad (IMC ≥ 30 kg/m ²)	21	24.4	5	18.5	13	35.1	0.563
	Hipertensión arterial	46	53.5	14	51.9	17	45.9	0.744
	Diabetes mellitus	23	26.7	4	14.8	8	21.6	0.424
	Tabaquismo	2	2.4	2	7.4	5	13.5	0.053
	Cardiopatía crónica	15	17.4	3	11.1	9	24.3	0.389
	Enfermedad pulmonar crónica	9	10.5	7	25.9	4	10.8	0.104
	Asma	2	2.3	1	3.7	0	0.0	0.548
	Enfermedad renal crónica	10	11.6	4	14.8	3	8.1	0.699
	Enfermedad inflamatoria crónica	5	5.8	3	11.1	0	0.0	0.142
	Enfermedad neurológica crónica	13	15.1	8	29.6	6	16.2	0.219
	Demencia	21	24.4	7	25.9	7	18.9	0.854
	Neoplasia sólida activa	1	1.2	3	11.1	6	16.2	0.005
	Neoplasia hematológica activa	2	2.3	0	0.0	0	0.0	0.470
	VIH/SIDA	0	0	0	0.0	0	0.0	0.688
Otros	6	7.0	3	11.1	4	11.1	0.915	
Tratamiento inmunosupresor (cualquiera)		6	7.0	3	11.1	4	10.8	0.695
Tratamiento inmunosupresor	Quimioterapia	2	2.3	1	3.7	3	8.1	0.323
	Corticoides sistémicos	3	3.5	1	3.7	3	8.1	0.520
	Terapias biológicas	3	3.5	2	7.4	0	0.0	0.263
Barthel<60		32	37.2	9	33.3	9	24.3	0.380
Ingreso en UCI		9	10.5	0	0.0	3	8.1	0.217

Tabla 4. Comorbilidad de los grupos. No-CoV-ITR: Infecciones respiratorias no causadas por SARS-CoV-2. ID: Otras patologías que motivaron ingreso hospitalario.

Diagnóstico al alta en el grupo de ID	N
Cáncer de pulmón y otras neoplasias diseminadas	6
Agudización de EPOC	3
Tuberculosis pulmonar	2
Neumonitis por hipersensibilidad	1
Neumonía por <i>Legionella</i>	1
Hemoptisis	1
Insuficiencia Cardíaca	5
Pericarditis aguda	1
Dolor torácico	1
Colangitis	2
Cirrosis hepática	1
Diarrea aguda	1
Íleo mecánico	1
Descompensación diabética	1
Hematuria	1
Hemorragia cerebral	1
Agitación psicomotriz	1
Fractura de fémur	1
Absceso glúteo	1
Poliartritis inflamatoria	1
Demencia vascular	1
Otras (Bacteriemia por <i>Streptococcus agalactiae</i> , Sin patología urgente)	2

Tabla 5. Diagnósticos que motivaron ingreso o valoración en urgencias en el grupo de infección por SARS-CoV-2 descartada.

5.2 Análisis comparativo de poblaciones celulares, interleuquinas y quimioquinas entre COVID-19, no-COV-ITR e ID

5.2.1 COVID-19 en comparación con HDs

- A) **Recuento linfocitario.** En el grupo de COVID-19 se observa una disminución en la frecuencia de LTCD3⁺ (58.6 Vs 74.8; p 0.001), tanto de las subpoblaciones CD4⁺

(29.4 Vs 38.5) como CD8⁺ (4.5 vs 12), reflejando la linfopenia clínica habitual. El aumento de los LTCD4⁺ reguladores es una excepción (8.1 vs 5) (Figura 3A).

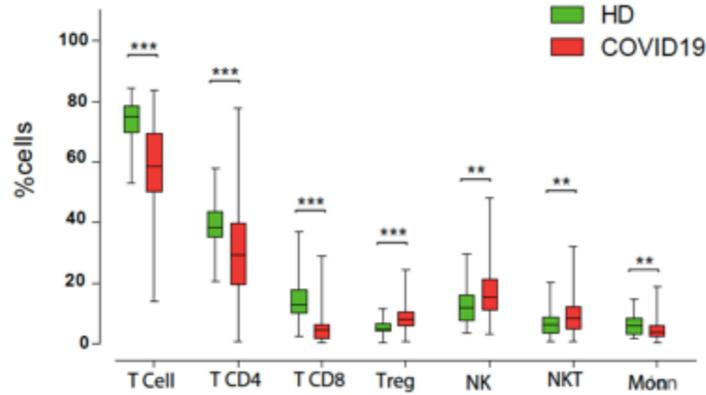


Figura 3A: Frecuencias de poblaciones celulares en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

A pesar de esta disminución en las cifras de LTCD8⁺, al analizar la expresión de los marcadores de activación (CD38⁺HLA-DR⁺GzmB^{High}) (Figura 3B) y de los puntos de control inmune inhibitorios (TIM3⁺, LAG3⁺, PD1⁺) (Figura 3C) en el grupo de COVID-19 se observa un aumento significativo de todos ellos en comparación con HDs (activación [4.9 vs 0.3]; agotamiento [0.8 vs 0.3], [8.2vs 1.5], [1.1 vs 1; $p < 0.019$]).

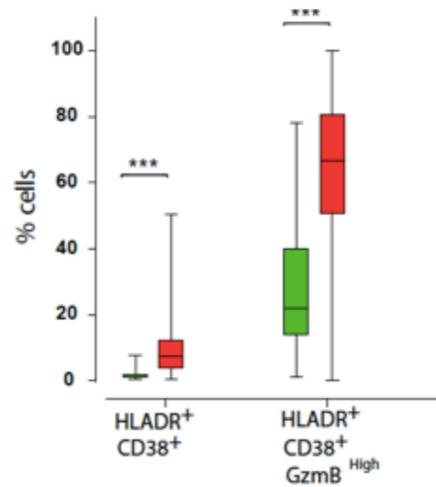


Figura 3B: Frecuencia de expresión de poblaciones de LTCD8⁺ activadas en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Sin embargo, al analizar los ICIs por separado de LTCD8⁺ activados (HLA-DR⁺CD38⁺) (Figura 3C), o exhaustos (GzmB^{low}), se ve que en los pacientes con COVID-19 la frecuencia de LTCD8⁺ activados que expresa TIM3 (13.7 vs 21.6; $p < 0.036$) o PD1 (10.8 vs 52.6) está reducida significativamente, mientras que la frecuencia de LTCD8⁺ exhaustos que expresan TIM3 (0.8 vs 0.3) o LAG3 (8.2 vs 1.5) se encuentra incrementada.

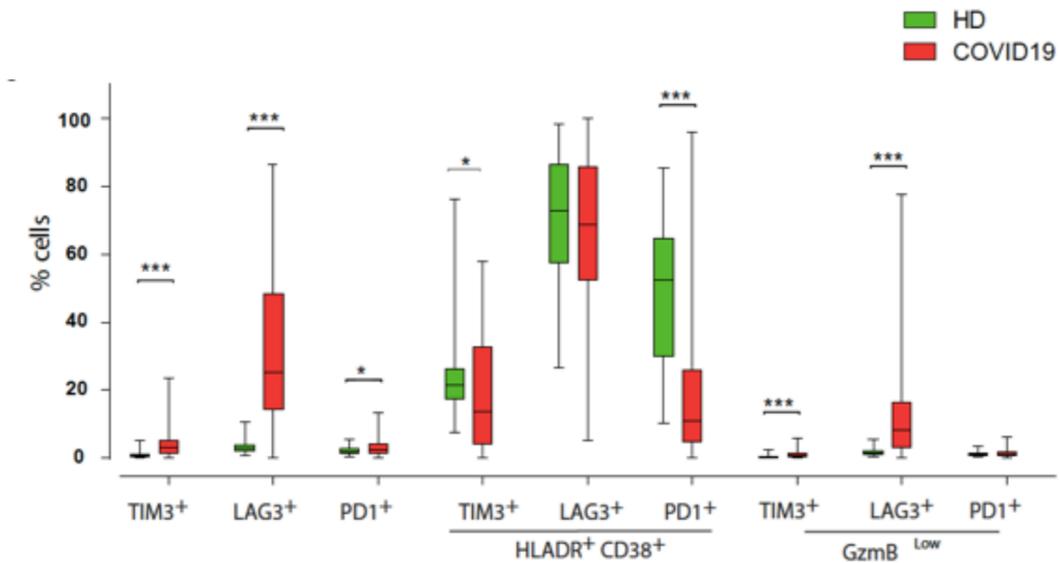


Figura 3C: Frecuencia de expresión de los puntos de control inmune inhibitorios en LTCD8⁺, en función de marcadores de activación (HLA-DR⁺, CD38⁺) y agotamiento (GzmB^{low}) en HDs y COVID-19. **p*<0.05, ***p*< 0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001

El mapa viSNE generado por citometría de flujo de alta dimensión muestra distintas densidades de regiones particulares, reflejando heterogeneidad en las subpoblaciones de LTCD8⁺ (Figura Suplementaria 1A) en COVID-19 en comparación con HDs. El FlowSOM obtenido de LTCD8⁺ también muestra diferencias entre COVID-19 y HDs, identificando diez grandes MTs de LTCD8⁺ basados en GzmB, CD38, HLA-DR, TIM3, LAG3 y expresión de PD1 (Figura Suplementaria 1B). MT2 y MT6 reflejan LTCD8⁺ exhaustos que expresan todos los ICIs (CD38⁺ HLA-DR⁺ GzmB^{low} TIM3⁺ PD1⁺ LAG3⁺). MT3 y MT8 corresponden a LTCD8⁺ activados (CD38⁺HLA-DR⁺GzmB^{high}) que expresan todos los ICIs o LAG3 y PD1 respectivamente. Todos estos MTs se encuentran aumentados en COVID-19 en comparación con HDs, diferencias que también se aprecian en el MST (Figura Suplementaria 4), donde vemos que MT2 es el clúster de mayor tamaño, representando una gran proporción de LTCD8⁺ exhaustos (GzmB^{low}) con expresión simultánea de todos los ICIs.

- B) **Células NK y NKT.** Se observa un aumento significativo de células NK y NKT en el grupo de COVID-19, con valores del 15.2 frente a 12 en HDs (*p* 0.001) y 8.4 frente

a 6.33 (p 0.003) respectivamente (Figura 3A), si bien no hay diferencias en las dos principales subpoblaciones, $NK^{CD56dim}$ (citotóxicas) y $NK^{CD56Bright}$ (inmunoreguladoras) con unos valores frente a HDs de 90.1 y 9.9 en comparación con 89.3 (p 0.267) y 10.7 (p 0.267) respectivamente (Figura 4A).

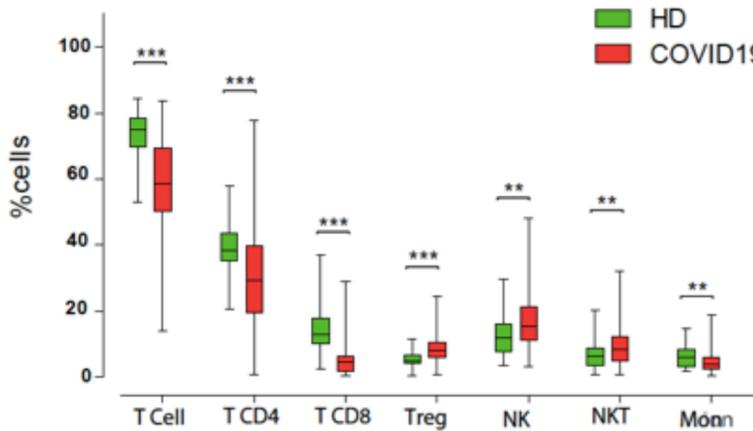


Figura 3A: Frecuencia de poblaciones celulares en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

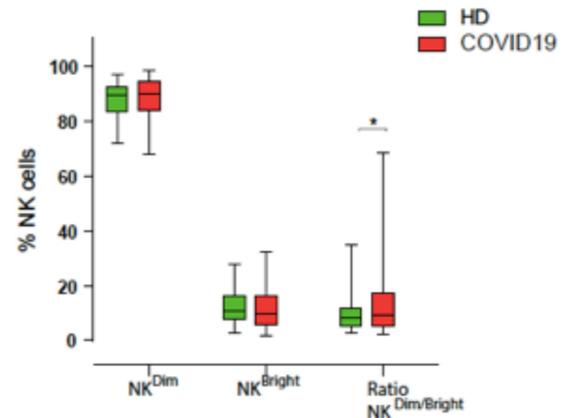


Figura 4A: Frecuencia de los diferentes tipos de células NK: $NK^{CD56Dim}$ (citotóxicas) y $NK^{CD56Bright}$ (inmunoreguladoras) en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

No obstante, la ratio $NK^{CD56Dim} / NK^{CD56Bright}$ resulta aumentada en el grupo de pacientes con infección por SARS-CoV-2.

En la figura 4B se muestra la expresión de los receptores de activación (NKp30/46, NKG2C/D), diferenciación (CD57) e inhibición (NKG2A) en la población de células $NK^{CD56Dim}$. Al analizar esta subpoblación, el perfil de células NK adaptativas ($CD16^+NKG2C^+CD57^+NKG2A^-$) muestra un llamativo aumento en COVID-19, alcanzando una mediana de un 21% en comparación con 3.9 en HDs. También se encuentran elevadas aquellas que expresan el receptor de activación NKG2D (98.7 vs 96.7), mientras que descienden también de forma significativa aquellas que expresan NKp30 (66.5 Vs 96.4).

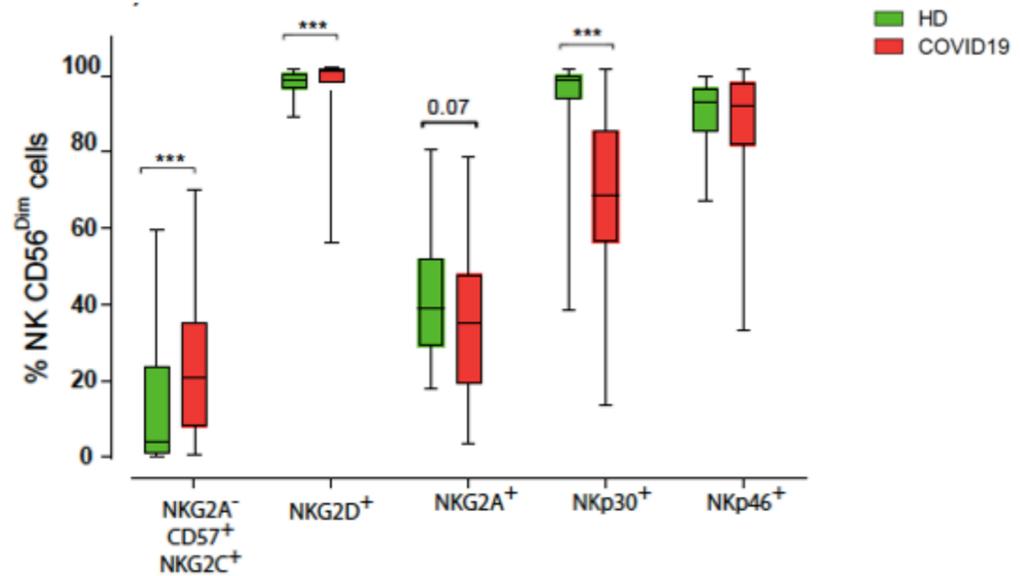


Figura 4B: Frecuencia de expresión de receptores de inhibición (NKG2A), activación (NKG2D, NKG2C, NKp30, NKp46) y de células NK adaptativas (NKG2A, CD57, NKG2C) en células NK^{CD56Dim} en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Igualmente, dentro de NK^{CD56Dim} se observa un aumento significativo tanto en las poblaciones activadas GzmB^{High}/PD1⁺, GzmB^{High}/LAG3⁺, GzmB^{High}/TIM3⁺ [(2.9 Vs 1.5); (11.4 Vs 0.5); (47.2 Vs 24.6)] como exhaustas GzmB^{Low}/LAG3⁺, GzmB^{Low}/TIM3⁺ [(21.6 Vs 3.6); (43.1 Vs 18.4)] en el grupo de pacientes COVID-19. Destaca que el porcentaje de células agotadas que expresan LAG3⁺ (21.6%) o PD1⁺ (12.5%) es superior a sus homólogas activadas (LAG⁺ 11.4 %; PD1⁺ 2.9 %), lo que sugiere una preponderancia de células NK exhaustas en COVID-19 (Figura 4C).

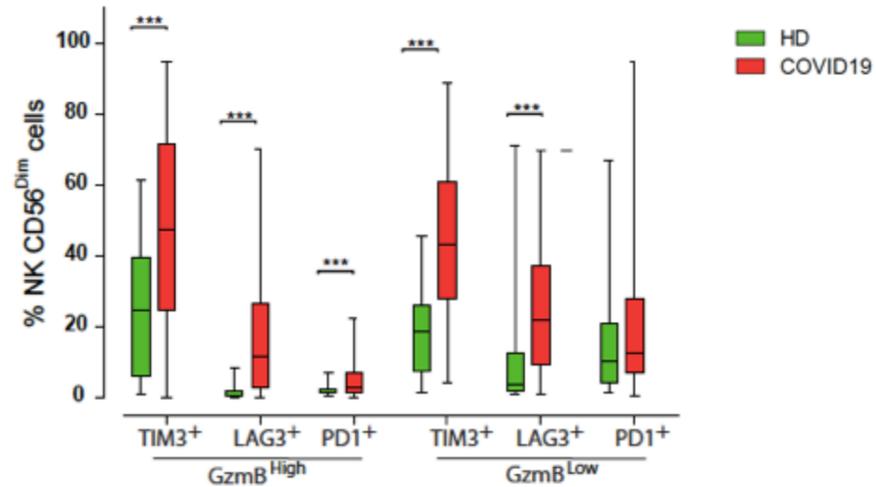


Figura 4C: Frecuencia de expresión de los puntos de control inhibitorios en función de la situación de activación ($GzmB^{High}$) y agotamiento ($GzmB^{Low}$) de células $NK^{CD56Dim}$ en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Las imágenes obtenidas por viSNE revelan distintas subpoblaciones de células NK en pacientes COVID-19 en comparación con HDs (Figuras Suplementarias 2A y 2C), siendo estos resultados confirmados en el mapa obtenido por FlowSOM y MST (Figuras Suplementarias 2B y 2D y Figuras Suplementarias 5 y 6). Dentro de los MTs celulares obtenidos, sólo MT7, representativo de las células NK adaptativas ($CD56^{Dim}CD16^{+}NKG2A^{-}NKG2C^{+}CD57^{+}$) muestra un aumento con respecto a HDs, al igual que ocurría en los datos de citometría convencional (Figura Suplementaria 2B). Al analizar los ICIs de las células NK, los mapeos de alta dimensión (Figura Suplementaria 2C) y FlowSOM (Figura Suplementaria 2D) identifican diez MTs muy diferentes entre los pacientes con infección y HDs. MT5 y MT7 representan respectivamente células $NK^{CD56Dim}$ exhaustas ($CD3^{-}$, $CD16^{+}$, $GzmB^{Low}$) y activadas ($CD3^{-}$, $CD16^{+}$, $GzmB^{High}$) que expresan TIM3 y LAG3, ambas significativamente elevadas en el grupo de COVID-19 en comparación con HDs. MT6, células $NK^{CD6B^{Bright}}$ exhaustas ($CD3^{-}$, $CD16^{-}$, $GzmB^{Low}$) que expresan todos los ICIs, se encuentran significativamente descendidas en el grupo de pacientes con infección. En las figuras suplementarias 5 y 6 se muestra el MST de la distribución celular de la población NK.

C) Monocitos. En comparación con HDs, en el grupo de COVID-19 se produce un descenso general de los niveles de monocitos (4 Vs 6.1; p 0.003) (Figura 3A).

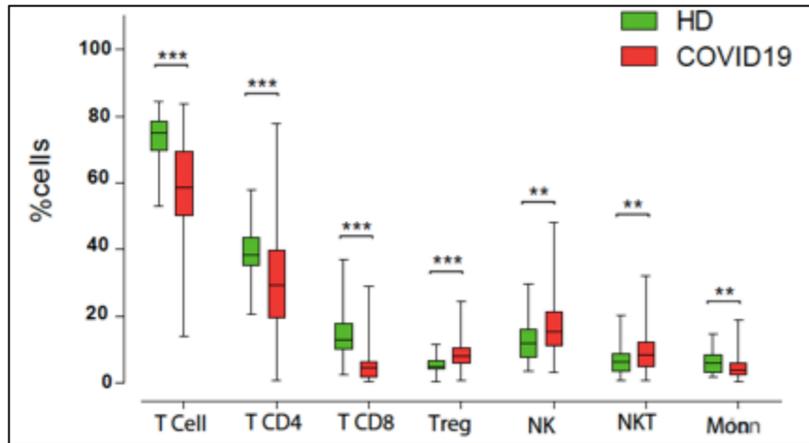


Figura 3A: Frecuencia de poblaciones celulares en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

No obstante, cuando los analizamos por subpoblaciones (Figura 5A/B/C) en COVID-19 vemos que hay un aumento en Monocitos intermedios (iMon, CD56⁻CD14⁺CD16⁺) (5.7 Vs 4; p 0.001) y un descenso en el de Monocitos no clásicos (ncMon, CD56⁻CD14⁻CD16⁺) (4.4 Vs 6.4; p 0.022), manteniéndose constante el número de Monocitos clásicos (cMon) con un porcentaje de 86 % en COVID-19 frente a 89 % en HDs (p 0.128). Respecto a la expresión de marcadores de agotamiento, en los cMon e iMon aumenta el porcentaje de células que expresan TIM3⁺ ([cMon 88.9 Vs 70.5]; [iMon 94.7 Vs 87.1; p 0.038]) mientras que desciende los que expresan LAG3⁺ ([cMon 20.9 Vs 69.1]; [iMon 53.5 Vs 77.1]). En los ncMon, descienden aquellos que expresan TIM3⁺ (37.6 Vs 50.3) y LAG3⁺ (29.5 Vs 38.8; p 0.001). El número de células que expresan PD1⁺ no varían en ninguna de las subpoblaciones al compararla con HDs (cMon [82.8 Vs 88.1; p 0.209]; iMon [93.9 Vs 94.7; p 0.301]; ncMon [68.3 vs 63.3; p 0.09]), lo que sugiere que la expresión de TIM3 y LAG3 puede ser más relevante que PD1 durante la regulación monocitaria en la respuesta inmune a SARS-CoV-2.

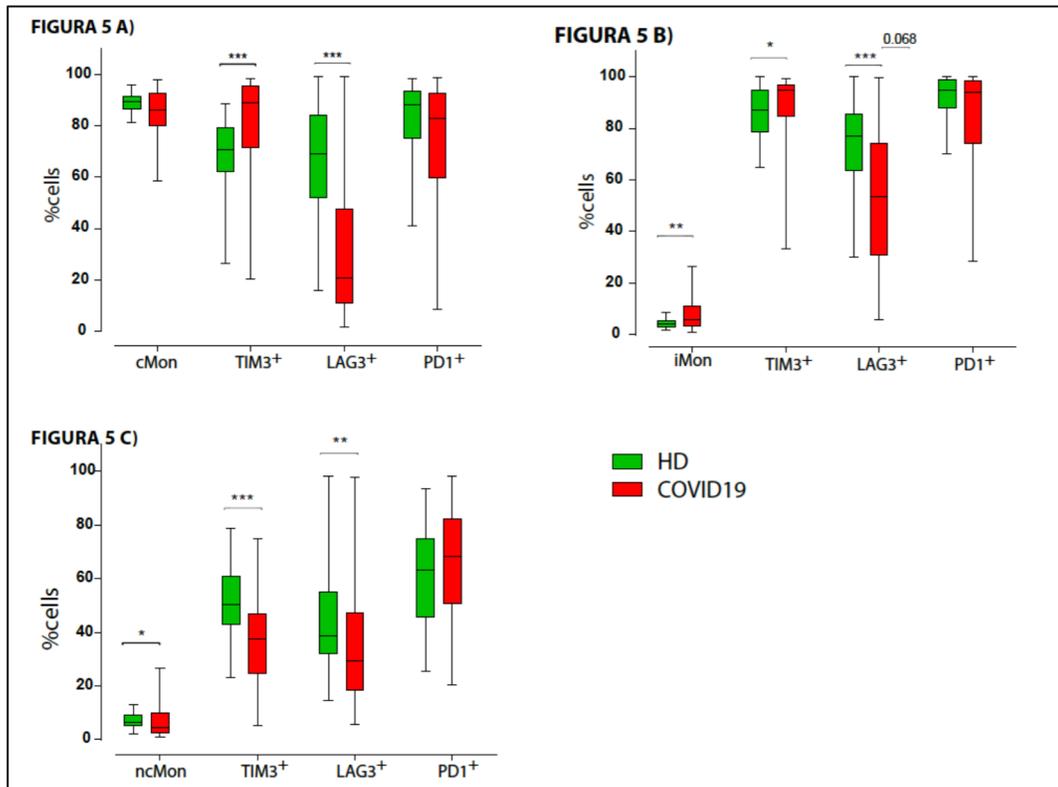


Figura 5: Frecuencia de expresión de los puntos de control inhibitorios en: **A**, monocitos clásicos (cMon), **B**, monocitos intermedios (iMon) y **C**, no clásicos (ncMon) en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

En la representación gráfica viSNE se muestran regiones monocitarias diferentes (Figura Suplementaria 3A), especialmente en cMon. El mapeo por FlowSOM identifica 5 MTs diferentes (Figura Suplementaria 3B). MT1, descendido en COVID-19, representa cMon (CD14⁺⁺, CD16⁻) con expresión elevada de GzmB, TIM3, LAG3 y PD1; MT3, indicativo de iMon activados (CD14⁺⁺, CD16⁺, GzmB^{High}, HLA-DR⁺ TIM3⁺, LAG3⁺ y PD1⁺) se encuentra aumentado en COVID-19. La frecuencia de MT2 descendía en COVID-19 mientras que MT5 aumenta, ambos representativos de ncMon: MT2 con altos niveles de TIM3, LAG3 y PD1 mientras que MT5 únicamente presenta niveles intermedios de PD1. En la figura suplementaria 7 se muestra la representación en MST.

Citoquinas y otros inmunomoduladores solubles

Encontramos un aumento generalizado y significativo en todas las citoquinas (interleuquinas y quimioquinas) inflamatorias en COVID-19 en comparación con HDs, a excepción de $IFN\beta$ (0 vs 0; p 0.318), el cual no se detecta en los pacientes ni en los HDs. Los principales miembros de la familia IL1 como $IL1\beta$, IL31, IL33 e IL36B y el $IFN\alpha$ se muestran muy variables, siendo en ocasiones bajos o indetectables en muchos pacientes. La excepción de los miembros de la familia IL1 es IL18, que se mantiene constantemente elevada en todos los pacientes con infección confirmada (533.7 vs 219.5) (Tabla 6).

