



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE DE LINFOCITOS T Y B EN
SUJETOS VACUNADOS CON LA VACUNA ABDALA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

YAN CARLOS ALVARADO ALVARADO

ASESOR

LORENZO ISLAS VÁZQUEZ



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. LÓPEZ GONZÁLEZ JOSÉ SULLIVAN
VOCAL: DR. LÓPEZ MACÍAS CONSTANTINO III ROBERTO
SECRETARIO: DR. ISLAS VÁZQUEZ LORENZO
1er. SUPLENTE: DRA. PERÉZ TAPIA SONIA MAYRA
2º SUPLENTE: QFB. RAMÍREZ CARRETO RICARDO JAIR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN,
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA “F.A.P.
CONDE DE VALENCIANA I.A.P.”

ASESOR DEL TEMA:

LORENZO ISLAS VÁZQUEZ

SUSTENTANTE (S):

YAN CARLOS ALVARADO ALVARADO

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
SARS-CoV-2 y su patogénesis	1
Transmisión de la infección por SARS-CoV-2	2
Presentación clínica y síntomas de la infección por SARS-CoV-2	2
Diagnóstico de COVID-19	3
Respuesta inmune innata contra SARS-CoV-2	3
Mecanismo de evasión del SARS-CoV-2	4
Respuesta inmune adaptativa contra SARS-CoV-2	5
Memoria inmunológica contra SARS-CoV-2	6
Tratamientos contra COVID-19	7
Vacunas contra SARS-CoV-2	9
Vacuna Abdala	11
<i>ANTECEDENTES</i>	12
<i>JUSTIFICACIÓN</i>	15
<i>HIPÓTESIS</i>	16
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	17
Objetivos Particulares.	17
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	18
Material Biológico.	18
Criterios de selección de los sujetos de estudio.	19
Consumo de anticuerpos en presencia de la proteína RBD del SARS-CoV-2.	19
Determinación de IgG anti-RBD en suero mediante ELISA.	19
Ensayo de estimulación con la proteína RBD del SARS-CoV-2 a partir de sangre periférica.	20
Fenotipificación de las poblaciones celulares.	20
Tinción de membrana.	21
Adquisición y análisis de datos por citometría de flujo multiparamétrica.	21
Determinación de IL-2 e IFN- γ en sobrenadante.	23
Análisis Estadístico.	23
<i>RESULTADOS</i>	24
Población de estudio.	24

Densidad óptica de anticuerpos neutralizantes IgG anti-RBD inducida por la vacuna Abdala.	24
Porcentaje de linfocitos B, linfocitos B de memoria y memoria efectora posterior a la aplicación de la vacuna Abdala.	25
Porcentaje de linfocitos Th, linfocitos TFH, linfocitos T de memoria central y efectora inducido por la vacuna Abdala.	26
Densidad óptica de anticuerpos IgG anti-RBD neutralizantes posterior a un encuentro con la proteína RBD recombinante.	28
Porcentaje de plasmablastos posterior a un estímulo con la proteína RBD recombinante.	28
Porcentaje de linfocitos T activados y producción de IL-2 e IFN-γ posterior a un estímulo con la proteína RBD recombinante.	29
<i>DISCUSIÓN</i>	31
<i>CONCLUSIÓN</i>	35
<i>FUENTES BIBLIOGRÁFICAS</i>	36
<i>ANEXO 1</i>	45
<i>ANEXO 2</i>	46

INTRODUCCIÓN

La enfermedad COVID-19 es un problema de salud pública que ocasionó una pandemia a nivel mundial, la cual causó aproximadamente 7 millones de muertes y 700 millones de casos confirmados alrededor del mundo **(1)**, siendo las personas mayores de 50 años las más susceptibles a cursar un estado grave de la enfermedad, mayor ingreso hospitalario e incluso alta tasa de mortalidad **(2)**. Los desarrollos de vacunas actuales y particularmente contra COVID-19 lograron disminuir el número de casos y de muertes a nivel mundial, al demostrar una eficacia en el desarrollo de protección inmunológica mediante la producción de anticuerpos. Sin embargo, las constantes mutaciones que sufre el virus causal desarrollan nuevas variantes con mecanismos de evasión más eficaces que han traído como consecuencia rebrotes de la enfermedad **(3)**.

SARS-CoV-2 y su patogénesis

La enfermedad COVID-19 es causada por el coronavirus de tipo II del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). El virus es un virus envuelto con un genoma de RNA monocatenario (ssRNA) de sentido positivo de aproximadamente 26-32 kilobases de longitud que pertenece a la familia *Coronaviridae* y al género *Betacoronavirus* **(3)**. Entre los *Betacoronavirus*, se encuentra el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV), los cuales presentan una homología genómica y estructural con el SARS-CoV-2 del 79% y 50% respectivamente. Estos virus se caracterizan por infectar exclusivamente a mamíferos, ocasionando enfermedades respiratorias de leves a moderadas y enfermedades entéricas en humanos **(4)**. La estructura del SARS-CoV-2 consiste en una cubierta central conformada por la nucleocápside que protege el RNA del genoma viral y una superficie o envoltura externa que se asemeja a una corona solar basada en sus 4 principales proteínas estructurales: espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) **(3)**.