Se encuentra también un aumento significativo en la concentración y actividad de GzmA (concentración [42.1 Vs 12.8]; actividad [907.6 Vs 0]) y GzmB (concentración [14 Vs 0.0] actividad [63 Vs 12.3]), en especial de la primera (Figura 6). Destaca un descenso de la fibronectina en el grupo de COVID-19 (1.6×10^8 Vs 4.4×10^8), la cual se ha descrito como sustrato de las granzimas. Respecto a los

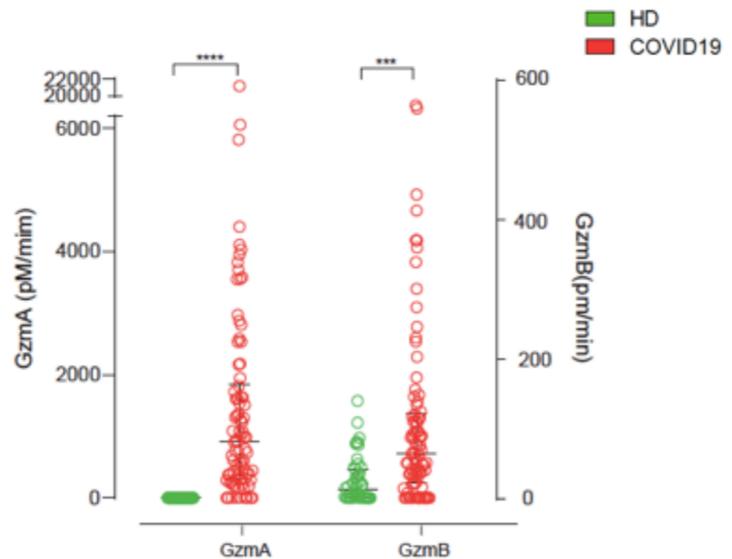


Figura 6: Actividad de GzmA y GzmB en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

inhibidores de GzmA, la $\alpha 2$ -macroglobulina (1.7×10^9 Vs 1.4×10^9 ; p 0.175) no varía mientras que la anti-trombina III aumenta (4.2×10^6 Vs 3.3×10^6) (Tabla 6).

Los niveles de ligandos solubles de NKG2D (MICs y ULBPs) están significativamente incrementados en COVID-19 en comparación con HDs (Tabla 6).

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

	HDs			COVID19			p
	mediana	Q1	Q3	mediana	Q1	Q3	
MICA	28,5	14,0	70,3	57,9	31,1	150,1	0,002
MICB	29,3	24,2	42,5	78,1	40,4	109,7	0,000
ULBP1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
ULBP-2/5/6	0,0	0,0	23,6	0,0	0,0	71,7	0,099
ULBP3	3,4	0,0	25,4	31,6	0,0	68,6	0,002
IL12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,2	0,003
IL25	0,0	0,0	61,6	0,0	0,0	44,6	ns
IL2	0,0	0,0	1,1	1,0	0,0	2,4	0,002
IL15	0,8	0,0	1,2	3,4	1,6	7,7	0,000
IL6	0,7	0,4	1,5	15,3	5,6	51,8	0,000
IL1 B	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	1,3	0,002
IL18	219,5	180,8	305,3	533,7	339,1	808,4	0,000
IL1RA	3,6x10 ²	2,5x10 ²	6,6x10 ²	3,4x10 ³	1,8x10 ³	8,4x10 ³	0,000
IL36 B	1,0	0,3	1,5	3,7	1,0	5,7	0,000
IL33	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,003
IL31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,002
IL7	2,3	1,2	3,2	2,9	1,5	5,3	0,048
IL10	0,0	0,0	0,8	1,3	0,0	6,0	0,001
IL8/CXCL8	2,7	1,3	4,0	7,4	3,7	12,4	0,000
CXCL10	33,0	20,7	54,2	346,1	61,2	1181,4	0,000
CCL2	122,3	97,0	158,7	243,6	150,1	379,7	0,000
CXCL2	185,5	68,0	337,4	281,2	114,5	714,5	0,016
CXCL9	0,0	0,0	210,7	597,2	305,0	846,9	0,000
CCL8	11,3	2,4	26,0	81,2	36,7	164,5	0,000
IFN-λ3	23,5	0,0	45,5	17,3	0,0	48,9	ns
IFN-λ2	0,0	0,0	24,2	0,0	0,0	43,0	ns
IFNα	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	9,2	0,000
IFNγ	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	10,6	0,000
IFNβ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
FAS L	16,1	12,2	21,2	18,3	11,4	26,1	ns
TNFα	2,0	1,3	2,7	5,9	4,2	9,7	0,000
TRAIL	77,3	50,7	99,1	36,4	15,8	70,5	0,000
[Granzima A]	12,8	2,1	20,2	42,1	24,8	50,9	0,000
Actividad GzmA	0,0	0,0	0,0	907,6	315,0	1816,15	0,000
[Granzima B]	0,0	0,0	3,7	14,0	7,4	21,2	0,000
Actividad GzmB	12,3	0,0	38,3	63,0	21,4	119,3	0,000

Tabla 6. Valores de los ligandos solubles en HDs y COVID-19. N.s: no significativo.

5.2.2 COVID-19 en comparación con no-COV-ITR

Poblaciones celulares:

A) **Recuento linfocitario.** Al contrario de lo observado al comparar COVID-19 con HDs, cuando se compara el grupo de COVID-19 con no-CoV-ITR, no se detectan diferencias en los niveles de LTCD3⁺ (58.6 Vs 57.6; p 0.475), ni en las subpoblaciones CD4⁺ (29.4 Vs 26.4; p 0.178), CD8⁺ (28.9 Vs 24.8; p 0.917) ni en los linfocitos T reguladores (8.1 Vs 8.3; p 0.098) (Figura 3A).

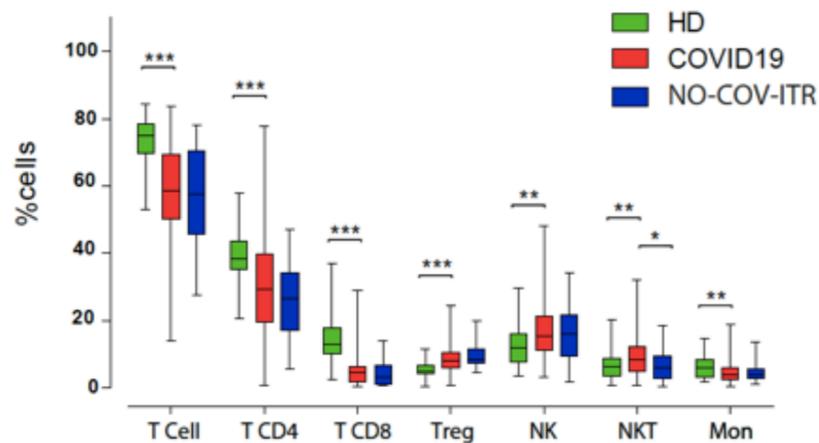


Figura 3 A: Frecuencia de poblaciones celulares en HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

En cambio, al igual que ocurría al comparar con HDs, los niveles de LTCD8⁺ activados en COVID-19 (4.9 Vs 1.7; p 0.001) se observan aumentados en comparación con no-COV-ITR (Figura 7A). Pese al aumento significativo en la población total de LTCD8⁺ que expresan LAG en COVID-19, no se encuentran diferencias en la cohorte de LTCD8⁺ exhaustos (GzmB^{low}) (Figura 7B).

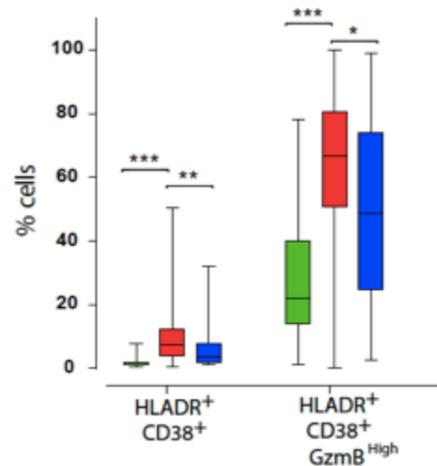


Figura 7A: Frecuencia de expresión de marcadores de activación en LTCD8⁺ en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

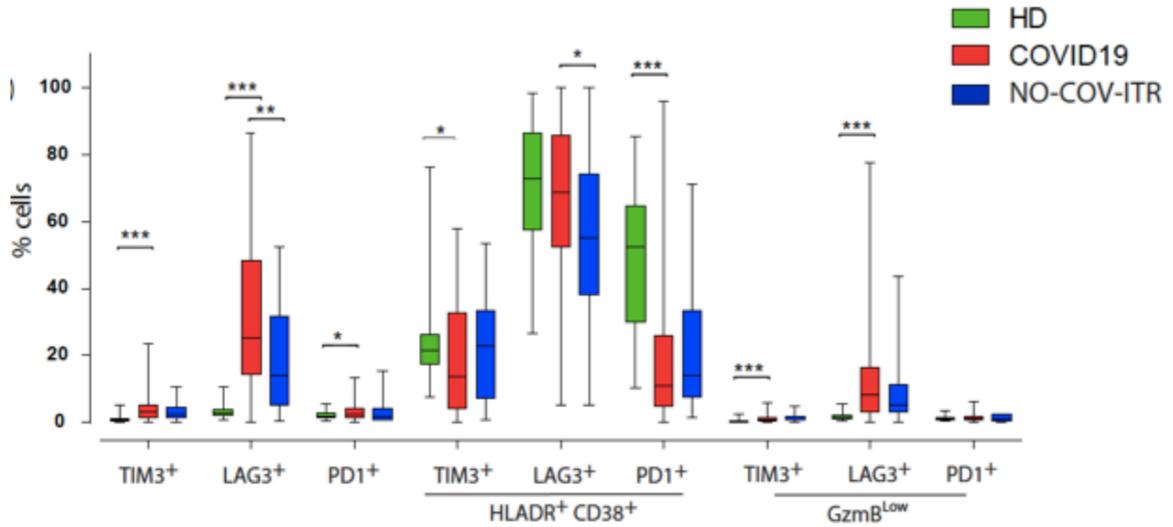


Figura 7B: Frecuencia de expresión de los puntos de control inhibitorios en LTCD8⁺, en función de marcadores de activación (HLA-DR⁺, CD38⁺GzmB^{High}) y agotamiento (GzmB^{Low}) en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. **p*<0.05, ***p*< 0.01, *** *p*<0.001, *****p*<0.0001

Al igual que en las imágenes obtenidas por viSNE y FlowSOM en COVID-19, en no-COV-ITR también se ve una gran heterogeneidad en la población de LTCD8⁺ (Figura Suplementaria 1A), siendo posible diferenciar claramente cada grupo de diagnóstico según las poblaciones observadas en cada grupo. Al comparar los MTs representativos de la misma distribución de poblaciones e ICIs comentados en el punto 5.2.1 A), MT2, 3, 6 y 8, similar a lo que ocurría al comparar COVID-19 frente a HDs, también están aumentadas al relacionarlo con no-COV-ITR (Figura Suplementaria 1B) de modo similar a lo que ocurría al comparar COVID-19 frente a HDs.

- B) **Células NK y NKT.** Tampoco se detectan diferencias en los niveles de células NK (15.2 Vs 16; *p* 0.858). Los niveles de NKT son significativamente superiores en el grupo de COVID-19 con un porcentaje de 8.4 en comparación con 6.0 en el grupo no-COV-ITR (*p* 0.040) (Figura 3A). No se observan diferencias entre las subpoblaciones citotóxicas e inmunorreguladoras (Figura 8A).

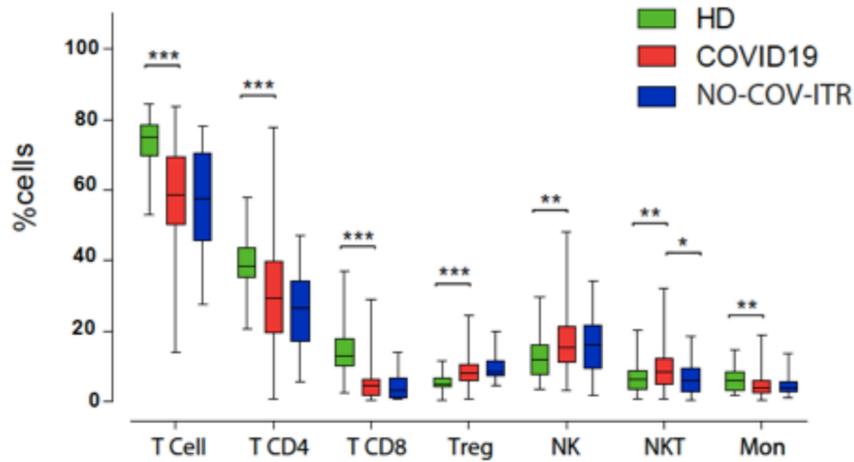


Figura 3A: Frecuencia de poblaciones celulares en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

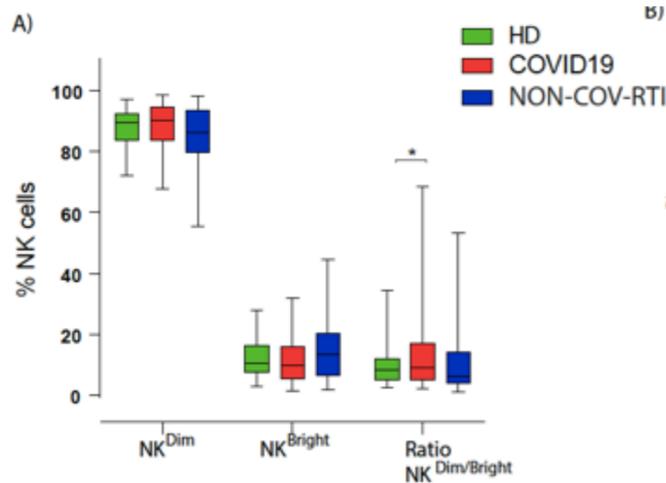


Figura 8A: Frecuencia de células $NK^{CD56Dim}$ y $NK^{CD56Bright}$ en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Al analizar los datos en referencia a la expresión de receptores de activación, diferenciación y agotamiento, no se encuentran diferencias en CD57, NKG2D, NKG2A, NKp30 ni NKp46 (Figura 8B). En cambio, similar a lo que ocurría al comparar COVID-19 con HDs, las poblaciones de células $NK^{CD56Dim}$ activadas y exhaustas están incrementadas en el grupo de COVID-19 en comparación con no-COV-ITR. En concreto los ICIs PD1+ y especialmente LAG3+, ($gzmB^{High}/PD1+$ [2.9 Vs 1.3; $p < 0.002$], $gzmB^{High}/LAG3+$ [11.4 Vs 4.5; $p < 0.017$]; $gzmB^{Low}/PD1+$ [12.5 Vs 6.5; $p < 0.034$], $gzmB^{Low}/LAG3+$ [21.6 Vs 10.9; $p < 0.007$]) (Figura 8C).

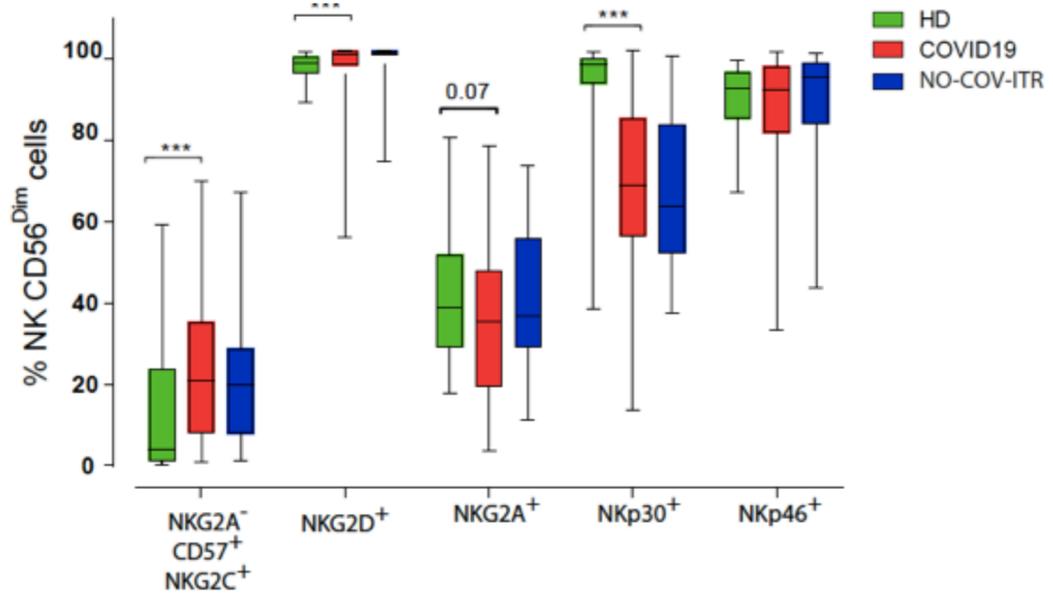


Figura 8B: Frecuencia de expresión de receptores de inhibición (NKG2A), activación (NKG2D, NKG2C, NKp30, NKp46) y de células NK adaptativas (NKG2A⁻, CD57⁺, NKG2C⁺) en células NK^{CD56Dim} en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

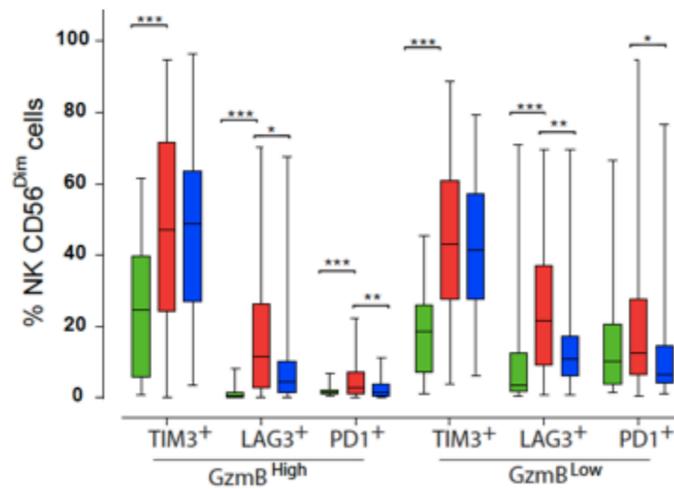


Figura 8C: Frecuencia de expresión de los puntos de control inhibitorios en función de la situación de activación (GzmB^{High}) y agotamiento (GzmB^{Low}) de células NK^{CD56Dim} en HDs y COVID-19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Las representaciones obtenidas por viSNE (Figuras Suplementaria 2A y 2C) y FlowSOM (Figuras Suplementarias 2B y 2D) revelan las distintas subpoblaciones de células NK en el grupo de no-COV-ITR, observándose diferentes MTs. Similar

a lo que ocurría al comparar COVID-19 con HDs, MT7 correspondiente a células NK adaptativas (CD56Dim, CD16+, NKG2A-, NKG2C+, CD57+) está aumentado en COVID-19 en relación con no-COV-ITR (Figura Suplementaria 3A). MT5, 6 y 7 correspondientes a la figura suplementaria 4 diferencian también COVID-19 con no-COV-ITR. MT5 y MT7 representan respectivamente células NK^{CD56Dim} agotadas (CD3-, CD16+, GzmB^{low}) y activas (CD3-, CD16+, GzmB^{high}) que expresan TIM3 y LAG3, significativamente elevadas en no-COV-ITR en comparación con COVID-19. MT6, células NK^{CD56Bright} exhaustas que expresan todos los ICIs, está disminuida en no-COV-ITR, al igual que MT3 (células NK^{CD56Dim} activadas) y MT9 (células NKT) que también se observa descendidas en no-COV-ITR.

- C) **Monocitos:** No se detectan diferencias en la frecuencia de monocitos entre COVID-19 y no-CoV-ITR (Figura 3A).

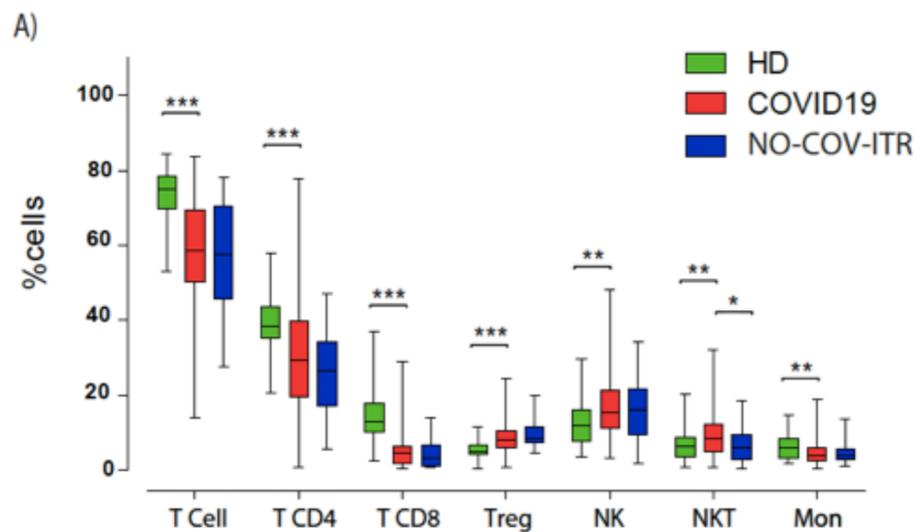


Figura 3 A: Frecuencia de poblaciones celulares entre HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Únicamente los iMon (CD56⁻CD14⁺CD16⁺) se encuentran elevados en COVID-19. No se produce ningún cambio significativo al analizar los ICIs, a excepción de en ncMon (CD56⁻CD14⁻CD16^{High}) con expresión de PD1⁺ que está disminuido en no-COV-ITR (68.3 Vs 53.5; $p < 0.013$) (Figura 9 A/B/C).

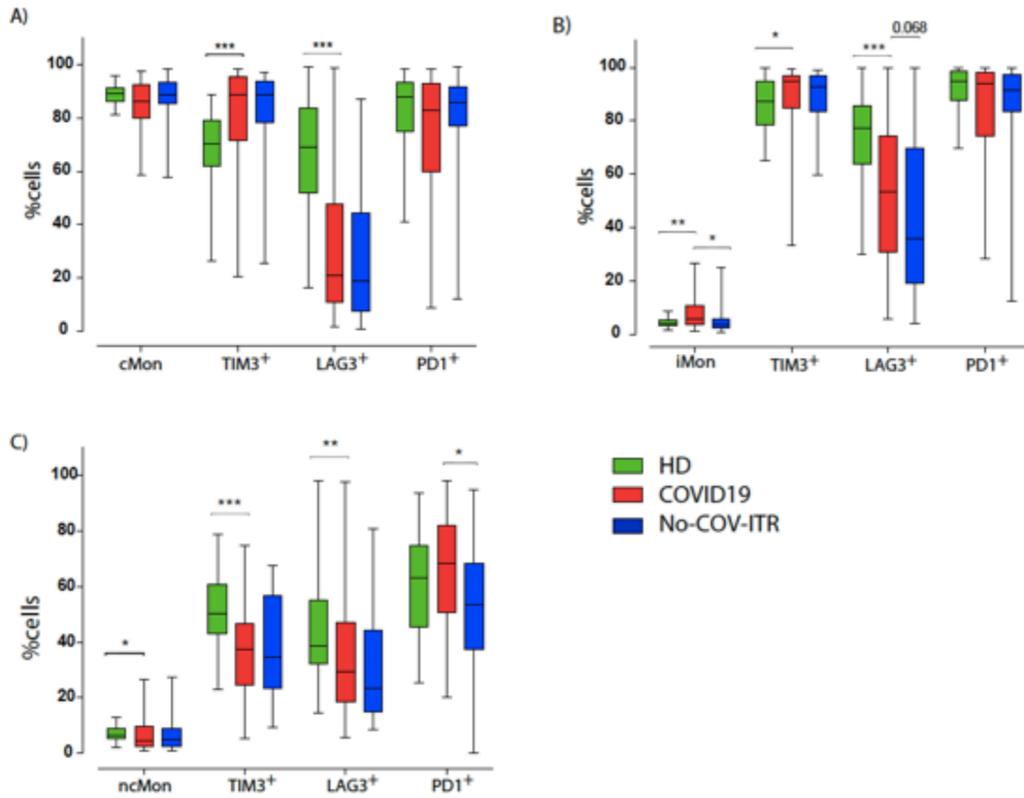


Figura 9: Frecuencia de expresión de los puntos de control inhibitorios en **A**, monocitos clásicos (cMon), **B**, intermedios (iMon) y **C**, no clásicos (ncMon) en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Al analizar los MTs por viSNE y FlowSOM, únicamente MT4, representativo de cMon con baja expresión de PD1 ($CD14^+$, $CD16^-$, $GzmB^{low}$, $TIM3^-$, $LAG3^-$, $PD1^+$), se encuentra más elevado en no-COV-ITR. MT3, indicativo de iMon activados ($CD14^+$, $CD16^+$, $GzmB^{high}$, $HLA-DR^+$, $TIM3^+$, $LAG3^+$ y $PD1^+$) también está elevado en no-COV-ITR (Figuras Suplementarias 3A y 3B).

Citoquinas y otros inmunomoduladores solubles

A la hora de analizar el perfil de citoquinas en plasma entre el grupo de COVID-19 y no-COV-ITR se encuentran diferencias menos llamativas que al comparar con HDs.

Varios miembros de la familia de IL1 como IL18 (533.7 Vs 312.2; p 0.006), IL36B (3.7 Vs 0.9) e IL31 (38.2 Vs 1.6; p 0.042) muestran un incremento significativo, al igual que TRAIL (36.4 Vs 23.1; p 0.025), IL2 (1.0 Vs 0.0; p 0.024), IFN- α (1.7 Vs 0.0) y TNF α (5.9 Vs 3.6; p 0.007) en el grupo de infección por SARS-CoV-2. El resto de las citoquinas analizadas como IL6, IL12, IL15, IL7, IL1 β o IL10 no diferencian entre COVID-19 y no-COV-ITR (Tabla 7).

Las quimioquinas implicadas en la movilización de células T, NK y monocitos como CXCL10 (346.1 Vs 61.5; p 0.002), CCL2 (243.6 Vs 142.6; p 0.034) y CCL8 (81.2 Vs 24.9) aumentan de forma significativa en el grupo de COVID-19 en comparación con no-COV-ITR. CXCL9 aumenta también en COVID-19 pero no llega a alcanzar la significación estadística (597.2 Vs 388.8; p 0.059). También se encuentran incrementados los ligandos solubles de NKG2D (57.9 Vs 29.6; p 0.006); (31.6 Vs 8.9; p 0.035) (Tabla 7).

En este grupo sólo la concentración de GzmB aumenta de modo significativo al comparar SARS-CoV-2 con no-COV-ITR (14 Vs 9.4; p 0.011). La actividad de Gzms no diferencia entre ambos grupos (Figura 10), siendo la cantidad de fibronectina (substrato de las Gzms) en plasma similar entre ambos grupos (Tabla 7).

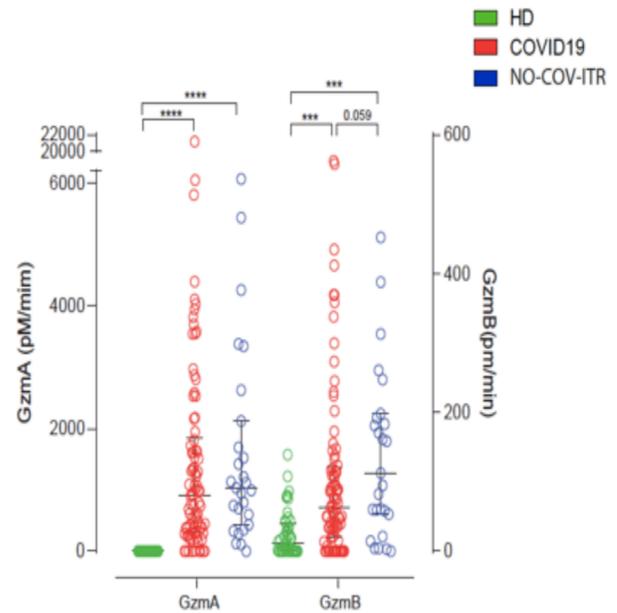


Figura 10: Actividad de GzmA y GzmB en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

	COVID19			no-COV-ITR			p
	mediana	Q1	Q3	mediana	Q1	Q3	
MICA	57,9	31,1	150,1	29,6	6,5	47,4	0,006
MICB	78,1	40,4	109,7	55,2	40,1	81,4	ns
ULBP1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
ULBP-2/5/6	0,0	0,0	71,7	0,0	0,0	54,5	ns
ULBP3	31,6	0,0	68,6	8,9	0,0	34,5	0,035
IL12	0,0	0,0	55,2	0,0	0,0	39,2	ns
IL25	0,0	0,0	44,6	0,0	0,0	32,8	ns
IL2	1,0	0,0	2,4	0,0	0,0	2,3	0,024
IL15	3,4	1,6	7,7	2,4	0,5	4,7	ns
IL6	15,3	5,6	51,8	7,4	2,5	33,3	ns
IL1 B	0,1	0,0	1,3	0,3	0,0	1,4	ns
IL18	533,7	339,1	808,4	312,2	225,6	673,3	0,006
IL1RA	3,4x10 ³	1,8x10 ³	8,4x10 ³	1,6x10 ³	7,9x10 ²	5x10 ³	0,017
IL36 B	3,7	1,0	5,7	0,9	0,2	1,9	0,000
IL33	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,6	ns
IL31	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,042
IL7	2,9	1,5	5,3	2,6	1,4	4,5	ns
IL10	1,3	0,0	6,0	0,0	0,0	2,6	ns
IL8/CXCL8	7,4	3,7	12,4	4,7	3,7	16,1	ns
CXCL10	346,1	61,2	1181,4	61,5	50,4	165,8	0,002
CCL2	243,6	150,1	379,7	142,6	92,8	305,6	0,034
CXCL2	281,2	114,5	714,5	389,1	106,3	712,8	ns
CXCL9	597,2	305,0	846,9	388,8	110,9	671,2	0,059
CCL8	81,2	36,7	164,5	24,9	16,3	54,0	0,000
IFN-λ3	17,3	0,0	48,9	1,5	0,0	31,0	ns
IFN-λ2	0,0	0,0	43,0	0,0	0,0	43,0	ns
IFNα	1,7	0,0	9,2	0,0	0,0	0,0	0,000
IFNγ	1,8	0,0	10,6	0,0	0,0	12,5	ns
IFNβ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
FAS L	18,3	11,4	26,1	20,7	15,4	32,6	ns
TNFα	5,9	4,2	9,7	3,6	3,3	6,7	0,007
TRAIL	36,4	15,8	70,5	23,1	5,9	40,0	0,025
[GRANZIMA A]	42,1	24,8	50,9	33,6	14,7	47,4	ns
Actividad GzmA	907,6	315,0	1816,5	1035,0	432,2	2122,5	0,435
[GRANZIMA B]	14,0	7,4	21,2	9,4	1,4	12,7	0,011
Actividad GzmB	63,0	21,4	119,3	112,7	53,4	198,0	0,054
Fibronectina	1,6x10 ⁸	8,3x10 ⁷	2,3x10 ⁸	1,2x10 ⁸	7,6x10 ⁷	2,5x10 ⁸	0,731

Tabla 7. Valores de los ligandos solubles en COVID-19 y no-COV-ITR. N.s: no significativo.

5.2.3 COVID-19 en comparación con Infección descartada

Poblaciones celulares

- A) **Recuento linfocitario.** Al comparar los pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2 con aquellos en los que se descartó este proceso y fueron valorados u hospitalizados por otras patologías (ID), se observa un aumento generalizado de LTCD3⁺ (58.6 Vs 53.1; p 0.039), en especial de la subpoblación CD4⁺ (29.4 Vs 20.1; p 0.001). No ocurre así en la de CD8⁺ (28.9 Vs 32; p 0.189) ni en los linfocitos T reguladores (8.1 Vs 7.1; p 0.230) (Figura 11). También existe un aumento en el porcentaje de LTCD8⁺ activados (4.9 Vs 1.8).
- B) **Células NK y NKT.** No se encuentran variaciones en la población de células NK (15.2 Vs 14.3; p 0.681), NKT (8.4 Vs 7.1; p 0.434) (Figura 11), ni en sus dos subpoblaciones principales citotóxicas (90.1 Vs 90.2; p 0.749) e inmunomoduladoras (9.9 Vs 9.8; p 0.749). En cambio, al igual que ocurría al comparar con HDs, sí que se observa un aumento significativo en COVID-19 en las células NK^{CD56Dim} activadas y exhaustas referentes a aquellas que expresan los puntos de control inhibitorios LAG3⁺ y PD1⁺ (GzmB^{high}/LAG3⁺ [11.4 Vs 3.4; p 0.002], GzmB^{high}/PD1⁺ [2.9 Vs 1.2; p 0.003], GzmB^{low}/LAG3⁺ [21.6 Vs 18.2; p 0.021] GzmB^{low}/PD1⁺ [12.5 Vs 8.3; p 0.085]) (Figura 12).
- C) Al analizar los monocitos no hay variaciones significativas entre COVID-19 e ID (Figura 11).

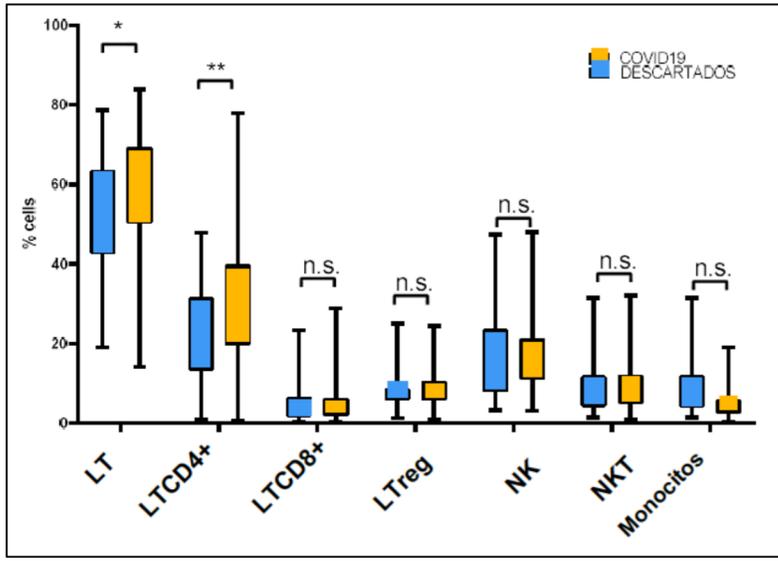


Figura 11. Frecuencia de poblaciones celulares en COVID-19 e infección descartada. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

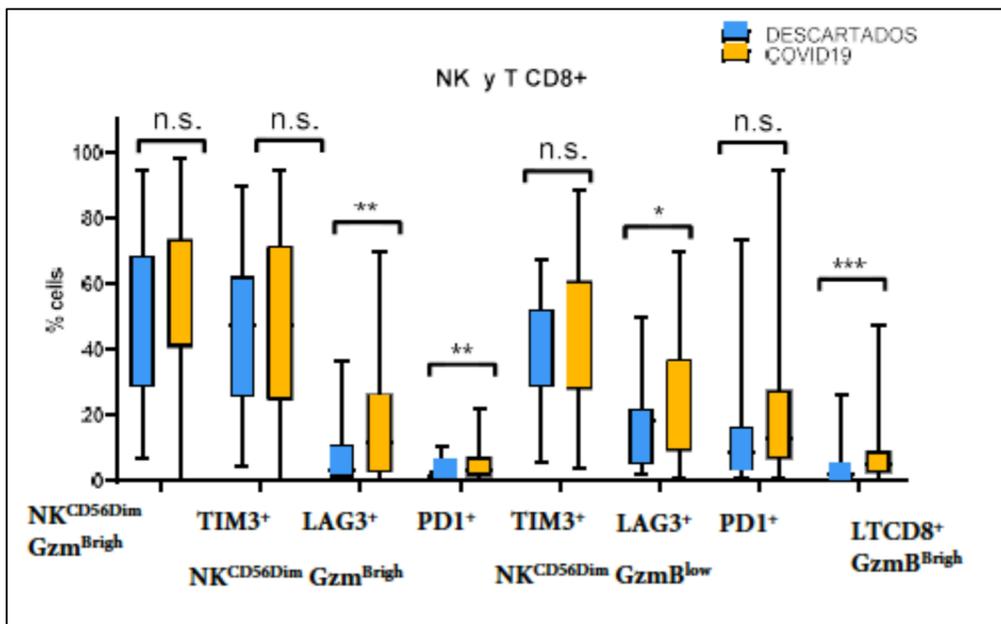


Figura 12. Frecuencia de células NK^{CD56Dim} activadas y exhaustas con expresión de puntos de control inhibitorios TIM3, LAG3, PD1 y frecuencia de LTCD8⁺ activados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Citoquinas y otros inmoduladores solubles

Los niveles de algunas citoquinas no varían entre COVID-19 e ID; como IL6 (15.3 Vs 9.6; p 0.546), IL12 (0 Vs 0; p 0.860), IL15 (3.4 Vs 1.8; p 0.052), IL7 (2.9 Vs 1.7; p 0.061), IL1B (0.1 Vs 0; p 0.791), IL10 (1.3 Vs 0.0; p 0.069), IL18 (533.7 Vs 531.1; p 0.928) o IL8 (7.4 Vs 7.4; p 0.937). Otras como TNF- α (5.9 Vs 4.4; p 0.022), IFN- α (1.7 Vs 0.0; p 0.000), IFN- γ (1.8 Vs 0.0; p 0.034), IL2 (1 Vs 0.4; p 0.022), IL1RA (3.4x10³ Vs 1.7x10³; p 0.013), IL31 (38.2 Vs 0.4; p 0.026), IL36 (3.7 Vs 0.5) y TRAIL (36.4 Vs 17.2) sí que se incrementan de modo significativo en COVID-19 (Tabla 8).

Se observa que todas las quimioquinas analizadas (CXCL10, CCL2, CXCL2, CXCL9, CCL8) se encuentran significativamente elevadas en el grupo COVID-19 [(346.1 Vs 75.3; p 0.002); (243.6 Vs 139.8; p 0.004); (281.2 Vs 165.9; p 0.011); (597.2 Vs 366.8; p 0.044); (81.2 Vs 29.9)], con la excepción de CXCL8 (7.4 Vs 7.4; p 0.937).

Las concentraciones de GzmA (42.1 Vs 26.6; p 0.040) y GzmB (14 Vs 6.7; p 0.007) están aumentadas significativamente en el grupo de COVID-19 en comparación con ID. En el caso de la actividad de GzmA no hay diferencias estadísticamente significativas (907.6 Vs 972.3; p 0.654), si bien la actividad de GzmB está elevada en el grupo de ID (63 Vs 102.3; p 0.043). No se observa descenso en los niveles de fibronectina encontrado al comparar con en el grupo de HDs (Tabla 8 y Figura 13).

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

	COVID19			ID			p
	mediana	Q1	Q3	mediana	Q1	Q3	
MICA	57,9	31,1	150,1	33,9	18,9	97,4	0,050
MICB	78,1	40,4	109,7	72,3	41,9	107,9	0,798
ULBP1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,627
ULBP-2/5/6	0,0	0,0	71,7	0,0	0,0	23,6	0,310
ULBP3	31,6	0,0	68,6	15,5	1,4	34,0	0,115
IL12	0,0	0,0	55,2	0,0	0,0	63,0	0,860
IL25	0,0	0,0	44,6	0,0	0,0	39,8	0,683
IL2	1,0	0,0	2,4	0,4	0,0	1,4	0,022
IL15	3,4	1,6	7,7	1,8	1,2	4,2	0,052
IL6	15,3	5,6	51,8	9,6	5,0	38,1	0,546
IL1 B	0,1	0,0	1,3	0,0	0,0	1,4	0,791
IL18	533,7	339,1	808,4	531,1	349,7	836,0	0,928
IL1RA	3,4x10 ³	1,8x10 ³	8,4x10 ³	1,7x10 ³	9,6x10 ²	3,6x10 ³	0,013
IL36 B	3,7	1,0	5,7	0,5	0,2	1,7	0,000
IL33	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	1,7	0,403
IL31	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,026
IL7	2,9	1,5	5,3	1,7	1,0	4,1	0,061
IL10	1,3	0,0	6,0	0,0	0,0	2,0	0,069
CXCL8	7,4	3,7	12,4	7,4	3,6	14,0	0,937
CXCL10	346,1	61,2	1181,4	75,3	36,1	188,4	0,002
CCL2	243,6	150,1	379,7	139,6	81,9	257,9	0,004
CXCL2	281,2	114,5	714,5	165,9	63,4	376,6	0,011
CXCL9	597,2	305,0	846,9	366,8	167,5	692,3	0,044
CCL8	81,2	36,7	164,5	29,9	16,3	52,6	0,000
IFN-λ3	17,3	0,0	48,9	10,1	0,0	24,8	0,096
IFN-λ2	0,0	0,0	43,0	14,4	0,0	70,0	0,231
IFNα	1,7	0,0	9,2	0,0	0,0	0,6	0,000
IFNγ	1,8	0,0	10,6	0,0	0,0	2,3	0,034
IFNβ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,830
FAS L	18,3	11,4	26,1	15,6	10,9	23,9	0,176
TNFα	5,9	4,2	9,7	4,4	3,3	7,4	0,022
TRAIL	36,4	15,8	70,5	17,2	1,6	25,9	0,000
[GRANZIMA A]	42,1	24,8	50,9	26,6	16,1	45,4	0,040
Actividad GzmA	907,6	315,0	1816,5	972,3	136,3	2213,9	0,654
[GRANZIMA B]	14,0	7,4	21,2	6,7	3,8	15,0	0,007
Actividad GzmB	63,0	21,4	119,3	102,3	41,4	205,3	0,043
Fibronectina	1,6x10 ⁸	8,3x110 ⁷	2,33x10 ⁸	1,1x10 ⁸	7,8x10 ⁷	2,2x10 ⁸	0,191

Tabla 8. Valores de los ligandos solubles en COVID-19 e ID. N.s: no significativo.

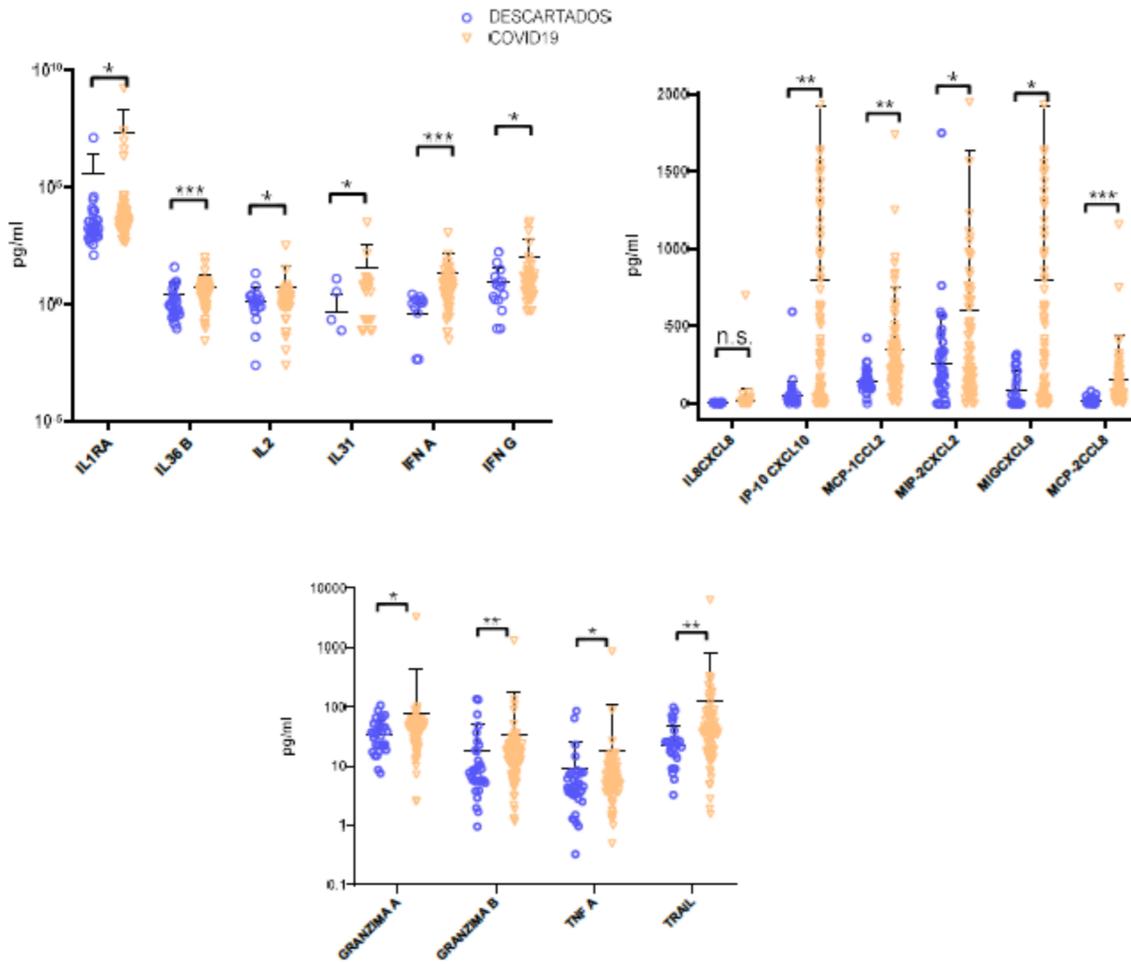


Figura 13. Niveles de interleuquinas, quimioquinas y concentración de granzimas en COVID-19 e infección descartada. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

5.3 Correlación del pronóstico de la infección por SARS-CoV-2 con poblaciones celulares y niveles de citoquinas y otros inmunomoduladores solubles

Este análisis se ha llevado a cabo en el grupo de COVID-19, puesto que el interés radica en comparar la evolución y la supervivencia únicamente en el grupo de perfil inmune asociado al SARS-CoV-2.

5.3.1 Con la gravedad al ingreso

Del total de 85 pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2, 35 (41.3 %) son leves, 43 (50.5 %) moderados y 7 (8.2 %) graves. En la tabla 9 se describen las características de cada uno de los grupos.

Se observan diferencias significativas al analizar la estancia hospitalaria y la mortalidad entre los pacientes más leves frente a las categorías de moderado y graves. Por este motivo, esta clasificación inicial se reunificó en dos subgrupos: leves y moderados/graves. También se producen diferencias entre la comorbilidad observada entre ambos subgrupos y el patrón clínico. Las características de estos grupos quedan reflejadas en la tabla 10. La media de edad en el grupo de COVID-19 leve es de 61, mientras que en el grupo de moderados/graves es significativamente superior (80). La estancia hospitalaria también es significativamente diferente entre los dos grupos. No hay diferencias en la media de días entre FIS y fecha de extracción de las muestras entre los dos grupos de gravedad, lo cual indica que esta última fecha no influye en los resultados obtenidos. En relación con las comorbilidades, la gravedad por SARS-CoV-2 se incrementa en pacientes con cardiopatía crónica, hipertensión arterial, enfermedad respiratoria crónica, obesidad y demencia (Tabla 11 y 12).

	Leve (n= 35)	Moderado (n= 43)	Grave (n=7)	p
Edad; Media en años (DT)	61.5 (19.3)	77.5 (13.9)	80.6 (10.2)	0.141
Mujeres; N (%)	21 (60%)	24 (54.5)	5 (71.4%)	0.673
Inicio de síntomas-ingreso; Media en días (DT)	8 (7.1)	4.95 (3.3)	4.29 (3.2)	0.196
Inicio de síntomas – extracción; Media en días (DT)	7.91 (7.1)	4.93 (3.3)	4.57 (3.6)	0.002
Estancia hospitalaria; Media en días (DT)	5.7 (7.8)	16.9 (12.9)	18.4 (18.6)	0.000
Éxitus; N(%)	1 (2.9)	16 (36.4)	5 (71.4)	<0.001

Tabla 9. Características de los grupos COVID-19 en función de la gravedad: características demográficas básicas, datos clínicos en el momento del ingreso y pronóstico. Las celdas de distintos colores indican que esos valores difieren entre sí de forma significativa.

	Leve (n= 35)	Moderado/Grave (n=50)	p
Edad; Media en años (DT)	61.5 (19.3)	77.9 (13.4)	0.000
Hombre; N (%)	14 (40%)	22 (43.1%)	0.826
Mujer; N (%)	21 (60%)	29 (56.9%)	
Inicio de síntomas-ingreso; Media en días (DT)	8 (7.10)	4.86 (3.31)	0.051
Inicio de síntomas – extracción; Media en días (DT)	7.91 (7.12)	4.88 (3.34)	0.072
Estancia hospitalaria; Media en días (DT)	5.7 (7.8)	17.1 (13.6)	0.000

Tabla 10. Características de los grupos COVID-19 leve y moderado/grave: características demográficas básicas, datos clínicos en el momento del ingreso y pronóstico.

		Leve		Moderado		Grave		p
		N	%	N	%	N	%	
Comorbilidad (cualquiera)		20	57.1	42	95.5	7	100.0	<0.001
Comorbilidad	Obesidad (IMC ≥ 30 kg/m ²)	4	11.4	12	27.3	5	71.4	0.016
	Hipertensión arterial	12	34.3	29	65.9	5	71.4	0.012
	Diabetes mellitus	5	14.3	14	31.8	4	57.1	0.036
	Tabaquismo	0	0.0	3	4.5	0	0.0	0.227
	Cardiopatía crónica	1	2.9	12	27.3	2	28.6	0.013
	Enfermedad pulmonar crónica	1	2.9	5	11.4	3	42.9	0.007
	Asma	2	5.7	0	0.0	0	0.0	0.225
	Enfermedad renal crónica	3	8.6	5	11.4	2	28.6	0.320
	Enfermedad inflamatoria crónica	3	8.6	2	4.5	0	0.0	0.592
	Enfermedad neurológica crónica	1	2.9	11	25.0	1	14.3	0.024
	Demencia	3	8.6	15	34.1	3	42.9	0.049
	Neoplasia sólida activa	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0.478
	Neoplasia hematológica activa	1	2.9	1	2.3	0	0.0	0.900
	VIH/SIDA	0	0.0	1	2.3	0	0.0	0.617
	Otros	0	0.0	5	11.4	1	14.3	0.323
Tratamiento inmunosupresor (cualquiera)		4	11.4	3	4.5	0	0.0	0.369
Tratamiento inmunosupresor	Quimioterapia	2	5.7	0	0.0	0	0.0	0.225
	Corticoides sistémicos	1	2.9	2	4.5	0	0.0	0.802
	Terapias biológicas	32	91.4	44	100.0	7	100.0	0.104
Barthel<60		5	14.3	23	52.3	4	57.1	0.001
Ingreso en UCI		0	0.0	7	15.9	2	28.6	0.019

Tabla 11. Comorbilidad entre los diferentes grupos de infección por SARS-CoV-2. Las celdas de distintos colores indican que esos valores difieren entre sí de forma estadísticamente significativa.

		Leve		Moderado/Grave		p
		N	%	N	%	
Comorbilidad (cualquiera)		20	57.1	49	96.1	<0.001
Comorbilidad	Obesidad (IMC ≥ 30 kg/m ²)	4	11.4	14	27.5	0.003
	Hipertensión arterial	12	34.3	34	66.7	0.004
	Diabetes mellitus	5	14.3	8	15.7	0.076
	Tabaquismo	0	0.0	0	0.0	0.163
	Cardiopatía crónica	1	2.9	7	13.7	0.518
	Enfermedad pulmonar crónica	1	2.9	18	35.3	0.046
	Asma	2	5.7	12	23.5	0.012
	Enfermedad renal crónica	3	8.6	0	0.0	0.0407
	Enfermedad inflamatoria crónica	3	8.6	1	2.0	1.000
	Enfermedad neurológica crónica	1	2.9	0	0.0	
	Demencia	3	8.6	17	33.3	0.036
	Neoplasia sólida activa	1	2.9	2	3.9	0.393
	Neoplasia hematológica activa	1	2.9	18	35.3	0.006
	VIH/SIDA	0	0.0	2	4.0	0.509
	Otros	0	0.0	6	11.8	0.077
Tratamiento inmunosupresor (cualquiera)		4	11.4	2	3.9	0.219
Tratamiento inmunosupresor	Quimioterapia	2	5.7	0	0.0	0.163
	Corticoides sistémicos	1	2.9	2	3.9	1.000
	Terapias biológicas	32	91.4	0	0.0	0.064
Barthel<60		5	14.3	9	17.6	0.009
Ingreso en UCI		0	0.0	27	52.9	<0.001

5 *Tabla 12. Comorbilidad entre infección por SARS-CoV-2 leve y moderada/grave*

Poblaciones celulares

A) **Recuento linfocitario.** La linfopenia existente en el grupo de infección moderada/grave se refleja en una disminución marcada en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ (54.6 Vs 64.4) tanto en la subpoblación CD4⁺ (25.0 Vs 36.9) como CD8⁺ (3.0 Vs 5.8; p 0.001) (Figura 14).

Esta linfopenia se encuentra también como veremos más adelante en el grupo de pacientes que fallecían.

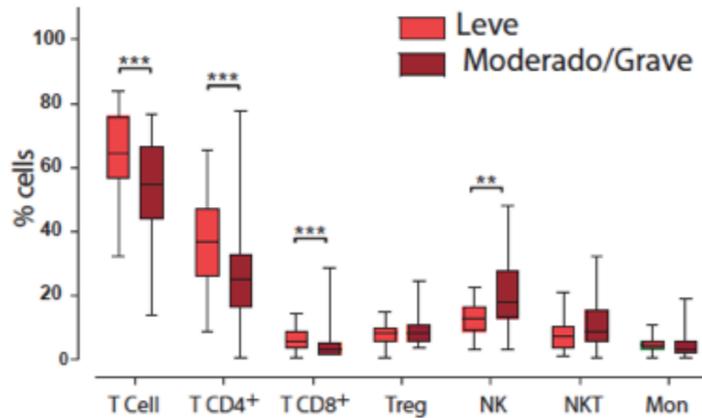


Figura 14: Frecuencia de poblaciones celulares en COVID-19 leve y moderado/grave. *p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001.

Los LTCD8⁺ activados que expresan TIM3 se hallan reducidos significativamente en el grupo de moderados/graves (8.6 Vs 26.9; p 0.002). Sin embargo, se observa un aumento significativo de la proporción de LTCD8⁺ exhaustos (GzmB^{low}) que expresan LAG3⁺, llegándose a duplicar los valores en comparación con el grupo de leves (11.3 Vs 5.9; p 0.002), al igual que ocurría en los pacientes que fallecían (Figura 15).

En el análisis clusterizado por FlowSOM, MT10, correspondiente a LTCD8⁺ exhaustos (GzmB^{low}), desciende de forma significativa en el grupo moderados/graves (Figura 16), resultados compartidos por la citometría convencional.