La proteína S está conformada por 2 subunidades denominadas S1 y S2. La subunidad S1 interacciona y se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la membrana celular mediante el dominio de unión al receptor (RBD), mientras que la subunidad S2 determina la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula huésped, permitiendo la entrada viral a la célula huésped. La proteína M es la más abundante de las proteínas estructurales y mantiene tanto la curvatura de la membrana como la unión con la nucleocápside. La proteína E ayuda en el ensamblaje y liberación del virus, mientras que la proteína N es el componente de la nucleocápside que incluye el RNA del genoma **(5)**.

La patogénesis del COVID-19 se basa en la unión del SARS-CoV-2 a las células epiteliales de las cavidades orales y/o nasales mediante la unión de la proteína S con el receptor ACE2. La captación y entrada viral incrementa al escindir la proteína S mediante una enzima proteasa denominada serina proteasa transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), lo cual contribuye a la separación de la unión RBD de la subunidad S1 con el receptor ACE2 y a la posterior fusión de las membranas que facilita el ingreso por endocitosis al citoplasma (4). Al ingresar, la nucleocápside del virus se libera y permite la salida del RNA viral que actúa como mRNA para la traducción de sus 4 proteínas estructurales (S, M, E y N) y 16 proteínas no estructurales (nsp 1-16), así como también sirve de molde para replicar su RNA que se asocia con la proteína N para la formación de la nucleocápside. Las proteínas virales S, E, M y sus proteínas no estructurales se elaboran en las membranas del retículo endoplásmico y posteriormente, junto con la proteína N, se transportan y ensamblan en el complejo de Golgi formando nuevas partículas víricas que se fusionan con la membrana plasmática, liberándose por exocitosis para infectar nuevas células (5).

Transmisión de la infección por SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se transmite a través de gotas respiratorias desprendidas de portadores asintomáticos y sintomáticos al hablar, toser o estornudar (contacto directo) o mediante el contacto con superficies u objetos contaminados con el virus (contacto indirecto), siendo el medio más frecuente de transmisión a través de portadores (2). Además, se han documentado otras vías de transmisión a través de la superficie ocular y de muestras fecales en las que se ha identificado la presencia prolongada del RNA viral del SARS-CoV-2 (6). El periodo de incubación del SARS-CoV-2 en la persona infectada es de 2 a 7 días, el 97.5% de las personas infectadas presentan síntomas dentro de los 11.5 días posteriores a la infección (2), llegando a desarrollar síntomas graves de la enfermedad a los 8 días posteriores al inicio de la sintomatología. El periodo de recuperación de los pacientes que cursaron COVID-19 es de 15 días posteriores al inicio de síntomas (4).

Presentación clínica y síntomas de la infección por SARS-CoV-2

Con base en su severidad el COVID-19 se clasifica en leve, moderado y grave o severo, en una enfermedad de COVID-19 leve a moderada los síntomas más comunes son la presencia de fiebre, tos seca, dificultad para respirar, fatiga, mialgias, náuseas/vómito o diarrea, dolor de cabeza, cambios en el gusto u olfato, debilidad y rinorrea, mientras que en una enfermedad de COVID-19 grave o severo son neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión hepática aguda, lesión cardíaca, daño renal agudo y enfermedad cerebrovascular aguda. Además, existen anomalías radiográficas y de

laboratorio como son la linfopenia, marcadores inflamatorios elevados (Proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6)) y parámetros de coagulación anormales (tiempo de protrombina elevado, trombocitopenia, dímero D elevado y fibrinógeno bajo) **(2)**.

En casos graves de COVID-19, cuando existe un aumento de la replicación viral superior a la respuesta inmune, la integridad de la barrera epitelio-endotelial se compromete y el SARS-CoV-2 infecta a los neumocitos alveolares tipo II del tracto respiratorio provocando su apoptosis, que da lugar a la liberación de grandes cantidades del SARS-CoV-2 causando tanto un daño alveolar difuso como una respuesta inflamatoria incrementada, principalmente por macrófagos y neutrófilos, que inducen una tormenta de citocinas o síndrome de liberación de citocinas (SLC) provocando un deterioro en el intercambio de gases, que conducen al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) de fase temprana característico de los SARS-CoV y el deterioro de otros órganos principales como los riñones, el hígado, el bazo, el cerebro, el intestino y el tracto urinario. De esta manera, la gravedad de la enfermedad dependerá de la carga viral producida durante el periodo de incubación del virus, la eficacia en el mecanismo de infección y la respuesta inmune que produce cada individuo, la cual modifica su funcionamiento y desarrollo debido a diversos factores **(5)**, como es el caso de la edad, principalmente el envejecimiento, que ocasiona modificaciones y/o alteraciones en el sistema inmune, denominándose a este fenómeno como inmunosenescencia **(7)**.