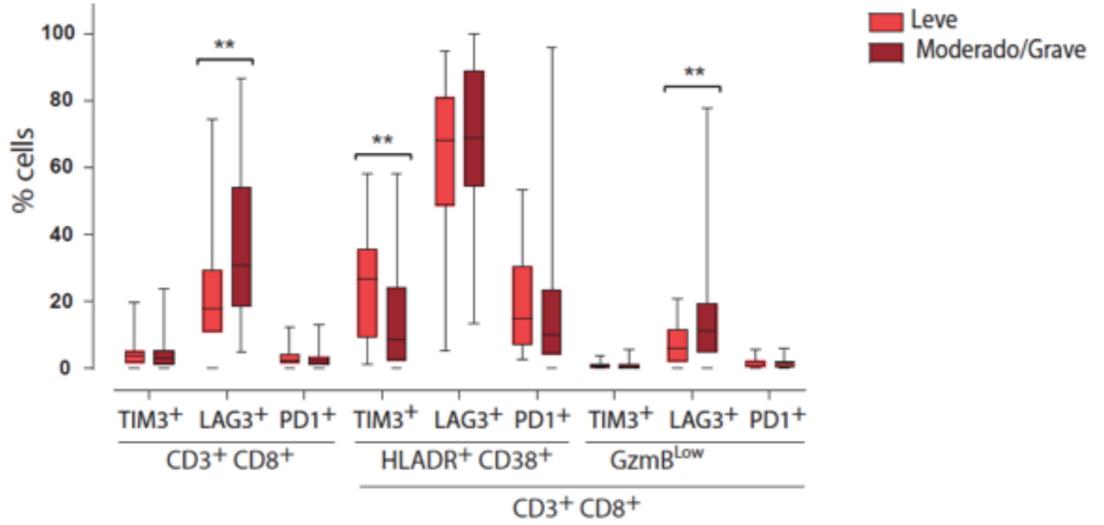


Figura 15: Frecuencia de expresión de puntos de control inhibitorio en LTCD8⁺ activados (HLA-DR⁺, CD38⁺GzmB^{High}) y exhaustos (GzmB^{low}) en COVID-19 leve y moderado/grave. *p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001

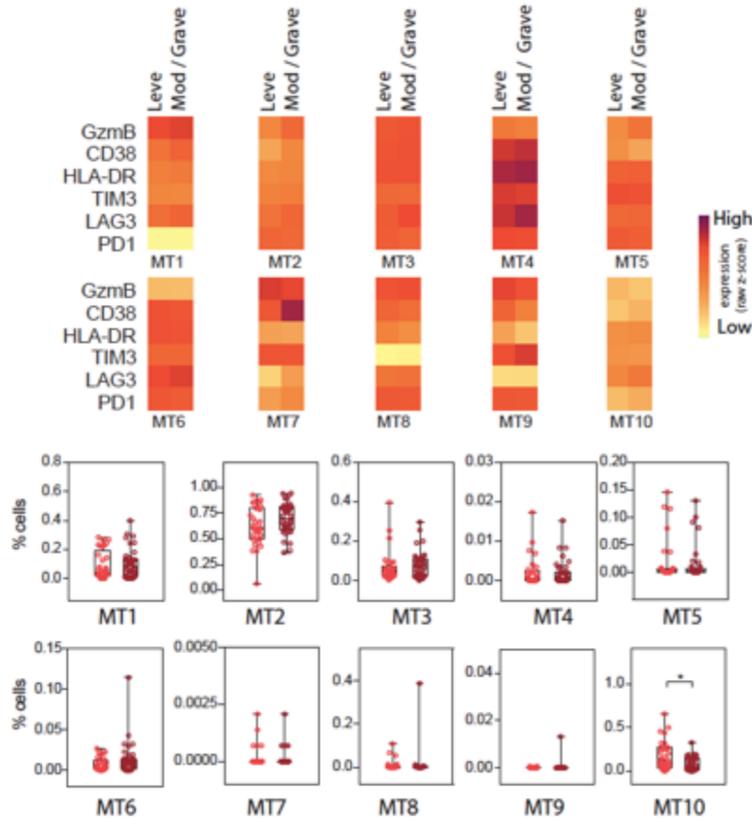


Figura 16: FlowSOM de LTCD8⁺ con expresión de marcadores de activación (HLA-DR⁺, CD38⁺, GzmB^{High}), agotamiento (GzmB^{Low}) y puntos de control inhibitorios en COVID-19 leve y moderado/grave. p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001

B) **Células NK.** Se observa un aumento significativo en los niveles de células NK en el grupo moderado/grave en comparación con el de leves, con unos valores de 17.9% y 12.7% respectivamente ($p < 0.001$) (Figura 14), similar al grupo de sujetos de mayor mortalidad.

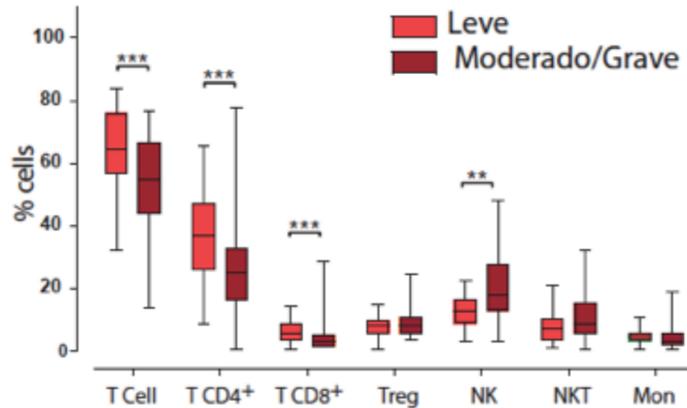


Figura 14: Frecuencia de poblaciones celulares entre COVID-19 leve y moderado/grave. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

No se detectan diferencias entre sus dos principales subpoblaciones $NK^{CD56Dim}$ (91.1 Vs 89.9; $p < 0.496$) y $NK^{CD56Bright}$ (8.9 Vs 10.1; $p < 0.496$); aunque al analizar detalladamente el perfil de receptores de activación e inhibición, se observa distinta presencia de células NK activadas, exhaustas y adaptativas. Los pacientes moderados/graves presentan un aumento significativo en el recuento de células $NK^{CD56Dim}$ que expresan el receptor de activación $NKG2C^+$ con unos valores de 32.3 frente a 18.8 en el grupo de los leves (0.001), mientras que descienden aquellas que expresan el receptor de inhibición $NKG2A^+$ (27.2 Vs 39.1; $p < 0.014$) y los receptores de activación $NKp30^+$ (63.6 Vs 74.6; $p < 0.022$) y $NKp46^+$ (87.4 Vs 95.7; $p < 0.017$). Ocurre de forma similar en la población $NK^{CD56Bright}$ (Figura 17 y 18). Al contrario, el receptor de activación $NKG2D^+$ no presenta ningún cambio.

Asimismo, se observa un aumento de la población de células NK altamente diferenciadas, caracterizada por la expresión de CD57⁺, tanto en la subpoblación NK^{CD56Dim} como NK^{CD56Bright}. También se encuentra un aumento significativo en el recuento relativo de células NK adaptativas (CD56^{Dim}, CD16⁺, NKG2A⁻, NKG2C⁺, CD57⁺) en el grupo moderado/grave en comparación con los leves, con unos valores de 26% y 11% respectivamente (Figura 17 y 18).

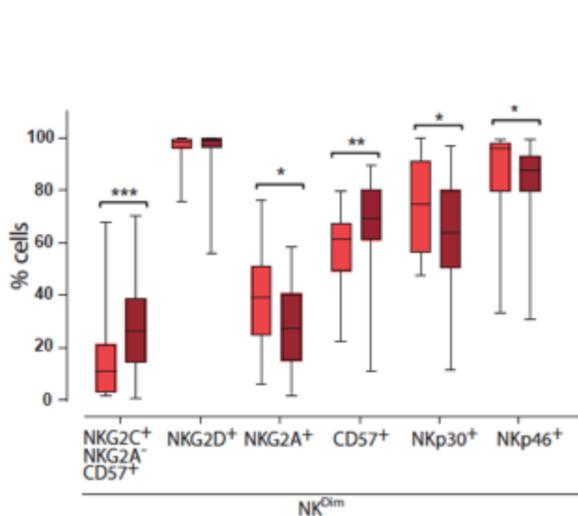


Figura 17: Frecuencia de expresión de marcadores de inhibición (NKG2A), activación (NKG2D, NKp30, NKp46) y de células NK adaptativas (NKG2A⁻, CD57⁺, NKG2C⁺) en NK^{CD56Dim} en COVID-19 leve y moderado/grave. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

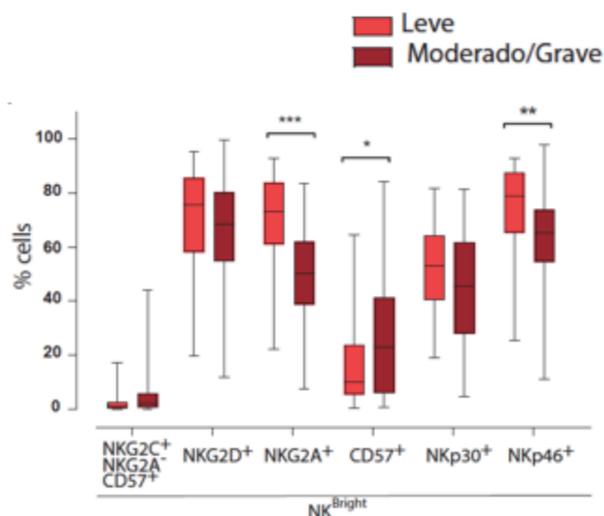


Figura 18: Frecuencia de expresión de marcadores de inhibición (NKG2A), activación (NKG2D, NKp30, NKp46) y de células NK adaptativas (NKG2A⁻, CD57⁺, NKG2C⁺) en NK^{CD56Bright} en COVID-19 leve y moderado/grave. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

En cuanto a las poblaciones de células NK^{CD56Dim} activadas o exhaustas en relación con los ICIs ([GzmB^{High}/PD1⁺, GzmB^{High}/LAG3⁺, GzmB^{High}/TIM3⁺], [GzmB^{low}/PD1⁺, GzmB^{low}/LAG3⁺, GzmB^{low}/TIM3⁺]), en el grupo de moderados/graves se observa un aumento significativo en las células NK activadas que expresan PD1⁺ (3.3 frente a 1.8, p 0.034) o LAG3⁺ (18.0 frente a 3.6; p 0000) y en las células NK exhaustas que expresan LAG3⁺ con unos valores de 27.9 en comparación con 10.2. El porcentaje de células NK exhaustas que expresan LAG3⁺ (27.9 %) es superior al de sus homólogas activadas (18%). (Figura 19).

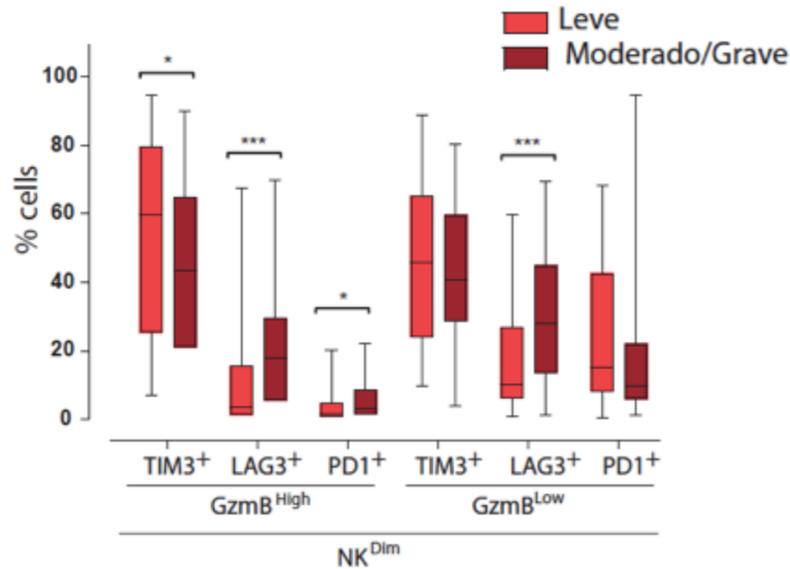


Figura 19: Frecuencia de expresión de puntos de control inhibitorios en células $NK^{CD56Dim}$ activadas ($Gzmb^{High}$) o exhaustas ($Gzmb^{Low}$) en COVID-19 leve y moderado/grave. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

El análisis de los patrones de activación e inhibición de células NK muestra un descenso significativo en MT1 y MT7 correspondiente a células $NK^{CD56Dim}$ que expresan ($CD16^+$, $NKp30^+$, $NKp46^+$, $NKG2A^+$) o no ($CD16^+$, $NKp30^+$, $NKp46^+$, $NKG2D^+$, $NKG2A^-$) el receptor de inhibición $NKG2A$ en el grupo de mayor gravedad de la infección, mientras que MT6 está aumentado (células $NK^{CD56Dim}$ activadas). MT2, correspondiente a células NK adaptativas ($CD16^+$, $CD57^+$, $NKG2C^+$, $NKG2A^-$) también se encuentra aumentado en el grupo de moderados/graves aunque no alcanza la significación estadística (Figura 20). En el panel de ICIs de células NK (Figura 21), los clústeres MT5 ($NK^{CD56Dim}$, $CD16^+$, $Gzmb^{Low}$, $TIM3^+$, $LAG3^+$) y MT10 (células NKT) están aumentados, y MT3 ($NK^{CD56Dim}$ $CD16^+$, $Gzmb^{High}$, $TIM3^+$) y MT9 (células NKT), descendidos en el grupo de infección moderada/grave en comparación con la forma leve de presentación. La expresión de $LAG3$ se encuentra también incrementada en los pacientes de mayor severidad en la mayor parte de MTs (5, 6 y 7).

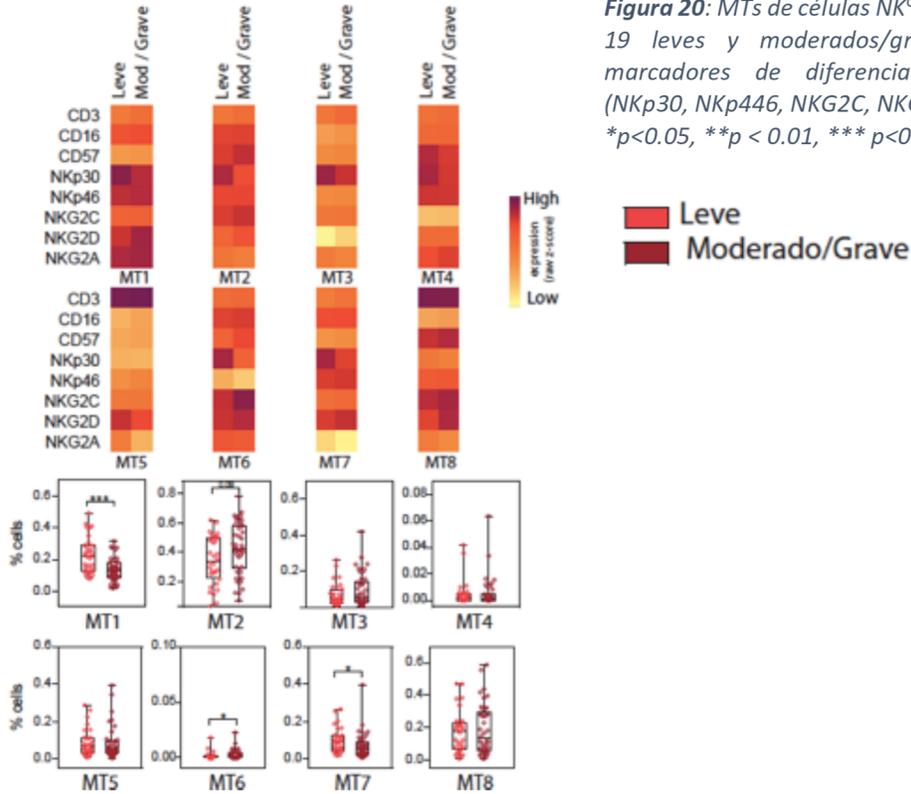


Figura 20: MTs de células NK^{CD56Dim} en pacientes COVID-19 leves y moderados/graves con expresión de marcadores de diferenciación (CD57), activación (NKp30, NKp446, NKG2C, NKG2D) e inhibición (NKG2A). *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001

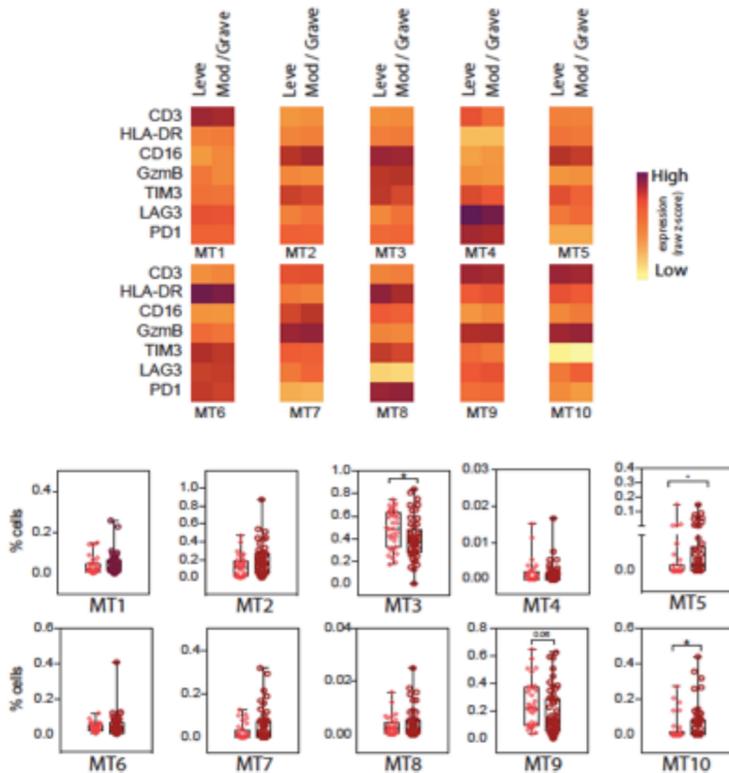


Figura 21: MTs de células NK^{CD56Dim} en pacientes COVID-19 leve y moderados/graves con expresión de marcadores de activación (HLA-DR, GzmB^{High}), agotamiento (GzmB^{Low}) y puntos de control inhibitorios (TIM3, LAG3, PD1). *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001

C) **Monocitos:** El recuento global de monocitos no varía al comparar ambos grupos (Figura 14). Los pacientes COVID-19 moderados/graves presentan una disminución

significativa en el recuento de iMon con un valor de 5.2% en comparación con 7.5% en el grupo de los leves (p 0.032) (Figura

22), sin encontrar cambios en los recuentos de cMon o ncMon.

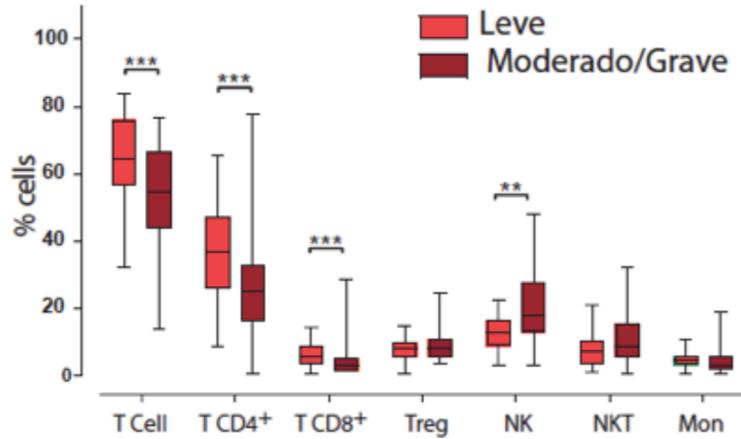


Figura 14: Frecuencias de poblaciones celulares entre COVID-19 leve y moderado/grave. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Al analizar los ICIs, también de forma significativa disminuyen en el grupo de mayor gravedad los cMon que expresan TIM3⁺ (86.6 Vs 93.0; p 0.015) y LAG3⁺ (17.5 Vs 27.1; p 0.035) y los iMon TIM3⁺ (92.8 Vs 96.3; p 0.028) (Figura 22). Estos resultados se repetían nuevamente en el grupo de pacientes que fallecían.

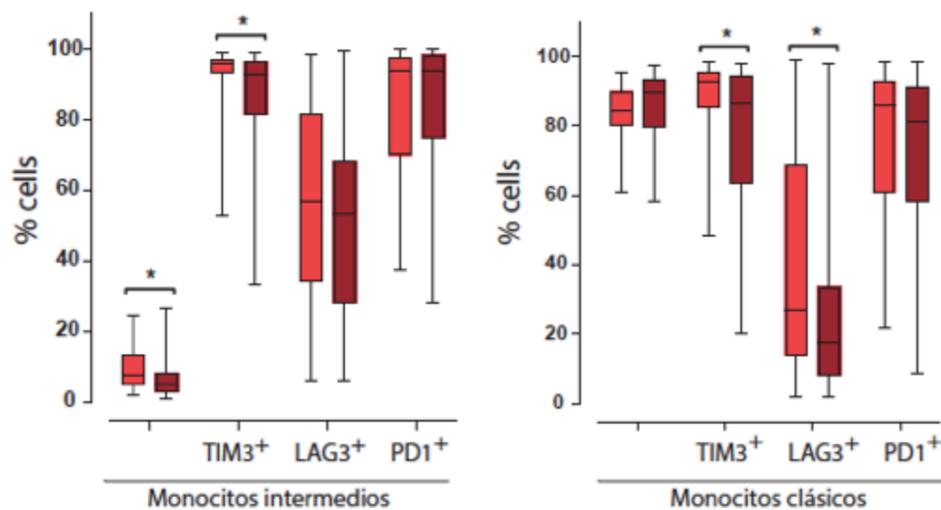


Figura 22: Frecuencia de expresión de puntos de control inhibitorio en monocitos intermedios y monocitos clásicos en COVID-19 leve y moderado/grave. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

En la representación FlowSOM, MT2 correspondiente a ncMon con expresión de todos los ICIs, estaba disminuido en los casos más graves (Figura 23).

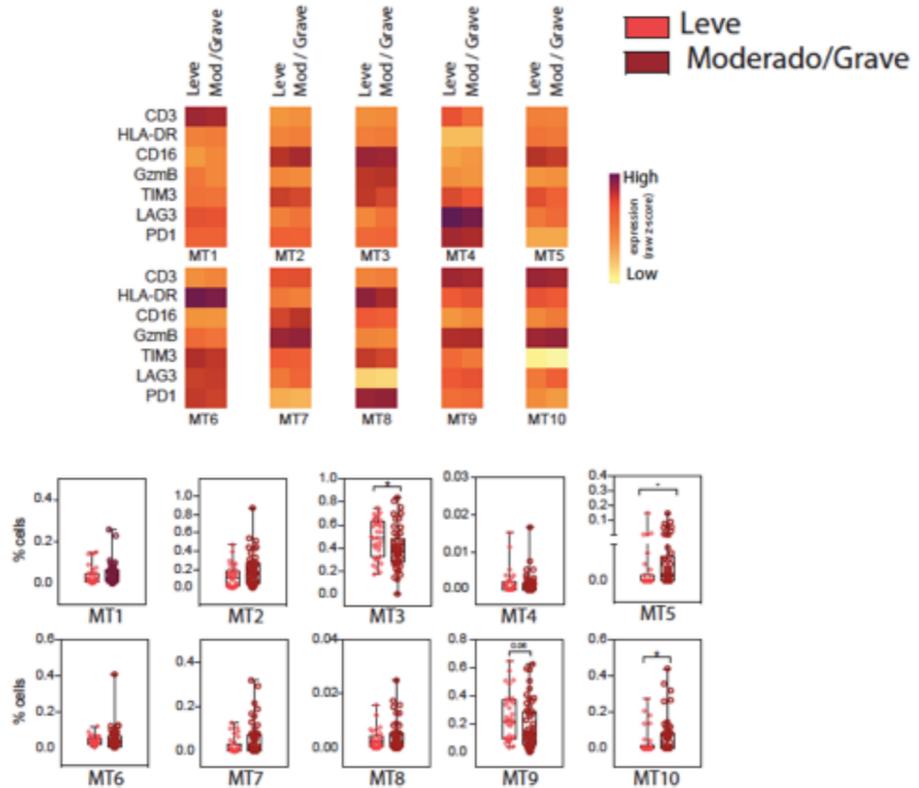


Figura 23: MTs de monocitos en COVID-19 leve y moderado/grave. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Citoquinas y otros inmunomoduladores solubles

En el grupo de pacientes con COVID-19 moderado/grave, se aprecia una llamativa elevación de los ligandos solubles de NKG2D: MICA (87.3 Vs 46.0; $p < 0.001$) y ULBP 1/2-5-6/3 ([2 Vs 0.4; $p < 0.025$] / [12.7 Vs 0.0; $p < 0.002$] / [38.7 Vs 14.8; $p < 0.041$]) (Figura 24).

También se encuentran elevaciones marcadas de la citoquina $TNF\alpha$ con un valor de 7.3 en la categoría de moderados/graves frente a 4.7 en el grupo de menor gravedad. Ocurre de forma similar al analizar IL2 (1.6 Vs 0.8; $p < 0.009$) e IL1RA (4.5×10^3 Vs

2.3x10³; p 0.012). Estos marcadores eran más elevados de forma específica en el grupo de COVID19 en comparación con no-COV-ITR o ID. La molécula INF-λ2 muestra niveles significativamente más bajos en el grupo de moderados/graves, con un recuento relativo de 0.0 frente a 26.8 en el grupo de leves (p 0.015) (Tabla 13).

Las quimioquinas CXCL8, CXCL10, CCL2 y CXCL9 están incrementadas significativamente en el grupo de pacientes con infección moderada/grave. Los valores recogidos en este grupo de mayor gravedad son de 10.4, 617.3, 323.8 y 73.7 respectivamente, en comparación con 6.2, 236.4, 206.5 y 49.6 en el grupo COVID-19 leve. Entre estos marcadores, CXCL10, CCL2, CXCL9 en conjunto con CCL8 se elevan de forma específica en la infección por SARS-CoV-2 al comparar con no-COV-ITR o ID (Figura 24).

Respecto a los miembros de la familia del TNF, se observan niveles significativamente más bajos de TRAIL con un valor de 32.7 en el grupo de moderados/graves frente a 46.3 en el de los leves (p 0.026); y de FasL, con un recuento de 16.5 frente a 24.3 (p 0.001) (Tabla 13).

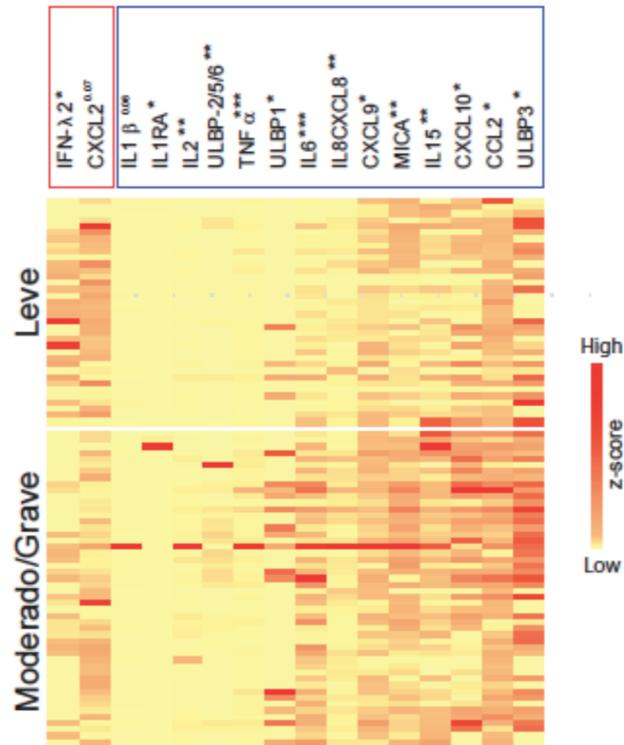


Figura 24: Frecuencia de citoquinas en COVID-19 leve y moderado/grave. *p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001, indicado en la parte superior de la imagen al lado de cada citoquina.

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

	COVID19 leve			COVID-19 moderado/grave			p
	mediana	Q1	Q3	mediana	Q1	Q3	
MICA	46,0	14,3	80,4	87,3	40,8	187,6	0,001
MICB	67,4	34,8	109,7	88,9	48,8	113,8	0,102
ULBP1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,025
ULBP-2/5/6	0,0	0,0	0,0	12,7	0,0	112,6	0,002
ULBP3	14,8	0,0	40,2	38,7	8,9	73,7	0,041
IL12	0,0	0,0	39,6	0,0	0,0	75,2	0,145
IL25	0,0	0,0	24,8	0,0	0,0	77,8	0,082
IL2	0,8	0,0	1,6	1,6	0,1	3,2	0,009
IL15	2,2	0,2	3,8	5,9	2,5	9,2	0,002
IL6	5,6	2,3	15,3	32,4	12,5	76,3	0,000
IL1 B	0,0	0,0	0,4	0,1	0,0	1,5	0,061
IL18	478,4	298,9	770,3	594,1	393,5	824,5	0,166
IL1RA	2,3x10 ⁴	1,6x10 ³	4,4x10 ³	4,5x10 ³	2,4x10 ³	1,0x10 ⁴	0,012
IL36 B	2,2	0,5	5,5	4,4	1,6	5,8	0,082
IL33	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	1,4	0,110
IL31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,234
IL7	3,3	1,3	6,1	2,6	1,5	5,0	0,912
IL10	0,0	0,0	5,0	2,7	0,0	6,2	0,063
IL8/CXCL8	6,2	1,2	10,8	10,4	5,4	14,7	0,006
CXCL10	236,4	34,4	629,7	617,3	92,6	1503,8	0,023
CCL2	206,5	149,5	298,3	323,8	155,2	472,3	0,025
CXCL2	464,5	160,5	857,2	215,1	99,6	530,4	0,072
CXCL9	362,0	241,6	680,5	734,4	363,0	1058,1	0,014
CCL8	65,0	31,0	164,2	103,2	50,2	170,6	0,141
IFN-λ3	15,9	0,0	48,9	23,8	0,0	53,2	0,476
IFN-λ2	26,8	0,0	70,4	0,0	0,0	26,8	0,015
IFNα	0,8	0,0	10,0	3,3	0,1	9,2	0,153
IFNγ	2,1	0,0	7,5	1,6	0,0	13,6	0,522
IFNβ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,294
FAS L	24,3	16,8	29,4	16,5	10,1	23,3	0,001
TNFα	4,7	2,3	7,2	7,3	5,1	11,9	0,000
TRAIL	46,3	19,3	121,3	32,7	14,3	45,7	0,026
[GRANZIMA A]	43,8	25,8	53,6	38,9	24,7	50,7	0,683
Actividad GzmA	478,0	245,4	1309,1	1012,8	392,7	2874,5	0,011
[GRANZIMA B]	11,5	5,2	22,0	16,4	10,3	21,0	0,249
Actividad GzmB	87,3	35,5	137,7	49,9	19,1	114,3	0,261
Fibronectina	1,3x10 ⁸	7,7x10 ⁷	1,9x10 ⁸	1,7x10 ⁸	9,2x10 ⁷	2,9x10 ⁸	0,198

Tabla 13. Valores de los ligandos solubles en COVID-19 leve y moderado/grave. N.s: no significativo.

Finalmente, respecto a las Gzms, los pacientes de mayor gravedad presentan un nivel significativamente más alto de la actividad de GzmA con unos valores de 1012.8 pM/min en comparación con 478.0 pM/min ($p = 0.011$) (Figura 25). No se observan diferencias en la actividad de GzmB, concentración de GzmA y B, fibronectina, anti-trombina III y α -2 macroglobulina (Tabla 13).

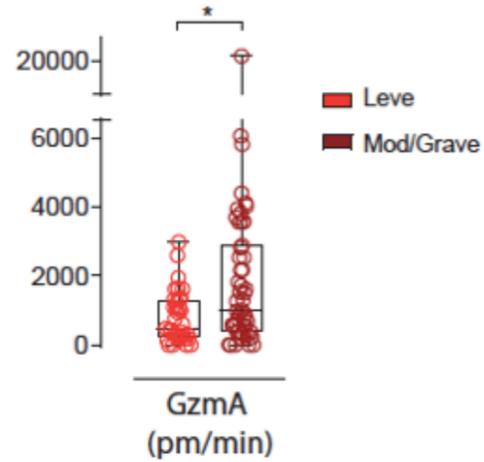


Figura 25: Concentración de GzmA en COVID-19 leve y moderado/Grave. 0.01, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

5.3.2 Con la mortalidad

De 67 pacientes que precisaron ingreso hospitalario, se produce el fallecimiento en 22 (32.8%). No se han observado diferencias con los supervivientes en cuanto al sexo o los días entre la FIS y la fecha de ingreso o extracción de la muestra. La media de edad del grupo de mortalidad es de 83.7, mientras que en el grupo que sobrevive es de 66.9. La estancia hospitalaria también es significativamente superior en este grupo (17 días en comparación con 10 días en el grupo de supervivencia) (Tabla 14).

	Éxito (n=22)	No éxito (n=45)	ρ
Edad; Media en años (DT)	83.7	66.9	0.000
Hombre; N (%)	11 (50)	25 (39.1)	0.455
Mujer; N (%)	11 (50)	39 (60.9)	
Inicio de síntomas-ingreso; Media en días (DT)	4.64 (4.23)	6.66 (5.67)	0.095
Inicio de síntomas – extracción; Media en días (DT)	4.64 (4.24)	6.63 (5.68)	0.1000
Estancia hospitalaria; Media en días (DT)	17.3	10.7 (11.6)	0.028

Tabla 14. Características demográficas de los grupos de supervivencia y mortalidad.

Poblaciones celulares

A) **Linfocitos:** Al igual que ocurría en los pacientes moderados/graves en el momento del ingreso, en los pacientes que fallecieron se observa una marcada linfopenia, a expensas de las poblaciones T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, con unos recuentos relativos correspondientes de 50.8, 19.4 y 1.8 en el grupo de mortalidad, en comparación con 62.7, 31.4 y 5.0 en el grupo que sobreviven (p 0.001; 0.002 y 0.002 respectivamente) (Figura 26).

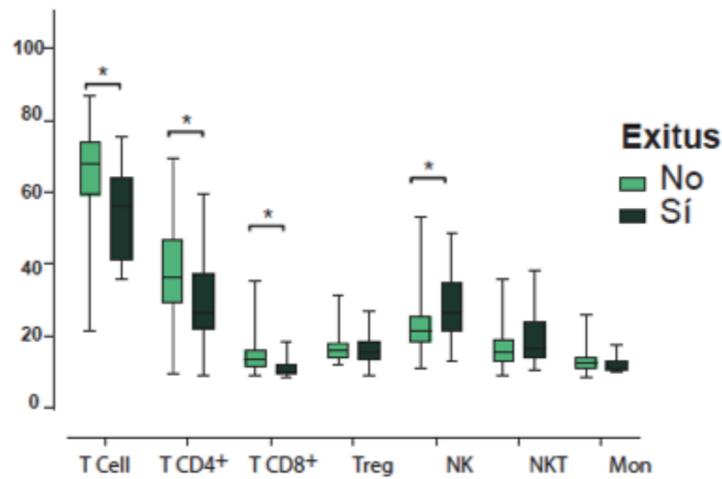


Figura 26: Frecuencia de poblaciones celulares en pacientes con COVID-19 en relación con la mortalidad. *p<0.05, **p < 0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Al igual que ocurría también en el grupo de pacientes con infección por SARS-CoV-2 moderada/grave, los pacientes que fallecieron presentan un mayor recuento de linfocitos TCD8⁺ exhaustos (GzmB^{low}) que expresan la molécula de inhibición LAG3⁺ (13.4 Vs 7.1, p 0.020) en comparación con los que sobreviven. Esto ocurre a pesar de que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ activados que expresaban GzmB y LAG3⁺ no varía entre pacientes que mueren o sobreviven (81.2 Vs 67.8; p 0.1000) lo cual indica el aumento relativo de la población de linfocitos T CD8⁺ exhaustos sobre la de activados en el grupo de sujetos que fallecen (Figura 27).

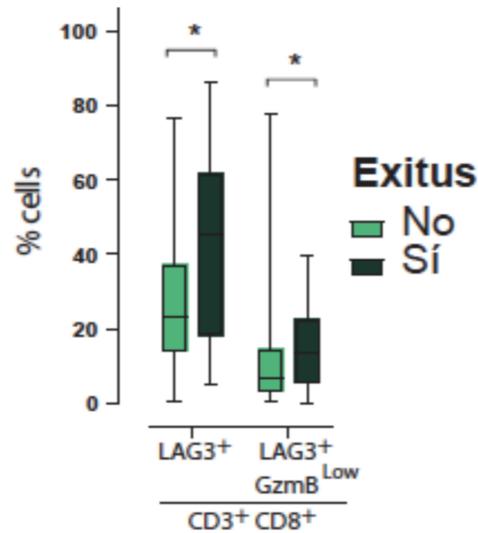


Figura 27: Frecuencia de expresión del punto de control inhibitorio LAG3 en L^TCD8⁺ totales (LAG3) y exhaustos (LAG3 GzmB^{low}) en COVID-19 en relación con la mortalidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

B) **Células NK:** Además, en los pacientes fallecidos el porcentaje de células NK es significativamente mayor (19.2 Vs 13.7; $p < 0.010$) (Figura 26), si bien no se observan

diferencias entre las dos subpoblaciones principales NK^{CD56Dim} y NK^{CD56Bright}. Tampoco se detectan

diferencias en la expresión de receptores de

activación o inhibición, ni en la presencia de células NK adaptativas o subpoblaciones de células NK exhaustas o activadas en los pacientes que fallecen en comparación con los que sobreviven.

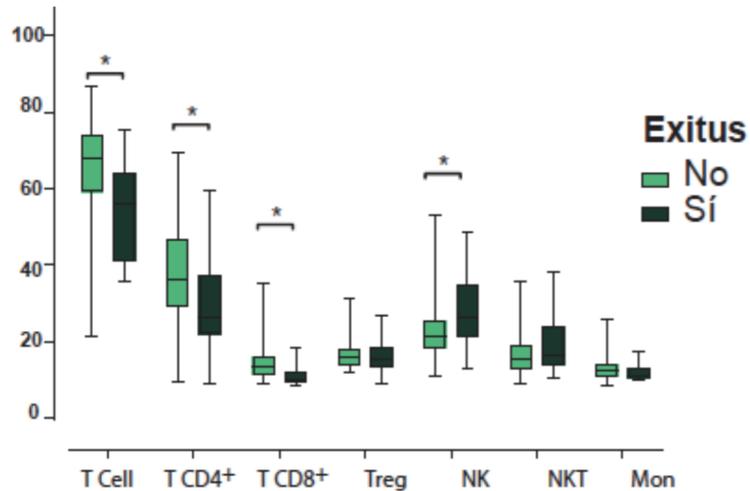


Figura 26: Frecuencia de poblaciones celulares en pacientes con COVID-19 en relación con la mortalidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

C) **Monocitos:** No se hallan diferencias en las poblaciones monocitarias (Figura 26) ni en ninguna de sus subpoblaciones clásicos, intermedios y no clásicos.

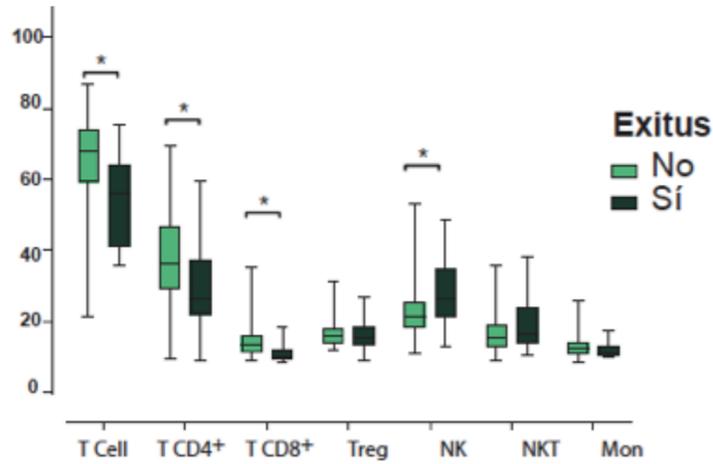


Figura 26: Frecuencia de poblaciones celulares en pacientes con COVID-19 en relación con la mortalidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

En cambio, sí que se observa un valor significativamente menor de los subtipos cMon e iMon que expresan el punto de control inhibitorio TIM3⁺, de forma similar a lo que ocurría en los pacientes que presentaban mayor gravedad de la infección, con unos valores de 76.1 y 87.3 en el grupo de los que fallecen en comparación con 91.8 y 95.5 de los supervivientes ($p = 0.004$ y 0.017) (Figura 28).

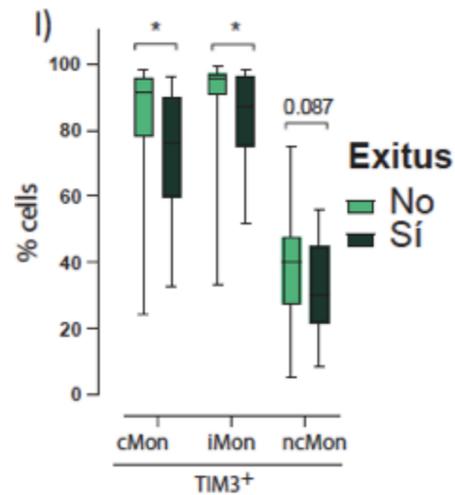


Figura 28: Frecuencia de expresión del punto de control inhibitorio TIM3 en monocitos clásicos (cMon), intermedios (iMon) y no clásicos (ncMon) en pacientes COVID-19 en relación con la mortalidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Citoquinas y otros inmunomoduladores solubles

La mayor parte de las citoquinas y quimioquinas estudiadas se encuentran elevadas en el grupo de pacientes que fallecen. Al igual que ocurría en el grupo de mayor gravedad de la infección, los ligandos solubles de NKG2D, MICA (106.9 Vs 54.1; p 0.024), ULBP-3 (59.1 Vs 20.5; p 0.032) y 2/5/6 (66.1 Vs 0.0; p 0.001) están más elevados (Tabla 15) Los pacientes fallecidos (Figura 29) presentan a su ingreso niveles significativamente más altos de TNF α (9.7 Vs 5.5; p 0.018), IL2 (2.4 Vs 0.8; p 0.001), IL10 (5.2 Vs 0.0; p 0.004), IL15 (5.8 Vs 2.9; p 0.05) e IL6 (57 Vs 12.1), y de los miembros de la familia de IL1, IL1RA (8.6x10³ Vs 2.8x10³; p 0.001) e IL33 (0.4 Vs 0.0; p 0.026) (Tabla 15).

Las quimioquinas CXCL10 y CXCL9 están aumentadas en los pacientes que fallecen, con unos valores de 1325 y 831.8 frente a 247.3 y 557.7 del grupo de supervivencia respectivamente (p < 0.05) y al igual que ocurría en el grupo de mayor gravedad. En concreto, CXCL10 además diferenciaba de forma específica no-COV-ITR e ID de la infección por SARS-CoV-2 confirmada (Tabla 15).

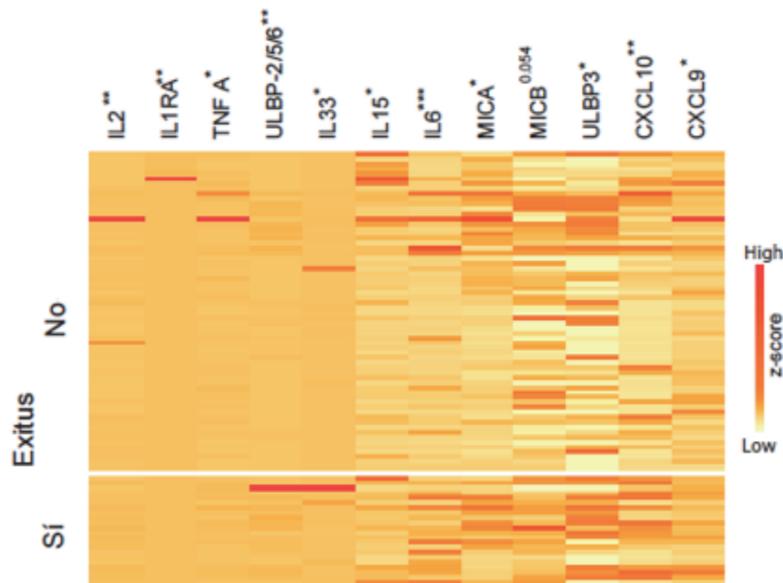


Figura 29: Frecuencia de citoquinas y quimioquinas en COVID-19 en relación con la mortalidad. *p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001, representados en la parte superior de la imagen, al lado de cada citoquina.

A pesar de que no se observaron diferencias en las concentraciones de GzmA y B, la actividad de la primera está aumentada de forma significativa, con un valor de 1309.2 pM/min en el grupo de mortalidad en comparación con 673.1 del grupo de supervivencia (p 0.042), al igual que ocurría en el grupo de infección moderada/grave (Figura 30).

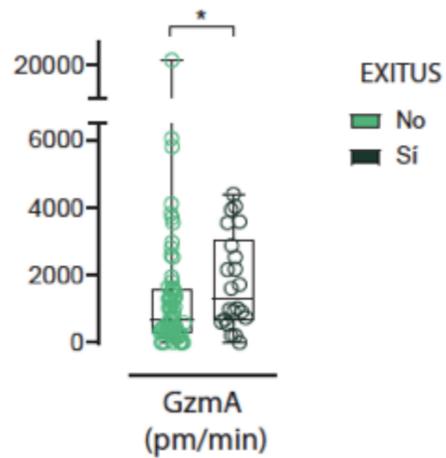


Figura 30: Actividad de GzmA en pacientes COVID-19 en relación con la mortalidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

	Éxito						
	Sí			No			p
	mediana	Q1	Q3	mediana	Q1	Q3	
MICA	106,9	51,2	187,6	54,1	20,3	135,1	0,024
MICB	91,9	73,2	118,0	70,2	33,9	106,6	0,054
ULBP1	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,336
ULBP-2/5/6	66,1	0,0	121,1	0,0	0,0	17,8	0,001
ULBP3	59,1	20,0	74,9	20,5	0,0	50,3	0,032
IL12	16,4	0,0	112,4	0,0	0,0	55,0	0,220
IL25	0,0	0,0	49,2	0,0	0,0	44,5	0,459
IL2	2,4	1,0	4,2	0,8	0,0	2,3	0,001
IL15	5,8	3,1	9,2	2,9	0,8	6,8	0,053
IL6	57,0	22,5	86,0	12,1	4,1	28,0	0,000
IL1 B	0,3	0,0	1,5	0,0	0,0	0,8	0,335
IL18	588,7	410,7	824,5	523,0	335,4	798,4	0,566
IL1RA	8,6x10 ³	5,6x10 ³	1,4x10 ⁴	2,8x10 ³	1,7x10 ³	5,0x10 ³	0,001
IL36 B	4,5	2,3	6,7	3,1	0,7	5,5	0,150
IL33	0,4	0,0	1,8	0,0	0,0	0,6	0,026
IL31	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,034
IL7	2,0	1,2	4,6	3,4	1,5	5,7	0,455
IL10	5,2	2,0	9,8	0,0	0,0	4,7	0,004
CXCL8	10,1	5,4	15,3	7,2	3,4	12,1	0,198
CXCL10	1325,2	300,0	2227,7	247,3	40,9	805,9	0,002
CCL2	275,6	114,2	472,3	243,6	159,0	378,2	0,843
CXCL2	170,7	93,3	285,6	441,6	139,7	797,4	0,018
CXCL9	831,8	363,0	1238,6	557,7	276,2	772,8	0,034
CCL8	83,8	51,2	153,0	81,2	31,7	172,9	0,607
IFN-λ3	33,1	0,0	53,2	15,9	0,0	48,9	0,701
IFN-λ2	0,0	0,0	39,4	0,0	0,0	43,0	0,661
IFNα	2,8	0,1	4,7	1,6	0,0	9,6	0,665
IFNγ	4,4	0,0	15,8	1,4	0,0	8,2	0,143
IFNβ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,754
FAS L	14,1	9,6	24,9	18,7	13,3	26,5	0,143
TNFα	9,7	5,1	12,7	5,5	3,8	8,1	0,018
TRAIL	32,8	14,3	38,5	42,8	17,4	75,4	0,078
[GRANZIMA A]	21,0	17,9	50,9	45,0	29,2	51,5	0,223
Actividad GzmA	1309,2	687,8	2874,5	673,1	294,4	1575,6	0,042
[GRANZIMA B]	17,7	10,5	20,3	12,7	6,1	22,1	0,231
Actividad GzmB	47,4	21,4	229,5	64,6	26,0	115,8	0,890
Fibronectina	1,8x10 ⁸	7x10 ⁷	3,3x10 ⁸	1,5x10 ⁸	8,7x10 ⁷	2,0x10 ⁸	0,514

Tabla 15. Valores de los ligandos solubles en los grupos de mortalidad y supervivencia.

5.4 Correlación entre actividad de granzimas e inflamación

En el grupo de COVID-19 se observa una correlación significativa positiva entre actividad de GzmA y las citoquinas IL2, IL6, IL33, IL31 y la quimioquina CXCL8 (Figura 31), mostrando un adecuado paralelismo en su expresión sin determinar puntos umbrales de gravedad o mortalidad. La actividad de GzmB se correlacia positivamente con IL2, IL6, ULBP3 y CXCL9.

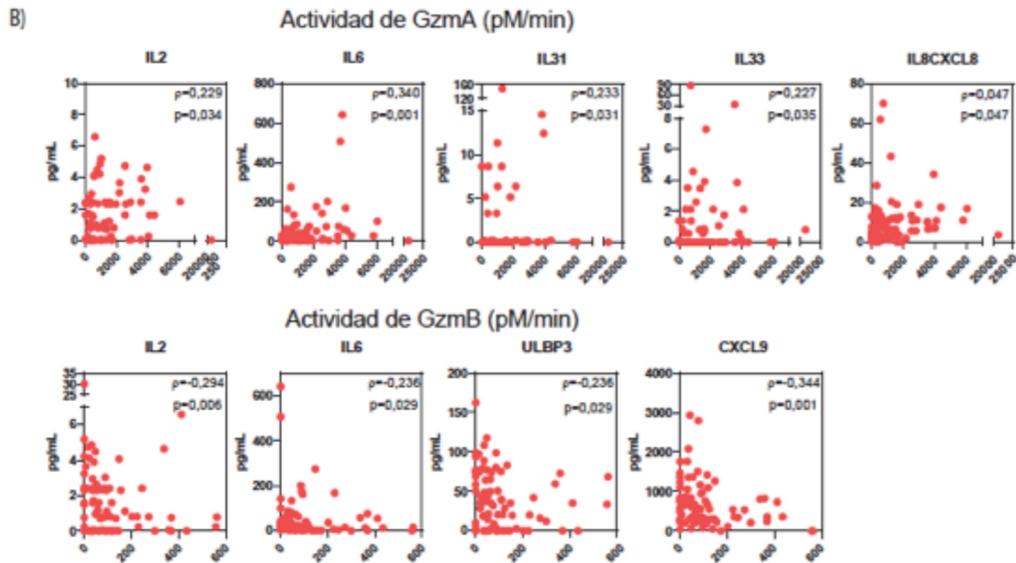


Figura 31: Correlación entre actividad de GzmA y GzmB y citoquinas.

5.5 Descripción de marcadores analíticos inflamatorios (ferritina, procalcitonina y proteína C reactiva) y de coagulación (INR, APTT, Dímero D) y su correlación con inmunomoduladores solubles

La ferritina alcanza unos niveles medios de 509 en pacientes moderados/graves, lo cual la diferencia estadísticamente del grupo de los leves (258) (p 0.017). Las variables PCR y DD también pueden discernir entre ambos grupos con significación estadística (Tabla 16). Los niveles elevados de ferritina también predicen el empeoramiento a los 7 días, mientras que niveles medios de PCR de 128.2 disciernen de forma significativa al grupo de pacientes que fallecen.

Marcador	COVID-19 leve			COVID-19 moderado/grave			p
	Mediana	Q 1	Q 3	Mediana	Q 1	Q 3	
Ferritina (μ/L)	258.0	130.0	915.0	509.0	310.0	1111.0	0.017
PCR (mg/L)	22.1	5.9	53.5	89.3	50.3	163.2	< 0.001
DD (ng FEU/ml)	661.0	431.0	1030.0	1342.0	636.0	3185.0	0.010
	No empeoramiento al 7º día			Empeoramiento al 7º día			p
Ferritina (μ/L)	310.0	220.0	806.0	1753.0	731.0	2924.0	
	Supervivencia			Muerte			p
PCR (mg/L)	49.8	11.6	88.1	128.2	44.3	179.3	

Tabla 16. Valores de marcadores analíticos entre los diferentes grupos de gravedad. Empeoramiento se define por un aumento en los parámetros de la escala respiratoria (Anexo 1). Q1: Primer cuartil, Q3: Tercer cuartil

Al analizar las curvas de correlación entre los marcadores solubles y los reactantes inflamatorios analíticos y de coagulación, se encuentra una relación fuertemente positiva entre PCR y CXCL9, IL6 y ULBP-2/5/6. La PCT también muestra una correlación positiva con CXCL10, CXCL9, TNF α , IL6 y CXCL8. Los valores elevados de DD se relacionan también con valores elevados de CXCL10, IL6 y ULBP-2/5/6. La actividad de Gzm A se relaciona positivamente también con la elevación del DD. (Tabla 17).

	Ferritina		PCT		PCR		INR		APTT		DD	
	Coef. Rho	p										
GzmA	0.007	0.959	-0.036	0.830	0.129	0.241	-0.218	0.046	-0.223	0.043	0.008	0.951
GzmB	0.146	0.305	0.364	0.025	0.185	0.092	0.040	0.715	-0.026	0.813	0.042	0.759
Act. GzmA	0.263	0.062	0.210	0.206	0.109	0.326	0.174	0.114	-0.175	0.114	0.287	0.031
Act. GzmB	-0.286	0.042	-0.073	0.665	-0.353	0.001	-0.101	0.360	0.164	0.139	-0.032	0.813
CXCL10	0.092	0.522	0.592	0.000	0.330	0.002	0.126	0.253	-0.134	0.229	0.407	0.002
CXCL9	0.324	0.021	0.515	0.001	0.525	0.000	0.222	0.043	-0.174	0.115	0.355	0.007
TNF A	0.388	0.005	0.535	0.001	0.490	0.000	0.223	0.042	-0.085	0.445	0.361	0.006
IL6	0.408	0.003	0.505	0.001	0.668	0.000	0.451	0.000	-0.046	0.677	0.429	0.001
CXCL8	0.270	0.055	0.423	0.008	0.260	0.017	0.223	0.042	0.044	0.694	-0.094	0.488
IL18	0.268	0.057	0.331	0.043	0.287	0.008	0.067	0.547	-0.087	0.437	-0.106	0.431
ULBP-2/5/6	0.285	0.043	0.314	0.055	0.415	0.000	0.056	0.613	-0.087	0.434	0.445	0.001
MICA	0.142	0.321	0.116	0.488	0.289	0.008	0.260	0.017	-0.184	0.097	0.352	0.007
MICB	0.295	0.035	0.253	0.126	0.243	0.026	0.244	0.025	0.017	0.876	0.052	0.703

Tabla 17. Correlación entre marcadores analíticos y principales citoquinas.

5.6 Análisis multivariante de marcadores predictivos del diagnóstico de la infección, evolución y mortalidad

A través del análisis multivariante de regresión logística se investigó si determinados patrones constituidos por factores solubles (grupo 1) o poblaciones celulares (grupo 2) específicos podían predecir el diagnóstico de la infección (COVID-19, HDs, no-COV-ITR) y la evolución clínica (gravedad al ingreso, empeoramiento a los 7 días, muerte), seleccionados tal y como se especifica en el apartado métodos (análisis estadístico). Los resultados de los análisis, incluyendo la odds ratio y los intervalos de confianza se muestran en la tabla 18 y las figuras 32 y 33.

Al comparar infección por SARS-CoV-2 con HDs o no-COV-ITR, cuatro patrones de variables podían clasificar con una elevada precisión a los pacientes. Frente a HDs, dentro del grupo 1 IL15, CXCL9, concentración de GzmA y actividad de GzmB categorizaron con una precisión del 97% el diagnóstico de COVID-19. En el grupo 2, las cuatro variables cMon TIM3⁺, ncMon TIM3⁺, Linfocitos Treg y LTCD8⁺ activados clasificaron correctamente al 94.7% de los pacientes con infección confirmada. La presencia elevada de una única variable del grupo 1 (CXCL10) o el patrón constituido por cuatro variables del grupo 2 (ncMon PD1⁺, células NK exhaustas LAG3⁺, células Treg,

COVID 19 vs HDs		OR (95% CI)	p	AUC
Grupo 1 97,0%	IL15	1,42 (1,05-1,94)	0,024	0,996 (0,99-1,00); p<0,001
	CXCL9	1,02 (1,00-1,04)	0,019	
	GzmA	1,26 (1,07-1,048)	0,005	
	Actlvidad de GzmB (pM/min)	1,04 (1,00-1,07)	0,025	
Grupo 2 94,7%	nMon TIM3 ⁺	0,819 (0,722-0,929)	0,002	0,990 (0,98-1,00); p<0,001
	cMon TIM3 ⁺	1,137 (1,035-1,249)	0,007	
	T ^{reg}	1,695 (1,073-2,675)	0,024	
	LTCD8+ activados (CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ GzmB ^{High})	9,807 (2,426-39,648)	0,001	
COVID 19 vs no-COV-ITR		OR (95% CI)	p	AUC
Grupo 1 76,1%	CXCL10	1,002 (1,001-1,004)	0,006	0,70 (0,60-0,79); p=0,002
Grupo 2 79,6%	nMon PD1 ⁺	1,042 (1,016-1,069)	0,002	0,787 (0,690-0,885); p<0,001
	NK ^{Dim} exhaustas (GzmB ^{Low} LAG3 ⁺)	1,054 (1,015-1,094)	0,006	
	T ^{reg}	0,885 (0,780-1,004)	0,057	
	NK ^{Dim}	1,088 (1,023-1,156)	0,007	

Tabla 18. Análisis multivariante con selección de variables (marcadores solubles o poblaciones linfocitarias) que diferencian grupos de diagnóstico. OR: Odds ratio. AUC: área bajo la curva

células NK^{CD56Dim}) pudieron determinar con éxito al 76.1% y 79.6% de los pacientes de los grupos COVID-19 y no-COV-ITR respectivamente (Tabla 18).

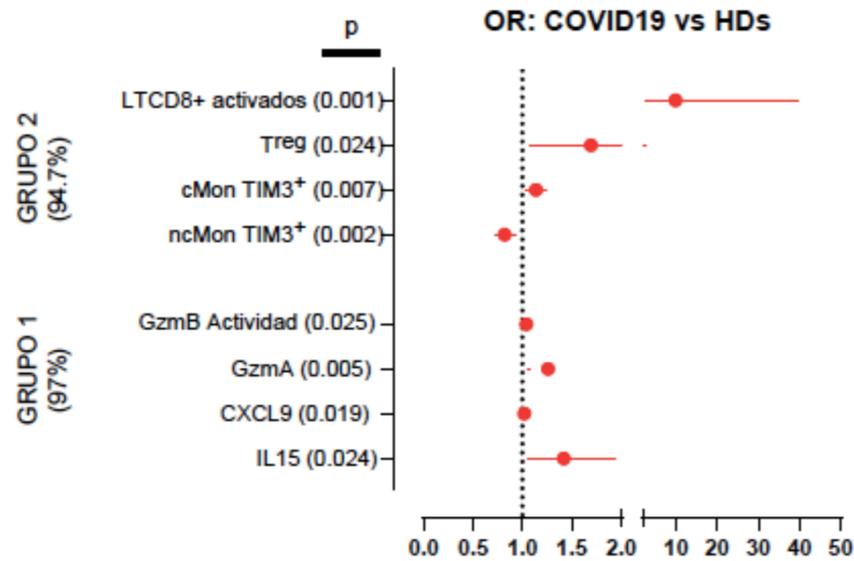


Figura 32: Selección de marcadores solubles (Grupo 1) y poblaciones celulares (Grupo 2) con capacidad diagnóstica. OR: Probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo (COVID-19). OR>1 indica correlación positiva, OR<1 indica correlación negativa.

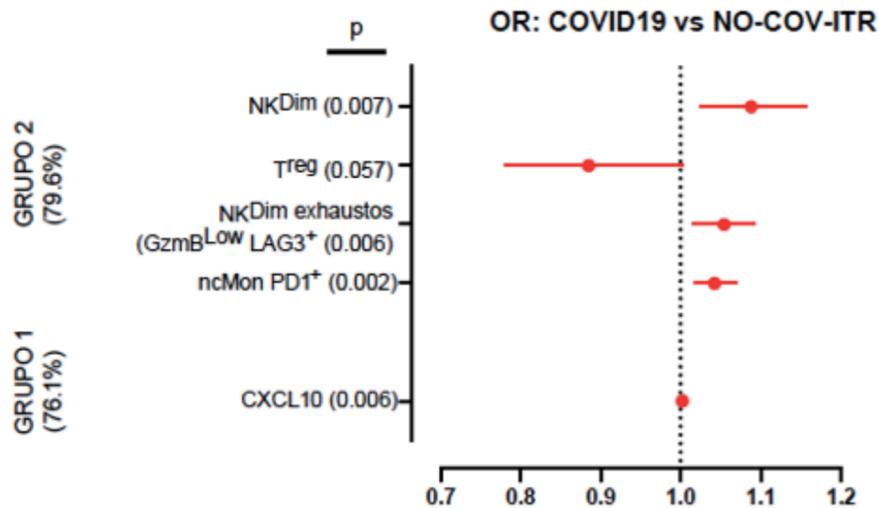


Figura 33: Selección de marcadores solubles (Grupo 1) y poblaciones celulares (Grupo 2) con capacidad diagnóstica. OR: Probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo (COVID-19). OR>1 indica correlación positiva, OR<1 indica correlación negativa.

En relación con los factores de gravedad y predictores de evolución clínica, los resultados se muestran en la Tabla 19 y 20 y en las figuras 34, 35 y 36. Las variables de edad, ULBP-2/5/6, IL6 e INFλ2 clasificaron al ingreso al 85% de los pacientes con

infección moderada/grave por SARS-CoV-2. Otro patrón constituido por once variables, entre las que se incluyen la edad, LTCD8⁺ activados y exhaustos y células NK adaptativas predijeron correctamente la gravedad en el 87.2% de los pacientes

Leve Vs Moderado/grave		OR (95% CI)	p	AUC
Grupo 1 85.0%	Edad	1,066 (1,020-1,115)	0,005	0,93 (0,88-0,98); p<0,001
	ULBP-2/5/6	1,017 (1,001-1,033)	0,035	
	IL6	1,058 (1,018-1,099)	0,004	
	IFN-λ2	0,949 (0,918-0,980)	0,002	
Grupo 2 87,2%	Edad	1,067 (1,022-1,115)	0,003	0,91 (0,86-0,97); p<0,001
	NKT	1,169 (1,019-1,342)	0,026	
	NK adaptativas (NK ^{Dim} NKG2A ⁻ , CD57 ⁺ , NKG2C ⁺)	1,068 (1,009-1,131)	0,024	
	NK ^{Dim} exhaustas (GzmB ^{Low} LAG3 ⁺)	1,085 (1,001-1,177)	0,048	
	NK ^{Dim} exhaustas (GzmB ^{Low} TIM3 ⁺)	0,889 (0,794-0,994)	0,040	
	cMon TIM3 ⁺	0,939 (0,889-0,993)	0,026	
	cMon LAG3 ⁺	0,966 (0,935-0,998)	0,036	
	LTCD8 ⁺ exhaustos (GzmB ^{Low} LAG3 ⁺)	1,095 (0,985-1,216)	0,092	
	CD38 ⁺ HLAR ⁺ TIM3 ⁺	0,913 (0,848-0,983)	0,016	
	CD38 ⁺ HLAR ⁺ PD1 ⁺	1,083(1,006-1,166)	0,035	

Tabla 19. Variables con capacidad de diferenciar COVID-19 leve de moderado/Grave OR: Odds ratio. AUC: área bajo la curva

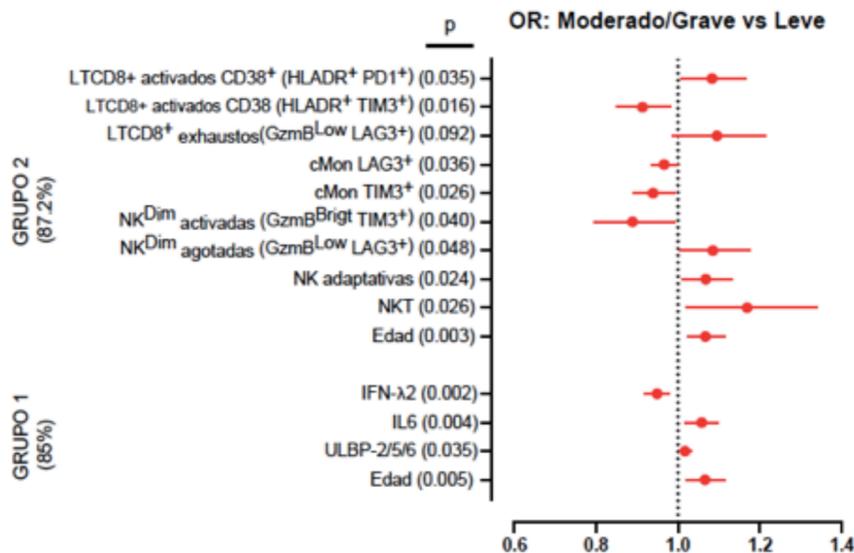


Figura 34: Selección de marcadores solubles (Grupo 1) y poblaciones celulares (Grupo 2) con capacidad para diferenciar COVID-19 leve de moderado/grave. OR: Probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo (moderado/grave). OR>1 indica correlación positiva, OR<1 indica correlación negativa.

El empeoramiento a los 7 días, definido como un aumento de los parámetros en la escala respiratoria (Anexo 1), se pudo determinar con una precisión del 83.1% y 80.5% usando los patrones de seis variables del grupo 1 (CXCL10, CXCL9, CCL8, IFN α , TNF α y GzmB) y 2 variables del grupo 2 (células NK^{CD56Dim} y cMon LAG3⁺) respectivamente (Tabla 20 y figura 35).

Finalmente, en relación con la capacidad de predicción de mortalidad, dos conjuntos de cuatro variables alcanzaron una precisión del 80.5%: en el grupo 1 la edad, el recuento linfocitario, y los marcadores CXCL19 y TNF α y en el grupo 2 nuevamente la edad, el recuento linfocitario, LTCD8⁺ exhaustos con expresión de PD1⁺ e iMon TIM3⁺ (Tabla 20 y figura 36).

COVID19 que presentan empeoramiento		OR (95% CI)	p	AUC
Grupo 1 83,1%	CXCL10	1,001 (1,000-1,002)	0,020	0,79 (0,66-0,93); p<0,001
	CXCL9	1,001 (1,000-1,002)	0,075	
	CCL8	0,995 (0,989-1,001)	0,080	
	IFN α	1,038 (0,996-1,082)	0,078	
	TNF α	0,931 (0,873-0,994)	0,032	
	GzmB	1,013 (1,001-1,025)	0,033	
Grupo 80.5%	cMon LAG3 ⁺	1,033 (1,009-1,057)	0,007	0,78 (0,66-0,89);p=0,01
	NK ^{Dim}	1,137 (1,021-1,267)	0,020	
COVID19 Éxitus		OR (95% CI)	p	AUC
Grupo 1 83,0%	Edad	1,105 (1,038-1,000)	0,002	0,90 (0,84-1,00); p<0,001
	Linfocitos	0,998 (0,996-1,000)	0,018	
	CXCL10	1,001 (1,000-1,002)	0,024	
	TNF α	0,911 (0,835-0,995)	0,038	
Grupo 2 83,0%	Edad	1,101 (1,035-1,171)	0,002	0,90 (0,83-0,963); p<0,001
	Linfocitos	0,998 (0,996-0,999)	0,009	
	iMon TIM3 ⁺	0,946 (0,899-0,996)	0,036	
	LTCD8 ⁺ exhaustos (GzmB ^{LOW} PD1 ⁺)	1,588 (0,961-2,624)	0,071	

Tabla 20. Variables con capacidad pronóstica predictiva en COVID-19. Empeoramiento se define por un aumento en los parámetros de la escala respiratoria (Anexo 1). OR: Odds ratio. AUC: área bajo la curva

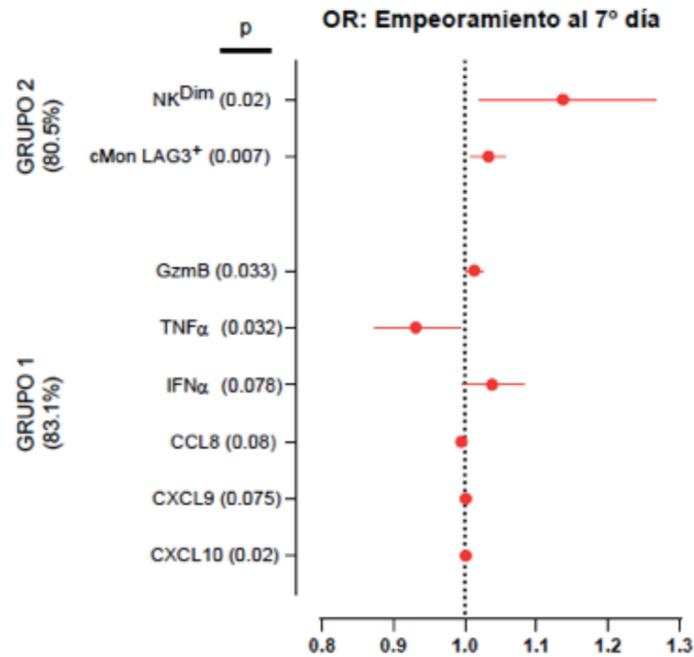


Figura 35: Selección de marcadores solubles (Grupo 1) y poblaciones celulares (Grupo 2) con capacidad pronóstica (empeoramiento al 7º día). OR: Probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo (empeoramiento al 7º día). OR>1 indica correlación positiva, OR<1 indica correlación negativa.

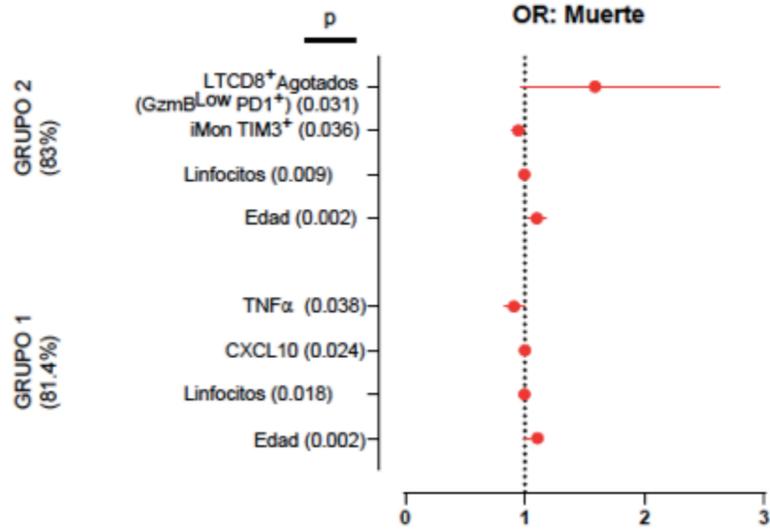


Figura 36: Selección de marcadores solubles (Grupo 1) y poblaciones celulares (Grupo 2) con capacidad pronóstica de muerte. OR: Probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo (muerte). OR>1 indica correlación positiva, OR<1 indica correlación negativa.

6. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

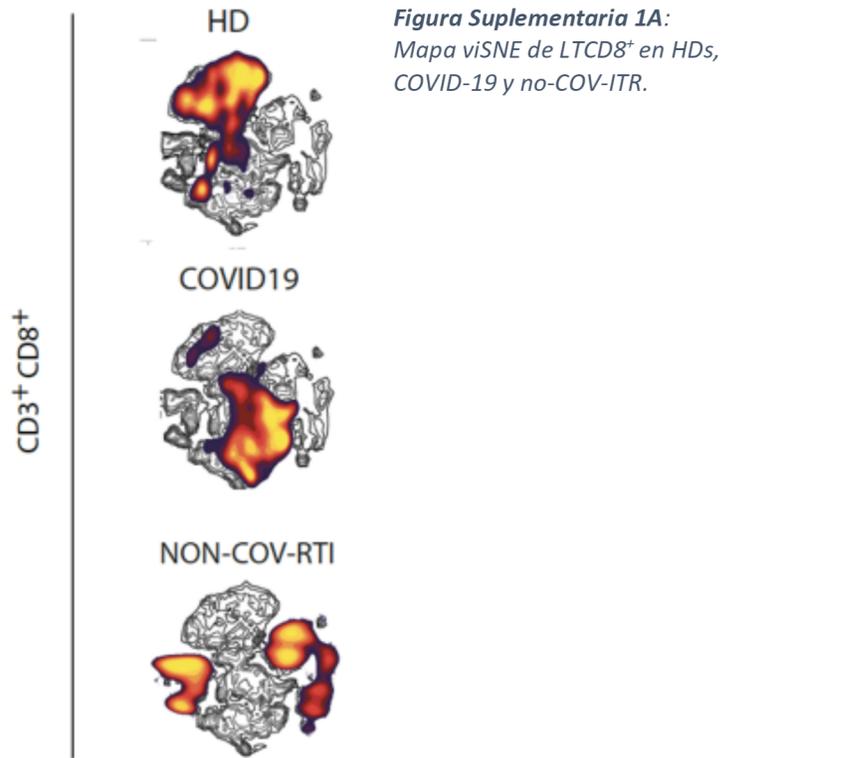


Figura Suplementaria 1A:
Mapa visNE de LTCD8⁺ en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR.

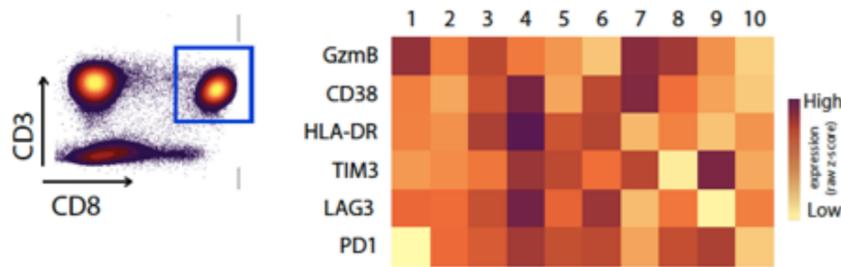
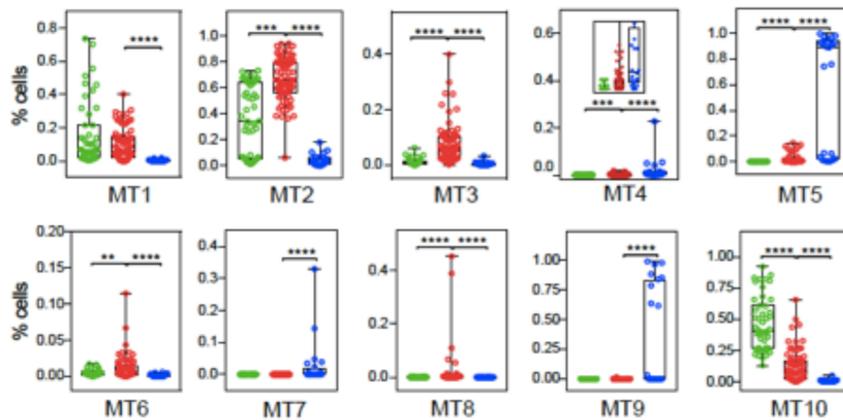


Figura Suplementaria 1B: FlowSOM de LTCD8⁺ con niveles de expresión de GzmB, CD38, HLA-DR, TIM3, LAG3 y PD1. En la segunda parte de la imagen se muestran los perfiles celulares con expresión de estos marcadores en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR.



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

■ HD
■ COVID19
■ NO-COV-ITR

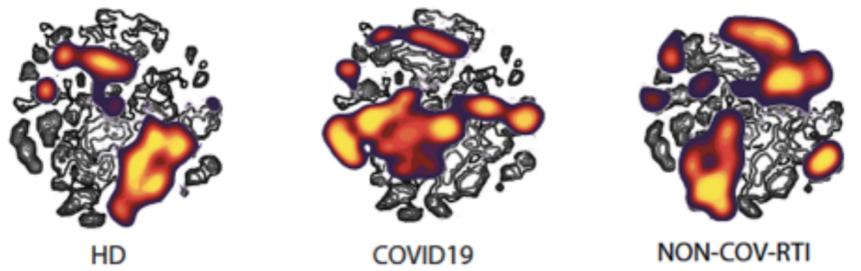


Figura Suplementaria 2A: Mapa viSNE de células NK en función de marcadores de diferenciación, receptores de activación e inhibición en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR.

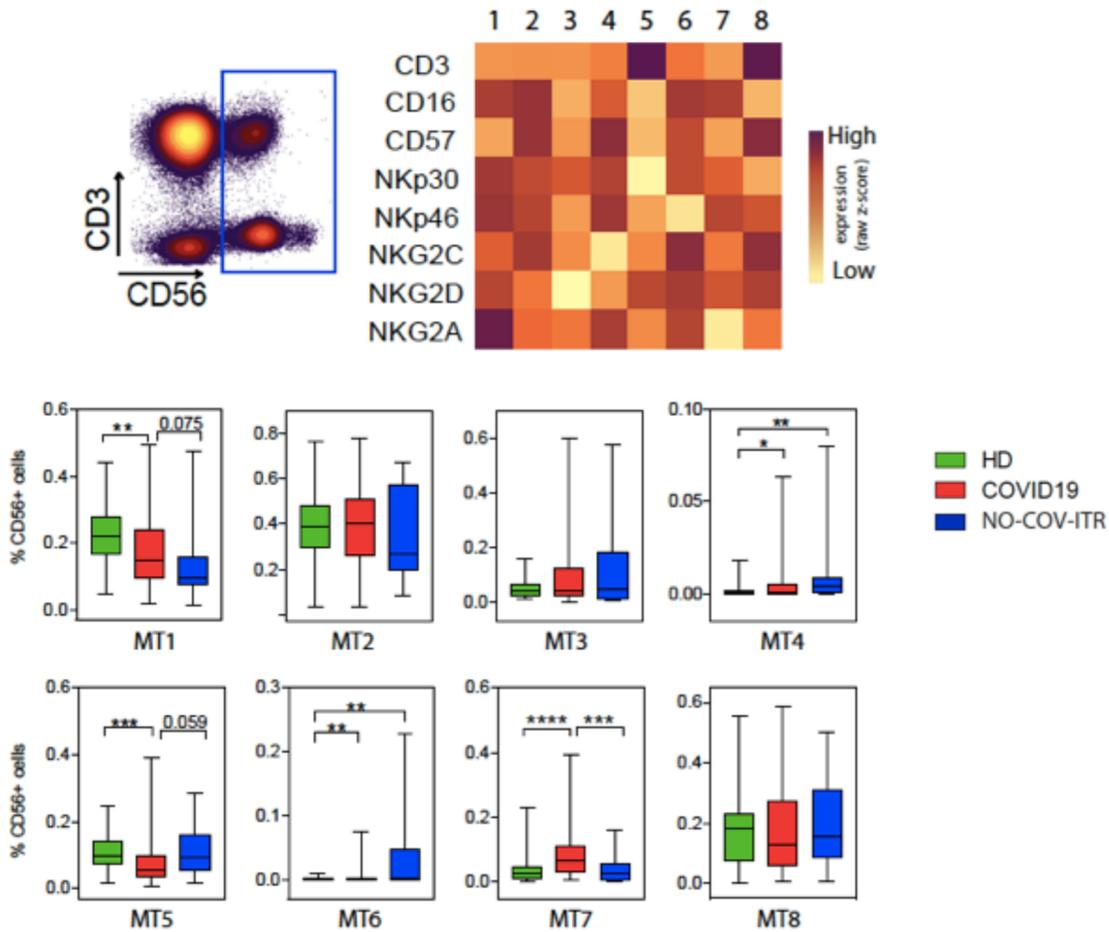


Figura Suplementaria 2B: FlowSOM de células NK con niveles de expresión de CD3, CD16 y marcadores de diferenciación (CD57), receptores de activación (NKp30, NKp46, NKG2C, NKG2D) e inhibición (NKG2A). En la segunda parte de la imagen se muestran los perfiles celulares con expresión de estos marcadores en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

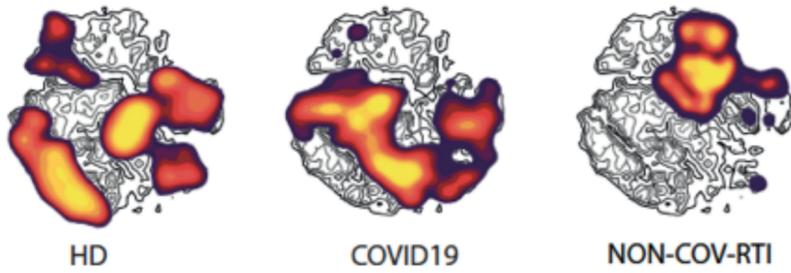


Figura Suplementaria 2C: Mapa viSNE de células NK en función de marcadores de activación y puntos de control inhibitorios en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR.

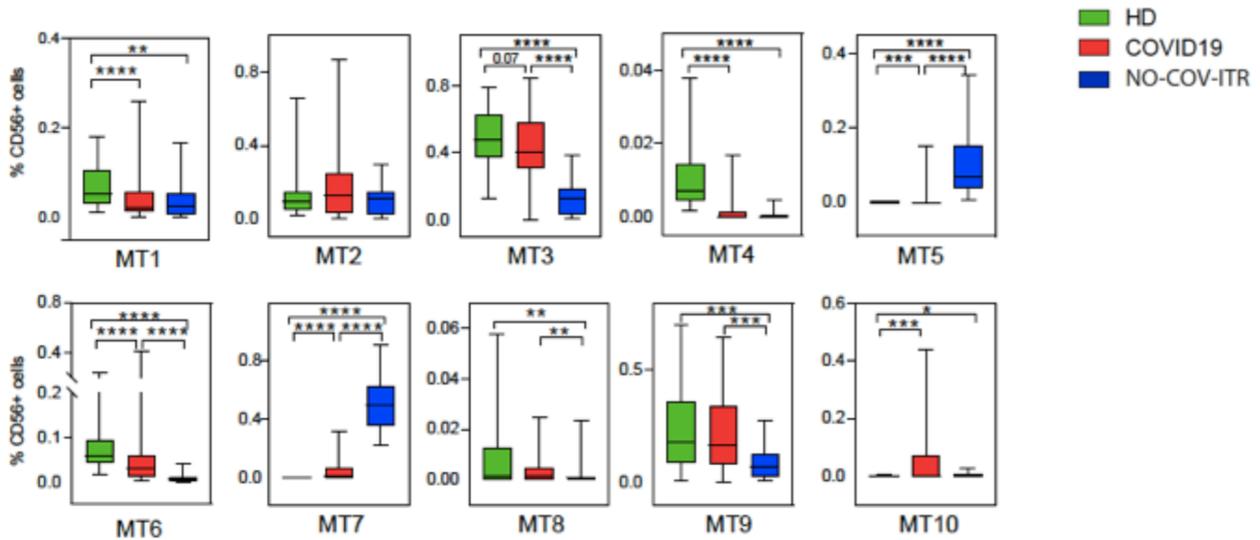
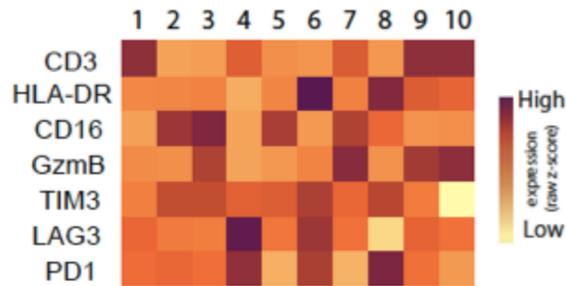


Figura Suplementaria 2D: FlowSOM de células NK con niveles de expresión de CD3, marcadores de activación (HLA-DR, GzmB^{High}), agotamiento (GzmB^{Low}) y puntos de control inhibitorios. En la segunda parte de la imagen se muestran los perfiles celulares con expresión de estos marcadores en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

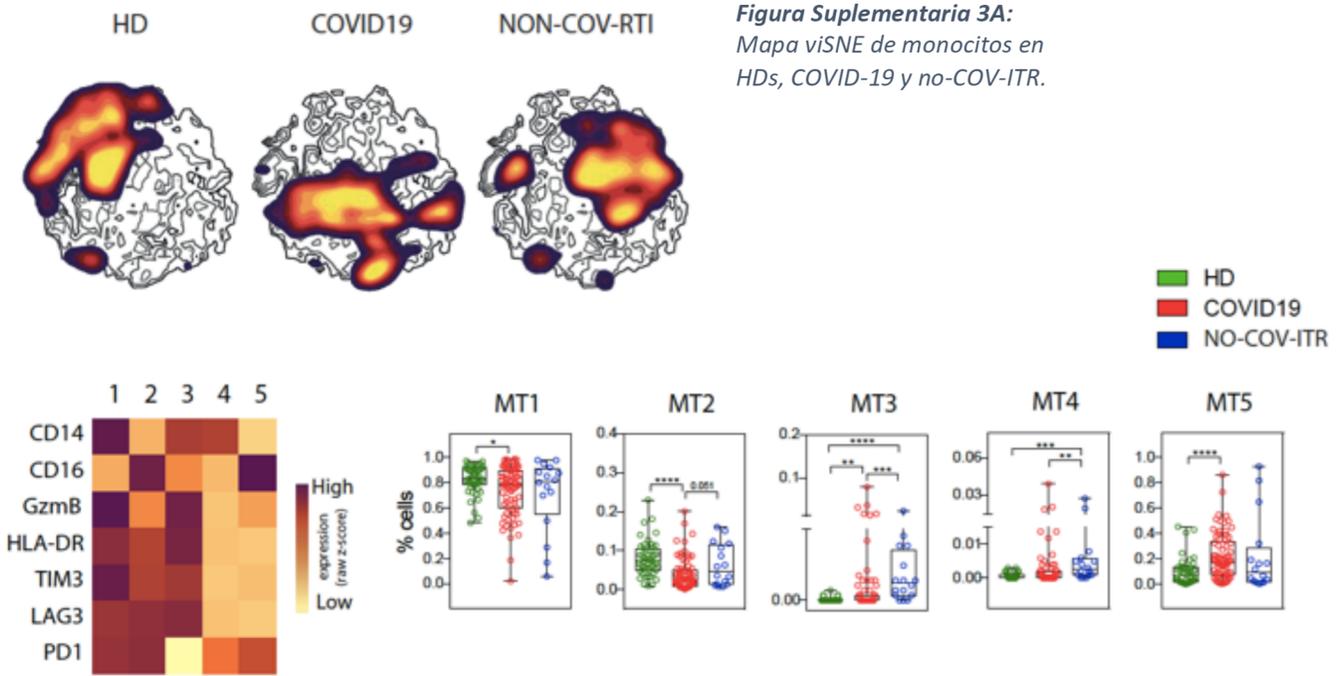


Figura Suplementaria 3B: FlowSOM de monocitos con expresión de marcadores de diferenciación (CD14, CD16), activación (HLA-DR, GzmB^{high}), agotamiento (GzmB^{low}) y puntos de control inhibitorios. En la segunda parte de la imagen se muestran los perfiles celulares con expresión de estos marcadores en HDs, COVID-19 y no-COV-ITR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

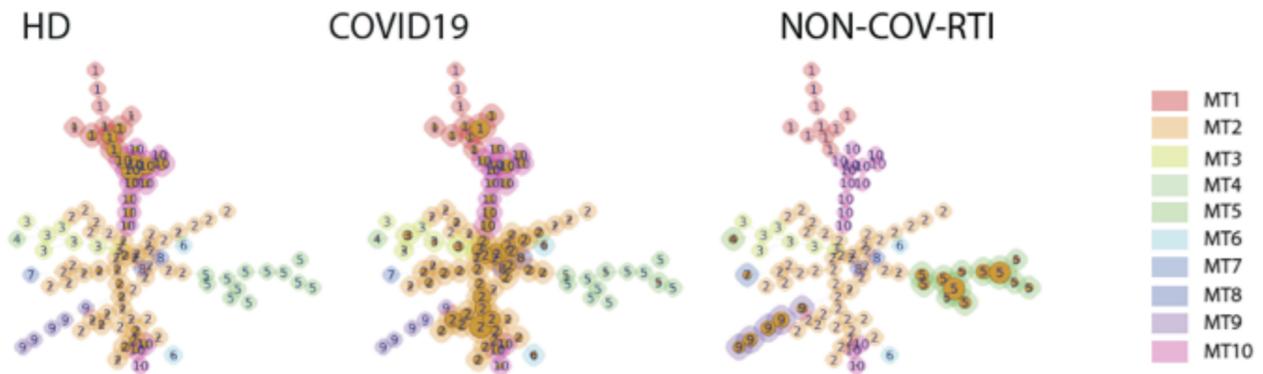


Figura Suplementaria 4: MST de los metaclústeres generados por FlowSOM de LTCD8+ en HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR.

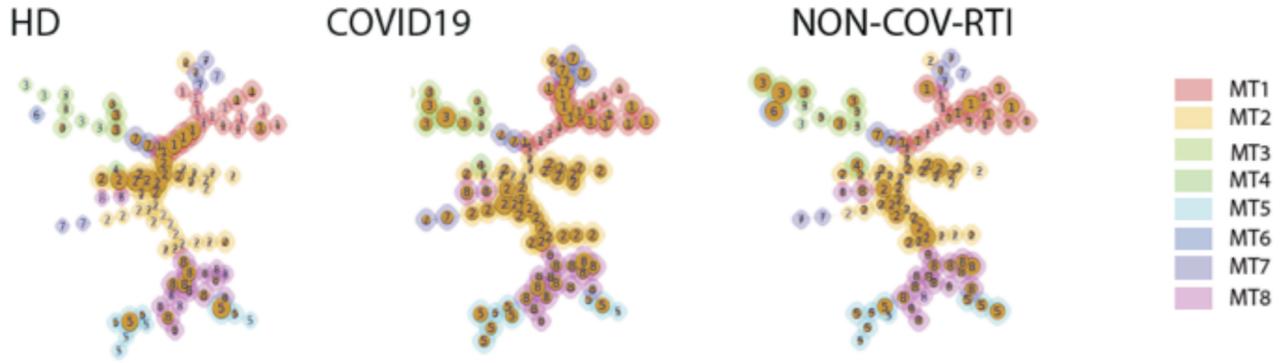


Figura Suplementaria 5: MST de los metaclústeres originados por FlowSOM de células NK con expresión de marcadores de diferenciación (CD57), activación (NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp46) e inhibición (NKG2A) en HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR.

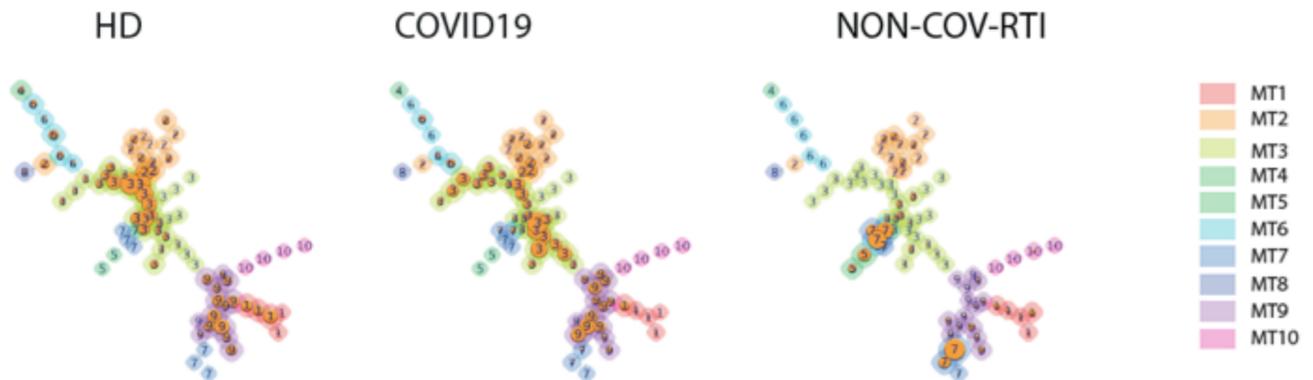


Figura Suplementaria 6: MST de los metaclústeres originados por FlowSOM de células NK con expresión de marcadores de activación (HLA-DR, GzmBHigh), agotamiento (GzmBLow) y puntos de control inhibitorios en HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR.

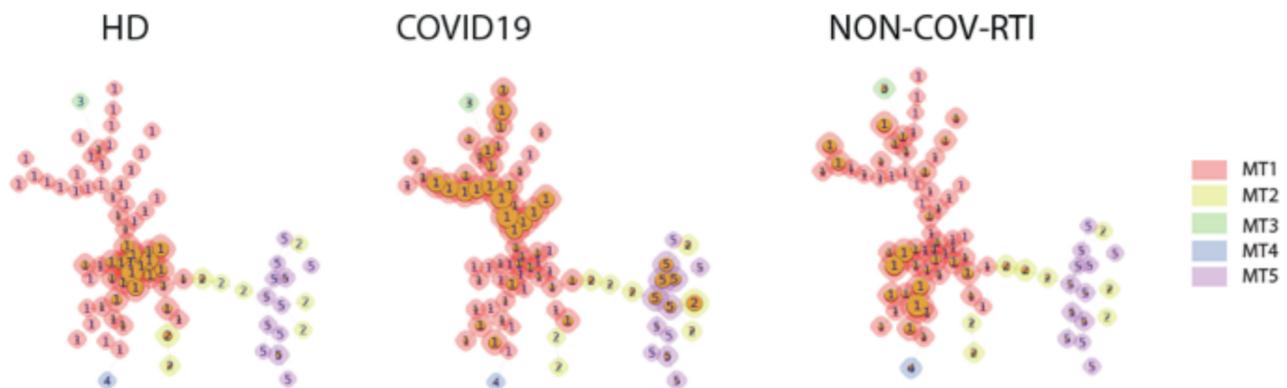


Figura Suplementaria 7: MST de los metaclústeres originados por FlowSOM de monocitos en HDs, COVID-19 y no-CoV-ITR.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

La respuesta inmune generada tras la infección por SARS-CoV-2 todavía no ha sido completamente perfilada. Después de provocar más de cuatro millones de muertes y graves crisis sociales, y a pesar de haber alcanzado la producción de vacunas seguras y eficaces, únicamente se ha podido matizar su fisiopatología, especialmente compleja en los casos graves. En nuestro estudio se han analizado las poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune innata y adaptativa, así como los niveles de citoquinas y otros ligandos solubles inmunorreguladores en pacientes con infección por SARS-CoV-2, otras infecciones respiratorias, otras patologías que motivaron ingreso hospitalario y controles sanos. De este modo se han generado diferentes perfiles que podrían tener potencial utilidad diagnóstica y pronóstica al representar firmas inmunológicas de COVID-19 y otras patologías.

Nuestro análisis de poblaciones celulares mostró un recuento linfocitario global menor en aquellos pacientes con infección por SARS-CoV-2, al igual que se ha visto en otros estudios⁸⁷, especialmente en los casos críticos y con mayor mortalidad, lo que puede traducirse en un potencial predictor de gravedad clínica y respuesta al tratamiento. Esta linfopenia podría estar justificada por un daño citopático viral indirecto a través de la acción de mediadores inmunes citotóxicos, por la redistribución dirigida al lecho pulmonar o por una falta de proliferación clonal y apoptosis generada por un estado precoz de agotamiento. El daño citopático directo es improbable que justifique la linfopenia, dado que los linfocitos T no disponen de receptor ACE2⁸⁸. Esta linfopenia se hace más llamativa en pacientes de edad elevada, con mayor riesgo de neumonía y SDRA. Estudios previos sugirieron que este aumento de riesgo podría estar justificado por un aumento en los niveles de expresión de ACE2 correlacionado con la edad⁸⁹. No obstante, en estudios posteriores en los que se ha examinado la expresión y distribución de ACE2 en biopsias pulmonares se ha visto que, contrariamente a lo planteado inicialmente, los niveles de ACE2 disminuyen con la edad. De hecho, los mayores niveles de esta proteína se han encontrado en niños, donde la enfermedad suele presentarse de forma leve o asintomática, siendo mayores incluso que en pacientes fumadores o

con historia oncológica pulmonar^{90,91}. De esta forma la intensidad de la expresión de ACE2 no es suficiente para justificar la mayor o menor vulnerabilidad a la infección ni la desregulación de la respuesta inmune encontrada entre sujetos leves frente a graves.

Los linfocitos T juegan un papel fundamental en el aclaramiento viral, siendo los LTCD8⁺ responsables de la mayor actividad citotóxica mediante la producción de granzimas y perforina, como se ha visto en otras infecciones respiratorias como el virus respiratorio sincitial (VRS) o la gripe⁸⁷. El grupo de pacientes con infección por SARS-CoV-2 se caracterizó por una intensa activación de LTCD8⁺, pero también por la aparición precoz simultánea de varios puntos de control inhibitorios, especialmente TIM3 y LAG3, siendo este último nuevamente mayor en los casos graves y en aquellos pacientes que fallecían. En la citometría de alta dimensión resulta especialmente patente la coexpresión de varios marcadores de control en la misma célula, diferenciando COVID-19 de no-CoV-ITR. En condiciones normales la expresión intensa y simultánea de estos puntos de control inhibitorios ocurre cuando se ha resuelto la infección con el objetivo de evitar fenómenos inmunopatológicos, proceso conocido como agotamiento. Cuando este agotamiento aparece antes de producirse el control de la infección, se traduce en un estado de disfunción celular que impide un control eficaz del virus⁹². Este agotamiento se genera habitualmente por una presencia persistente de los antígenos que estimulan el receptor celular de los linfocitos T, lo cual los reprograma transcripcionalmente, provocando una pérdida de función y una mayor expresión de receptores de inhibición celular. Las actividades citolíticas como la producción de citoquinas y moléculas citotóxicas como las granzimas son más resistentes a la extinción y suelen mantener niveles elevados hasta alcanzar los estados más severos de agotamiento⁹². En la cohorte de infección por SARS-CoV-2 era llamativa la expresión de TIM3 y especialmente LAG3, siendo este último correlativo con una mayor predisposición a la gravedad de la infección. Este hallazgo se ha obtenido en otros estudios, tanto en el análisis de marcadores de control inhibitorio en sangre periférica como en lavado broncoalveolar, estando su concentración directamente relacionada con la carga viral⁹³⁻⁹⁵, lo que explicaría que el agotamiento celular falle en el control de la replicación del patógeno. Sin embargo, estos estudios se han centrado principalmente en el análisis de PD1, siendo nuestros resultados los primeros que analizan TIM3 y LAG3 a nivel de proteínas

celulares sugiriendo un posible papel de estos puntos de control en el estado de agotamiento de LT CD8⁺. Hay que destacar que estas moléculas no son exclusivas de un estado de agotamiento, ya que aparecen durante la activación celular con una función de inmunotolerancia frente a células sanas⁴⁵. Es cuando se expresan en mayor cantidad y acompañadas de otros puntos de control, y en ausencia de moléculas citotóxicas como granzimas, cuando son habitualmente considerados un sello de agotamiento celular y de progresión de la infección. En ese momento constituyen un potente inhibidor que bloquea la proliferación clonal y funcional de linfocitos T efectores y células NK y es capaz de activar la apoptosis celular, pudiendo interrumpir una respuesta antiviral inmune eficiente. En nuestro caso, la intensa activación de LTCD8⁺ podría estar contrabalanceada por la aparición de este estado de agotamiento, limitando así la respuesta antiviral.

Sin embargo, en el grupo de COVID-19 es llamativa la coexpresión de estos puntos de control inhibitorios junto a marcadores de activación (HLA-DR, CD38) y mantenimiento en la producción de GzmB, por lo que es razonable dudar de una pérdida de las funciones efectoras, al menos total. Igualmente, en el estudio publicado por *Min-Seok Rha et al*, la presencia de LTCD8⁺ con expresión de PD1 en pacientes con COVID-19 en fase aguda y convaleciente iba acompañada de producción de IFN γ y de otros marcadores de activación, por lo que abogaban por un mantenimiento de funcionalidad⁹⁶, aunque se desconoce si pudiera ser residual por esta última pérdida de la actividad citotóxica comentada previamente.

Aunque la expresión de estos marcadores de inhibición es un fenómeno típico de infecciones crónicas o tumorales, se ha descrito también en infecciones respiratorias agudas, como la causada por el *metapneumovirus humano* en ratones⁹⁷. Los resultados obtenidos hacen reflexionar sobre la posibilidad de que SARS-CoV-2 evada la respuesta inmune mediante la disfunción de LTCD8⁺ a través de un agotamiento precoz generado por un estímulo antigénico persistente provocado por una excesiva producción de citoquinas. El bloqueo único o simultáneo de estas vías de inhibición celular puede suponer un prometedor objetivo terapéutico. En la actualidad, se encuentran aprobados varios tratamientos que bloquean la acción de PD1 (pembrolizumab,

nivolumab, cemiplimab) o de su ligando (durvalumab, atezolizumab, avelumab) en diferentes neoplasias⁹⁵. La evidencia y la seguridad es menor en lo referente al tratamiento de infecciones. En estudios animales se ha utilizado en infecciones crónicas como el virus de la hepatitis C o el Virus de la Coriomeningitis Linfocitaria, consiguiendo una revigorización de los LTCD8⁺ exhaustos y una disminución de la carga viral^{92,93}. En humanos el bloqueo de PD1 con nivolumab mejoró la inmunidad frente a la infección por VIH⁹⁸. La experiencia en infecciones del tracto respiratorio se limita a estudios in vitro, donde se observó que el bloqueo de PD1 aumentaba la actividad de LTCD8⁺ en infecciones agudas causadas por el VRS y algunos HCoVs⁹⁷. Nuestro análisis defiende que el bloqueo de LAG3 pudiera ser más eficaz para incrementar la respuesta inmune, aunque la coexpresión de varios puntos de control inhibitorios en la citometría de alta dimensión probablemente justificaría un bloqueo simultáneo de todos ellos para alcanzar mayor respuesta de LTCD8⁺.

Los LTreg también se encontraban elevados en el grupo de COVID-19 al comparar con HDs, aunque no hubo diferencias al analizar por nivel de gravedad. Estos linfocitos generan señales cruciales para la homeostasis inmune y la autotolerancia, pero también pueden inhibir respuestas protectoras contra patógenos⁹³.

En cuanto a las células NK, otro de los componentes clave en la inmunidad viral⁹⁹, en el grupo de infección por SARS-CoV-2 se produjo un aumento de su recuento, así como una mayor diferenciación con la aparición de células NK adaptativas y una intensa activación con aumento del marcador NKG2D, en especial en las células con perfil citotóxico (NK^{CD56Dim}). Este mismo aumento de células NK CD57⁺ se reprodujo en el grupo de mayor gravedad, así como una activación intensa pero a través del marcador NKG2C⁺, hechos descritos en otros estudios¹⁰⁰. Este exceso de activación de células NK podría ser responsable de una respuesta inflamatoria exacerbada que resultara en daño tisular, como se ha descrito en la sepsis. Por ejemplo, la depleción de células NK en modelos murinos con infección sistémica por *Escherichia coli* o *Brucella microti* ha demostrado mejorar la supervivencia, reducir la producción de citoquinas y producir menor daño orgánico^{41,101}.

Al igual que ocurría con los LTCD8⁺, también fue llamativa la aparición precoz de una gran proporción de células NK^{CD56Dim} exhaustas, con la expresión simultánea de PD1 y fundamentalmente LAG3, al comparar con los otros dos grupos de diagnóstico, aunque estas diferencias no se obtuvieron en el grupo de mayor gravedad ni mortalidad. De esta forma, la intensa activación de células NK también se vería nuevamente limitada por la aparición precoz de células exhaustas. En el estudio publicado por *Zheng M. et al*, también se apreciaba una mayor proporción de células NK exhaustas que expresaban el receptor de inhibición NKG2A en el grupo de infección por SARS-CoV-2, normalizándose estos valores durante la fase convaleciente¹⁰². Clásicamente, la expresión de PD1 y LAG se ha considerado marcador crítico de agotamiento, aunque los estudios al respecto vuelven a mostrar discrepancias⁴⁴. Es posible que en este caso la expresión de estos puntos de control inhibitorios no implique una pérdida completa de funcionalidad, como podría plantearse por los niveles elevados de GzmB que se encontraron en COVID-19 al comparar con no-CoV-ITR o ID, producida también por células NK^{CD56Dim}.

En lo referente a los monocitos, en la cohorte de infección por SARS-CoV-2 se observaron niveles menores que HDs y menor expresión de ICIs. Este descenso se repetía en el porcentaje de iMon en el grupo de mayor gravedad, pudiendo estar ambos factores relacionados con una menor capacidad de presentación inicial de antígenos y un retraso en la activación inmune.

La presencia heterogénea de LTCD8⁺ y células NK activadas y exhaustas fue acompañada de una agresiva respuesta inmune caracterizada por una masiva producción de casi todas las citoquinas en los pacientes con COVID-19, en especial en aquellos de mayor gravedad y mortalidad, algo similar a lo descrito en SARS-CoV⁴⁶. De entre ellas, IL18, TNF α y el ligando de muerte celular TRAIL diferenciaban la infección por SARS-CoV-2 de HDs, no-CoV-ITR e ID, por lo que podrían tener utilidad como marcadores diagnósticos. De entre ellos, TNF α junto a otras citoquinas como IL2 e IL1RA se asociaron a mayor gravedad y mortalidad. La elevación de IL6 y otras como IL12 o IL15, no era específica de COVID-19, apareciendo también en otras infecciones respiratorias y otras patologías.

La presencia constante de $TNF\alpha$ en los pacientes críticos iría por una parte a favor del mantenimiento de las funciones efectoras de $LTCD8^+$ y NK a pesar de la expresión de ICIs, dado que es una citoquina que se reduce en los primeros pasos de agotamiento⁹², aunque su producción también está condicionada a otras células como monocitos, macrófagos y leucocitos. Por otro lado, en pacientes mayores de 65 años con linfocitos envejecidos (con mayor riesgo de COVID-19 crítica e ingreso en UCI), esta elevación persistente de $TNF\alpha$ podría inducir la apoptosis de linfocitos T^{103} , lo cual sí que podría justificar la mayor linfopenia detectada en esta cohorte de riesgo.

La mayor parte de las quimioquinas también se encontraban sobre-expresadas, hallando las mayores diferencias al comparar con HDs. CXCL10, CCL2, CCL8 y CXCL9 estaban elevadas de forma específica en la infección por SARS-CoV-2 frente a los otros tres grupos de comparación, mientras que CXCL10, CXCL9 y CCL2 se relacionaron con una mayor vulnerabilidad y riesgo de mortalidad, lo que podría plantear su utilidad como marcadores diagnósticos y pronósticos y su posible papel fisiopatológico. Este planteamiento se confirmó en el análisis multivariante, donde CXCL10 y CXCL9 junto con $TNF\alpha$ demostraron una elevada capacidad diagnóstica y pronóstica de muerte.

Se ha demostrado que una masiva producción de citoquinas atrae en gran medida a otras células inflamatorias como monocitos, $LTCD8^+$ y NK (100) generando una respuesta inflamatoria desproporcionada. En estudios clínicos se han documentado concentraciones elevadas de CXCL10 en pacientes sépticos, lo cual se ha correlacionado con riesgo de evolución a shock séptico y muerte. También está documentado el papel que juega CXCL10 en la progresión a SDRA tras daño pulmonar viral¹⁰⁴. En estudios experimentales, ratones manipulados genéticamente para la incapacidad de expresión de CXCL10 o tratados con inmunoglobulina anti-CXCL10 mostraron menor producción de citoquinas, menor disfunción orgánica y mayor supervivencia que los ratones comunes tras la inducción de sepsis mediante punción cecal, sin afectar al control de la carga bacteriana. Esta ausencia en la generación de CXCL10 fue ligada a un menor tráfico y activación de células inflamatorias al lecho peritoneal, lo cual también se correlacionó con una menor mortalidad¹⁰⁵. Resultados similares se han obtenido en otros estudios animales con infección por Influenza¹⁰⁴ o sepsis neumocócica¹⁰⁶. En cambio, en modelos

animales con infecciones menos graves, CXCL10 ha demostrado su utilidad en el control de la carga bacteriana, por lo que su uso como bloqueo terapéutico únicamente se podría plantear en aquellos casos en los que se produjera disfunción orgánica¹⁰⁵, en nuestro caso generalmente por progresión a SDRA.

La firma inmune representada por tanto por interleuquinas, quimioquinas y también ligandos solubles podía diferenciar COVID-19 de otras infecciones respiratorias y otras patologías y predecir la gravedad. En cuanto a los ligandos solubles, los miembros de la familia MIC y ULBP, ligandos del receptor de activación NKG2D, aparecían de forma constante elevados en COVID-19 y en los pacientes moderados/graves y que fallecían. Estas moléculas son capaces de bloquear LTCD8⁺ y células NK al unirse al receptor de activación NKG2D y competir con los ligandos expresados en la membrana de las células infectadas. No obstante, en el seno de una infección no controlada, la masiva producción de ligandos de NKG2D inhibiría las funciones efectoras de LTCD8⁺ y células NK, pudiendo justificar una respuesta antiviral ineficiente a pesar de la intensa presencia de células activadas, especialmente en pacientes críticos. Además, es posible que la sobreproducción de sNKG2DL regule a la baja la expresión de NKG2D, impidiendo así su unión a otros receptores de membrana celulares que permitirían la activación de células NK y LTCD8⁺⁴⁰. De esta forma, el bloqueo terapéutico de ICIs con el objetivo de intensificar esta respuesta podría ser insuficiente debido a la presencia elevada de sNKG2DL. Hasta la fecha se han descrito múltiples virus (VIH, Epstein Barr, Hepatitis C, Varicela Zóster...) capaces de evadir la activación de células NK mediante esta producción de ligandos solubles de NKG2D y por tanto resistentes a esta vía inmune⁴⁰.

Dentro de la familia de las serin proteasas, la GzmB presenta la mayor actividad citotóxica, ejerciendo su función mediante la penetración celular a través de la perforina e induciendo la apoptosis, mientras que GzmA regula la respuesta inflamatoria a través de complejas vías extracelulares¹⁰⁷. Ambas son producidas principalmente por LTCD8⁺ y células NK, y están involucradas en la fisiopatología de la sepsis mediante la muerte celular, la atracción y producción de citoquinas y la lesión endotelial, contribuyendo así al daño orgánico y encontrándose niveles elevados en este tipo de pacientes⁴². En ratones GzmA KO la sepsis inducida por el patógeno *Brucella microti* se correlacionó con

una menor expresión de citoquinas proinflamatorias y una mayor supervivencia, sin afectar a los niveles de carga bacteriana. De la misma forma, la transferencia de células NK productoras de GzmA a los ratones deficientes restauró la susceptibilidad a la sepsis⁴¹. En otro modelo animal con ratones GzmA KO, la inducción de sepsis mediante punción cecal mostró una mayor supervivencia y una menor atracción de mediadores inflamatorios, sin afectarse tampoco el control de la carga bacteriana⁴³. Además, GzmA puede activar la cascada de la coagulación durante procesos inflamatorios mediante la generación de citoquinas responsables del daño endotelial y la activación plaquetaria, creando un estado procoagulante⁴². Por otro lado, GzmB se ha visto implicada en la gravedad de numerosas patologías autoinmunes e inflamatorias¹⁰⁹, y su deficiencia se ha relacionado con un mejor pronóstico¹¹⁰.

En nuestro estudio, en el grupo de infección por SARS-CoV-2 se observaron concentraciones más elevadas de GzmA y GzmB, sugiriendo una agresiva respuesta inflamatoria y citotóxica, con una intensa atracción de interleuquinas y quimioquinas generada por GzmA, como se vio también en el análisis de correlación. Curiosamente la concentración de Gzms no siempre iba en línea con la actividad, lo que se explica por la probable presencia de formas inactivas en la circulación debido a la actuación de inhibidores extracelulares como la antitrombina III, disminuidos en procesos como la sepsis y con una relación inversa con la mortalidad⁴².

Esto explicaría por qué es la actividad de Gzms lo que se correlaciona con la gravedad, y no la concentración. De esta forma, en el grupo de pacientes críticos y mortalidad se observó un aumento de la actividad de la GzmA, con la consiguiente intensificación de la respuesta ejecutada por citoquinas. Esta actividad, unida a la intensa presencia de IL1RA, TNF α y CXCL10 también podría favorecer un estado protrombótico^{41,110} observado clínicamente en los pacientes más graves.

En cuanto al análisis realizado sobre los marcadores inflamatorios, ferritina, PCR y DD eran capaces de diferenciar a los pacientes más graves y con mayor riesgo de empeoramiento y muerte. En otros estudios se ha confirmado este valor predictivo, PCR y ferritina como reactivos de inflamación, y DD como producto de degradación

vascular en relación con el daño endotelial¹¹¹. Además, PCR y DD se correlacionaron de forma positiva con las quimioquinas recogidas en los grupos de mayor gravedad, como CXCL10 y CXCL9, lo que confirma su valor pronóstico.

En resumen, nuestro análisis ha revelado una intensa activación de LTCD8⁺ y células NK en la infección grave por SARS-CoV-2, con la aparición de células NK adaptativas. Esta activación probablemente se vea limitada en su eficacia del aclaramiento viral por la aparición simultánea de TIM3, LAG3, o PD1 y ligandos del receptor NKG2D, y está acompañada de una agresiva respuesta inflamatoria regulada por GzmA y ejecutada por múltiples interleuquinas y quimioquinas.

Además de proporcionar conocimiento sobre la fisiopatología de la respuesta inmune, nuestro estudio ha permitido generar firmas inmunológicas que diferencian la infección por SARS-CoV-2 de otras infecciones respiratorias y otras patologías, validado sobre una amplia cohorte de pacientes. También se han proporcionado marcadores con potencial valor diagnóstico y pronóstico, como CXCL10 y se han planteado opciones terapéuticas ya aplicadas en otras patologías.

No obstante, estos modelos requieren de un proceso de validación externa en un mayor número de pacientes. Por otro lado, los grupos de HDs y COVID-19 difirieron en la edad (44 ± 12.5 en HDs y 71.2 ± 17.9 en COVID-19), por lo que inicialmente no se pudo descartar que esta diferencia influyera en la distribución de las poblaciones celulares. No obstante, los análisis se repitieron usando una antigua cohorte de HDs independiente (edad media de 71.2) y se han encontrado resultados similares. Otra de las limitaciones del estudio ha sido la ausencia de precisión diagnóstica en el grupo de no-CoV-ITR, sin especificar la etiología de la infección respiratoria, lo que podría haber aportado una mayor caracterización en las diferencias encontradas. Las condiciones extremas hospitalarias de los meses de reclutamiento de los pacientes impidieron profundizar en el enfoque diagnóstico y la conservación de las posibles muestras. Por otro lado, la recogida de las muestras durante las primeras 24 horas, a la llegada del paciente a urgencias, implica que éstas no se pudieron ver influidas por posibles tratamientos inmunosupresores aplicados con posterioridad durante el ingreso.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La respuesta inmune provocada por SARS-CoV-2 es diferente a la encontrada en otras infecciones respiratorias de patrón clínico similar, así como en otras patologías no infecciosas y controles sanos.
 - a. Esta respuesta inmune se caracteriza por una intensa activación de LTCD8⁺ y células NK, lo que podría justificar parte del daño tisular y la lesión orgánica.
 - b. Esta activación va acompañada de la aparición precoz de varios marcadores de control inmunes inhibitorios, con la presencia simultánea de células que producen Gzms y de marcadores de activación, junto con células que no expresan Gzms, lo que apunta a un mantenimiento parcial de su funcionalidad.
 - c. La disfunción en el control de la replicación viral podría explicarse por la presencia masiva de ligandos solubles del receptor NKG2D, que, al bloquearlo, impedirían la activación de funciones efectoras de células NK y linfocitos T CD8⁺.
 - d. El bloqueo terapéutico único (fundamentalmente LAG3) o simultáneo de varios puntos de control inmune inhibitorios puede constituir un prometedor avance terapéutico en las formas graves de COVID-19, reactivando así la funcionalidad de células NK y LT. No obstante, para revigorar la respuesta inmune, probablemente sea necesario el bloqueo asociado de los ligandos solubles de NKG2D.
2. La infección por SARS-CoV-2 se caracteriza por una agresiva producción de interleuquinas y quimioquinas, algunas de ellas con capacidad diagnóstica por

presentarse de forma específica (IL18, CXCL10, CCL2, CCL8, CXCL9) respecto a no-CoV-ITR e ID.

3. La infección por SARS-CoV-2 presenta actividad elevada de GzmA y GzmB, mayor a las encontradas en otras infecciones respiratorias y otras patologías. Esto podría contribuir al daño citotóxico observado en los tejidos y a la producción de altos niveles de citoquinas inflamatorias.
4. Las formas graves de SARS-CoV-2 presentan un perfil de células NK y linfocitos T distinto a las formas leves, caracterizado por la aparición de células NK adaptativas y un fenotipo exhausto, observándose principalmente una alta expresión del punto de control inhibitorio LAG3.
5. La respuesta inmune por SARS-CoV-2 y sus formas graves se presentan con una masiva producción de interleuquinas y quimioquinas que también justificarían el daño pulmonar.
 - a. Especialmente la quimioquina CXCL10 aparece de forma específica en la infección por SARS-CoV-2 y se relaciona de forma directa con la COVID-19 crítica y el riesgo de mortalidad. Además, su presencia constante junto a otras citoquinas justificaría el estado protrombótico de la enfermedad.
 - b. CXCL10 es un marcador útil diagnóstico y pronóstico de la infección por SARS-CoV-2. Estudios previos apoyan también la posibilidad de utilizarlo como diana terapéutica mediante un bloqueo de su funcionalidad.
6. Las formas moderadas/graves de SARS-CoV-2 se caracterizan por una intensa producción de ligandos solubles de NKG2D (familias MIC y ULBP), lo cual podría justificar nuevamente la disfunción de células NK y linfocitos en el control de la replicación viral.

7. La actividad de GzmA extracelular se correlaciona de forma positiva con la expresión de citoquinas inflamatorias (como IL2, IL6, IL31, IL33) y la quimioquina CXCL8 y probablemente contribuya al estado inflamatorio descontrolado en las formas graves de la infección.

8. Ferritina, PCR y Dímero D son determinaciones analíticas rutinarias con valor pronóstico en COVID-19 y con adecuada correlación con marcadores inmunes sugestivos de infección grave.

ANEXO 1

9. ANEXO 1

Escala respiratoria.

1. No precisa oxigenoterapia
2. Precisa oxigenoterapia a < 4 lpm
3. Precisa oxigenoterapia a > 4 lpm
4. Precisa oxigenoterapia a > 4 lpm pero taquipnea (> 22 rpm o disnea de reposo o de mínimos esfuerzos)
5. Precisa soporte no invasivo CPAP/BIPAP
6. Ventilación mecánica $PaO_2/FiO_2 > 150$
7. Ventilación mecánica $PaO_2/FiO_2 \leq 150$
8. Ventilación mecánica $PaO_2/FiO_2 \leq 150$ y pronó/ECMO

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 [Internet]. WHO Team 2003 [cited 2020 Nov 7]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>
2. WHO | Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). WHO [Internet] 2020 [cited 2020 Aug 11]; Available from: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>
3. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708–20.
4. Coronavirus (COVID-19) events as they happen [Internet]. [cited 2020 Nov 7]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
5. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. [cited 2020 Nov 8]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
6. Sridhar V, Patton M, Grimm K RM. Serologic testing of U.S. blood donations to identify SARS-CoV-2 reactive antibodies: December 2019-January 2020. *Ann Med* [Internet]. 2021; 72 (12): 1- 14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2020.1840620>
7. Fuk-Woo Chan J, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, Kai-Wang To K, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*. 2020; 29; 9 (1): 221-236. [cited 2020 Nov 1]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/>
8. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 [Internet]. Vol. 367, *Science*. 2020; 367, 1444-1448 [cited 2020 Nov 8]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164635/pdf/367_1444.pdf

9. WHO. World Health Organization. WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part (14 January-10 February 2021). Joint WHO-China Study Team report. 2021;(February):120.
10. Tsan-Yuk T, Na J, Ya-Wei Z, Marcus Ho S, Jia-Fu J, Hua-Chen Z, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 8];583(7815). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32218527/>
11. Alcamí A, Del Val M, Hernán M, Latassa P, Jiménez J.L, Querol X, et al. Informe científico sobre vías de transmisión SARS-CoV-2. Ministerio de Ciencia e Innovación de España. 2020.
12. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;(January):1–17.
13. Diagnosis and Treatment Protocol for Novel Coronavirus Pneumonia (Trial Version 7). *Chin Med Journ* [Internet]. 2020 May [cited 2020 Nov 8];133(9):1087–95. Available from: <http://journals.lww.com/10.1097/CM9.0000000000000819>
14. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England [Internet]. [cited 2021 Mar 20]. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/968581/Variants_of_Concern_VOC_Technical_Briefing_7_England.pdf
15. Tang T, Jaimes JA, Bidon MK, Straus MR, Daniel S, Whittaker GR. Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 Spike at the S1/S2 Boundary: Potential Role of Proteases beyond Furin. *ACS Infect Dis*. 2021;7(2):264–72.
16. Meyerowitz E, Richterman A, Bogoch I, Low N, Cevik M. Towards an Accurate and Systematic Characterization of Persistently Asymptomatic Infection with SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020;2(20):1–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30837-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30837-9)
17. Zunyou W, McGoogan J. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*

- [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 22];323(13). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32091533/>
18. Berenguer J, Ryan P, Rodríguez-Baño J, Jarrín I, Carratalà J, Pachón J, Yllescas M, Arribas JR TC-19@Spain SG. Characteristics and predictors of death among 4,035 consecutively hospitalized patients with COVID-19 in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2020;26 (11): 1525 – 1536.
 19. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2020 Nov 1];395(10223):497–506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31986264>
 20. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 22];395(10235):1517–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32311318>
 21. Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, Ruiz L, Invernizzi P, Cuzzoni MG, et al. Guillain-Barré Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 22];382(26):2574–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32302082>
 22. Shaigany S, Gnirke M, Guttmann A, Chong H, Meehan S, Raabe V, et al. An adult with Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 22];396(10246):e8–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32659211>
 23. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ* [Internet]. 2020;371:m3862. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33097561>
 24. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science (New York, NY)* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 8];367(6485):1444–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32132184>
 25. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-

- CoV-1. N Engl J Med [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2020 Nov 8];382(16):1564–7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2004973>
26. Qiu X, Nergiz AI, Maraolo AE, Bogoch II, Low N, Cevik M. Defining the role of asymptomatic and pre-symptomatic SARS-CoV-2 transmission – a living systematic review. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2021, 27 (4): 511-519 [cited 2021 Sept 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33484843/>
 27. Fears AC, Klimstra WB, Duprex P, Hartman A, Weaver SC, Plante KS, et al. Persistence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Aerosol Suspensions. Emerg Infect Dis [Internet]. 2020 Sep [cited 2020 Nov 8];26(9):2168–71. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/9/20-1806_article.htm
 28. Lu J, Gu J, Li K, Xu C, Su W, Lai Z, et al. COVID-19 Outbreak Associated with Air Conditioning in Restaurant, Guangzhou, China, 2020. Emerg Infect Dis [Internet]. 2020 Jul [cited 2020 Nov 8];26(11):2791-2793. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/7/20-0764_article.htm
 29. Jang S, Han SH, Rhee J-Y. Cluster of Coronavirus Disease Associated with Fitness Dance Classes, South Korea. Emerg Infect Dis [Internet]. 2020 Aug [cited 2020 Nov 8];26(8):1917–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32412896>
 30. WHO. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? [Internet]. [cited 2020 Nov 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-how-is-covid-19-transmitted>
 31. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA [Internet]. 2020 Mar 11 [cited 2020 Nov 8];323(18):1843–4. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762997>
 32. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Engl J Med [Internet]. 2020 Mar 19 [cited 2020 Oct 27];382(12):1177–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2001737>
 33. Rhee C, Kanjilal S, Baker M, Klompas M. Duration of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infectivity: When Is It Safe to Discontinue

- Isolation? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2020 Aug 25 [cited 2020 Nov 8]; 72 (8): 1467-1474. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33029620>
34. Appendix S, Ct R, Ct R, Ct R, Ct R, Host I, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *N Engl J Med* 2020;383 (23): 2291 – 2293.
 35. Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *J Virol*. 2012;86(6):2900–2910.
 36. Kasuga Y, Zhu B, Jang KJ, Yoo JS. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. *Exp Mol Med* [Internet]. 2021;53(5):723–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1>
 37. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14 ++CD16 + monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118(12).
 38. Lanuza PM, Pesini C, Arias MA, Calvo C, Ramirez-Labrada A, Pardo J. Recalling the Biological Significance of Immune Checkpoints on NK Cells: A Chance to Overcome LAG3, PD1, and CTLA4 Inhibitory Pathways by Adoptive NK Cell Transfer? *Front Immunol*. 2020;10(January): 3010.
 39. Lanier LL. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008;9(5):495–502.
 40. Baugh R, Khaliq H, Seymour LW. Convergent evolution by cancer and viruses in evading the nkg2d immune response. *Cancers*. 2020;12(12):1–27.
 41. Arias MA, Jiménez de Bagües MP, Aguiló N, Menao S, Hervás-Stubbs S, de Martino A, et al. Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Jul 24 [cited 2021 Sep 25];8(2):420–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017060>
 42. Garzón-Tituaña M, Arias MA, Sierra-Monzón JL, Morte-Romea E, Santiago L, Ramirez-Labrada A, et al. The Multifaceted Function of Granzymes in Sepsis: Some Facts and a Lot to Discover. *Front Immunol*. 2020;11(June):1–12.
 43. Garzón-Tituaña, Marcela, Sierra Monzón J.L., Comas I, Santiago Llipsy et al. Granzyme A inhibition reduces inflammation and increases survival during abdominal sepsis. *Theranostics*. 2021 Jan 30; 11 (8): 3781 – 3795.

44. Judge SJ, Murphy WJ, Canter RJ. Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb 13; 10: 49.
45. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Rev Immunol*. 2015;15(8):486–99.
46. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res*. 2014;59(1–3):118–28.
47. Sariol A PS. Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity*. 2020;(January):19–20.
48. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 15];183(4):996-1012.e19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33010815>
49. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant B, Liu W, Uhl S, Hoagland D, Moller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 2020;5(January):19–20.
50. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 6];20(10):1135–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32526193>
51. Borczuk AC, Salvatore SP, Seshan S v., Patel SS, Bussel JB, Mostyka M, et al. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. *Mod Pathol* [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2020 Nov 30];33(11):2156–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32879413>
52. Buonvino S, Melino S. New Consensus pattern in Spike CoV-2: potential implications in coagulation process and cell–cell fusion. *Cell Death Discov*. 2020;6(1):1–5.
53. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, et al. Impact of SARS-CoV-2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* [Internet]. [cited 2020 Dec

- 1]; 2020 Jun 30; ciaa851. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7337625/>
54. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: Retrospective cohort study. *The BMJ*. 2020;369(March):1–8.
 55. Païro-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick A, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in Covid-19. *Nature* [Internet]. 2020;17(8):25. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.20200048>
 56. Marconi VC, Palacios GMR, Hsieh L, Kline S, Tapson V, Iovine NM, et al. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *The New Engl J Med*. 2020;1–13.
 57. Li J-Y, Liao C-H, Wang Q, Tan Y-J, Luo R, Qiu Y, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Res* [Internet]. 2020 Jun 23 [cited 2020 Oct 27]; 286: 198074. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32589897>
 58. Kasuga Y, Zhu B, Jang KJ, Yoo JS. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. *Exp Mol Med* [Internet]. 2021;53(5):723–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1>
 59. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann H-H, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science (New York, NY)* [Internet]. [cited 2020 Dec 5]; 2020 Oct 23;370(6515): eabd4585 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32972996>
 60. 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 (New York, NY)* [Internet]. [cited 2020 Dec 5]; 2020 Oct 23;370(6515):eabd4570 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32972995>
 61. 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* [Internet]. 2016 Feb 10 [cited 2020 Nov 1];19(2):181–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867177>

62. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (New York, NY)* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 1];369(6504):718–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32661059>
63. Lokugamage KG, Schindewolf C, Menachery VD. SARS-CoV-2 sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv* [Internet]. 2020 Mar 9 [cited 2020 Nov 1];2020.03.07.982264. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.07.982264v1>
64. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* [Internet]. 2021; Feb 18; 184 (4): 861 – 880. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135907>
65. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 15];181(7):1489-1501.e15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32473127>
66. Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, Arevalo CP, Bolton MJ, Weirick ME, et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. *Nat Commun* [Internet]. [cited 2020 Nov 30]; 2021 Apr 1; 184 (7): 1858 – 1864.e10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33200143>
67. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2020 Nov 1];382(18):1708–20. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2002032>
68. 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* [cited 2020 Oct 22]; 2020 Sep 4; 360 (6508): eabc8511 Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
69. Sa Ribero M, Jouvenet N, Dreux M, Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. Stapleford K, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2020

- Jul 29 [cited 2020 Oct 27];16(7): e1008737. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
70. Mangalmurti N, Hunter CA. Cytokine Storms: Understanding COVID-19. Immunity [cited 2020 Nov 6]; 2020 Jul 14; 53 (1): 19-25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.017>
 71. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. Clin Infect Dis [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 3];71(8):1937–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32301997>
 72. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2020 Jul [cited 2020 Dec 3];146(1):128-136.e4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32425269>
 73. Marie D, Valle D, Kim-Schulze S, Huang H-H. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. Nature Med [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 20];26(3):1636–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
 74. Laing AG, Lorenc A, del Molino del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. Nature Med [Internet]. 2020 Oct 17 [cited 2020 Oct 22];26(10):1623–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-1038-6>
 75. Zhang C, Wu Z, Li J-W, Zhao H, Wang G-Q. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2020 May [cited 2020 Dec 3];55(5):105954. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32234467>
 76. RECOVERY Collaborative Group TRC, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. N Engl J Med

- [Internet]. 2021 Feb 25 [cited 2021 Mar 20];384(8):693–704. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32678530>
77. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 3]; 8: 1233. Available from: <https://doi.org/10.1016/>
 78. Kox M, Waalders NJB, Kooistra EJ, Gerretsen J, Pickkers P. Cytokine Levels in Critically Ill Patients With COVID-19 and Other Conditions. *JAMA* [Internet]. 2020 Oct 20 [cited 2020 Dec 3];324(15):1565. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2770484>
 79. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 22];584(7821):463–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32717743>
 80. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* [Internet]. 2020;1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32871063>
 81. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Faliti CE, Ramirez SI, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for greater than six months after infection. *bioRxiv* [Internet]. 2020 Nov 16 [cited 2020 Dec 5];2020.11.15.383323. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.15.383323v1>
 82. Baumgarth N, Nikolich-Zugich J, Lee FE-H, Bhattacharya D. Antibody Responses to SARS-CoV-2: Let’s Stick to Known Knowns. *J Immunol (Baltimore, Md : 1950)* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 15];205(9):2342–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32887754>
 83. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet* [Internet]. 2020;396(10262):1595–606. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32137-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32137-1)

84. Horby PW, Mafham M, Peto L, Campbell M, Pessoa-Amorim G, Spata E, et al. Casirivimab and imdevimab in patients admitted to 4 hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, 5 controlled, open-label, platform trial. medRxiv. 2021.
85. Reinfection with SARS-CoV-2: considerations for public health response [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 5]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Re-infection-and-viral-shedding-threat-assessment-brief.pdf>
86. Qureshi AI, Baskett WI, Huang W, Lobanova I, Hasan Naqvi S, Shyu C-R. Reinfection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Patients Undergoing Serial Laboratory Testing. Clin Infect Dis. 2021 Apr 25; ciab345.
87. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in covid-19 pneumonia. J Infect Dis. 2020;221(11):1762–9.
88. 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(May):1–7.
89. Datta PK, Liu F, Fischer T, Rappaport J, Qin X. SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy. Theranostics [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 5];10(16):7448–64. Available from: <http://www.thno.org7448Theranostics://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
90. Zhang Z, Guo L, Lu X, Zhang C, Huang L, Wang X, et al. Clinical analysis and pluripotent stem cells-based model reveal possible impacts of ACE2 and lung progenitor cells on infants vulnerable to COVID-19. Theranostics [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 5];11(5):2170–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33500718>
91. Zhang Z, Guo L, Huang L, Zhang C, Luo R, Zeng L, et al. Distinct disease severity between children and older adults with COVID-19: Impacts of ACE2 expression, distribution, and lung progenitor cells. Clin Infect Dis [Internet]. [cited 2021 Oct

- 5]; 2021 Jan 3; ctaa1911. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33388749>
92. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* [Internet]. 2015;479–480:180–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.033>
 93. 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):1–17.
 94. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(5):541–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0401-3>
 95. Saheb Sharif-Askari N, Saheb Sharif-Askari F, Mdkhana B, al Heialy S, Alsafar HS, Hamoudi R, et al. Enhanced expression of immune checkpoint receptors during SARS-CoV-2 viral infection. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 2021;20(March):109–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.002>
 96. Rha MS, Jeong HW, Ko JH, Choi SJ, Seo IH, Lee JS, et al. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity*. 2021;54(1):44-52. e3.
 97. Erickson J, Lu P, Wen S, Hastings A, Gilchuk P, Joyce S, Shyr Y WJ. Acute viral respiratory infection rapidly induces a CD8 T cell exhaustion-like phenotype. *J Immunol*. 2015;195(9):4319–30.
 98. Gay CL, Bosch RJ, Ritz J, Hataye JM, Aga E, Tressler RL, et al. Clinical trial of the anti-PD-L1 antibody BMS-936559 in HIV-1 infected participants on suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2017;215(11):1725–33.
 99. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunol*. 2008;9(5):503–10.
 100. Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, Aleman S, Cornillet M, Hertwig L, et al. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Science Immunol*. 2020;5(50):1–14.

101. Badgwell B, Parihar R, Magro C, Dierksheide J, Russo T, Carson WE. Natural killer cells contribute to the lethality of a murine model of Escherichia coli infection. *Surgery*. 2002;132(2):205–12.
102. 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* [Internet]. 2020;17(5):533–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
103. Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S. Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *J Immunol (Baltimore, Md: 1950)* [Internet]. 1999;162(4):2154–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973490>
104. Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chida S, Tezuka H, Hara H, et al. CXCL10-CXCR3 Enhances the Development of Neutrophil-mediated Fulminant Lung Injury of Viral and Nonviral Origin. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Jan 5 [cited 2021 Jul 25];187(1):65–77. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201203-0508OC>
105. Herzig DS, Luan L, Bohannon JK, Toliver-Kinsky TE, Guo Y, Sherwood ER. The role of CXCL10 in the pathogenesis of experimental septic shock. *Crit Care* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 25];18(3): R113. Available from: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc13902>
106. Seyoum B, Yano M, Pirofski L. The innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the lung depends on serotype and host response. *Vaccine* [Internet]. 2011 Oct 19 [cited 2021 Jul 25];29(45):8002–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X11013107>
107. Arias M, Martínez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo J. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends cancer* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 5];3(6):407–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28718416>
108. Boivin WA, Cooper DM, Hiebert PR, Granville DJ. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: Challenging the dogma. *Lab Invest*. 2009;89(11):1195–220.

109. Hiroyasu S, Zeglinski MR, Zhao H, Pawluk MA, Turner CT, Kasprick A, et al. Granzyme B inhibition reduces disease severity in autoimmune blistering diseases. *Nature Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20604-3>
110. van den Borne P, Quax PHA, Hoefer IE, Pasterkamp G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *BioMed Res Int*. 2014;2014: 893106.
111. Id AR, Shanjana Y, Tushar I, Mahmud T, Rahman MS, Milan ZH, et al. Hematological abnormalities and comorbidities are associated with COVID-19 severity among hospitalized patients: Experience from Bangladesh. *PLoS ONE* [Internet]. 2021;16(7):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0255379>
112. Carvalho T, Krammer F, Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021; Apr; 21 (4): 245 -256. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33723416>