Diagnóstico de COVID-19

El diagnóstico temprano de COVID-19 es fundamental para controlar su propagación, por lo que se utilizan diversas metodologías para llevar a cabo este proceso. El estudio de elección más utilizado es la tomografía computarizada de tórax que identifica rápidamente a un paciente con COVID-19 al observar opacidades en vidrio despolido o esmerilado multilobulares bilaterales con una distribución periférica o posterior **(2)**. Otra metodología es la prueba de antígenos que detecta las proteínas N, E o S a través de una muestra nasofaríngea. Sin embargo, el método de detección estándar y universal para COVID-19 es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) a través de una muestra nasofaríngea, una muestra faríngea o incluso de saliva **(4)**.

Respuesta inmune innata contra SARS-CoV-2

La respuesta inmune contra el SARS-CoV-2 comienza con la inmunidad innata a través de la interacción entre los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) del virus (principalmente la proteína S y el genoma viral) y

los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). La principal familia de PRR que reconocen RNA viral en los endosomas son los receptores tipo Toll (TLR), específicamente TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, mientras que el RNA viral del citoplasma es reconocido por los receptores similares del ácido retinoico inducible del gen I (RIG-I) o también denominados receptores tipo RIG-I (RLRs) **(8)**, los cuales activan vías de señalización y factores de transcripción como son el factor nuclear kappa B (NFkB) y la proteína activadora (AP-1) que estimulan la producción de proteínas involucradas en la inflamación, tales como TNF- α , citocinas (IL-1, IL-6 e IL-12) y quimiocinas (CCL2 y CXCL8), así como el factor regulador del interferón 3 y 7 (IRF-3 e IRF-7) que promueven la activación de respuestas antivirales mediadas por interferón tipo I (IFN-I). El IFN-I suprime la replicación y diseminación viral en etapas tempranas y actúa como vínculo entre la respuesta inmune innata y la activación de la respuesta inmune adaptativa, siendo producido por células dendríticas plasmacitoides (pDC) que se encuentran en la sangre y en la mucosa **(5)**.

Así mismo, el sistema inmune innato cuenta con linfocitos efectores denominados células asesinas naturales (NK) que secretan perforina, granzima B y citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-3, IL-8, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)) para la eliminación de células infectadas por el SARS-CoV-2 en los primeros días de la infección, así como posterior a un contacto con el agente viral estas células se unen a las IgG mediante el mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La ADCC es un mecanismo indirecto de las células NK caracterizado por la formación de inmunocomplejos a través de la unión y recubrimiento de anticuerpos de clase IgG, específicamente las subclases IgG1 e IgG3, en las células infectadas, a los cuales se adhieren las células NK mediante su receptor CD16 y liberan por exocitosis gránulos que eliminan a dichas células **(9)**. La activación exitosa de la respuesta inmune innata limita la entrada, traducción, replicación y ensamblaje del virus, lo que favorece el desarrollo temprano de la respuesta inmune adaptativa y por lo tanto, la identificación y eliminación de las células infectadas. Sin embargo, el SARS-CoV-2 presenta un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que retrasa la respuesta inmune innata **(5)**.

Mecanismo de evasión del SARS-CoV-2

El mecanismo de evasión del SARS-CoV-2 se basa en bloquear la producción y función de las respuestas antivirales inducidas por el IFN-I a través de sus proteínas polifuncionales estructurales, no estructurales y adicionales. El SARS-CoV-2 inhibe la síntesis de IFN en ribosomas y su transporte transmembranal para inhibir los efectos antivirales tempranos. Posteriormente, las proteínas no estructurales modifican el RNA viral para evitar que sea reconocido por PRR y bloquean la síntesis de PRR, mientras que las proteínas

estructurales M y N se unen e inhiben a los receptores similares a RIG-I y se inhibe la activación de IRF3, provocando una disminución en la producción de IFN-I e IFN-III. Finalmente, inhiben directamente la expresión de genes estimulados por IFN (ISG) que producen el estado antiviral. De esta manera, el SARS-CoV-2 evade y retrasa la respuesta inmune innata ocasionando que no se active la respuesta inmune adaptativa y por lo tanto, el virus se replica constantemente **(8)**.

Respuesta inmune adaptativa contra SARS-CoV-2

Al actuar la respuesta inmune innata, los antígenos virales del SARS-CoV-2 son captados y procesados por células presentadoras de antígeno profesionales (APC) formando péptidos que son presentados mediante moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) a linfocitos T cooperadores (CD4+), las APC expresan moléculas de co-estimulación y secretan citocinas como IL-12 e IFN- γ que promueven la polarización hacia linfocitos T cooperadores 1 (Th1) e IL-4 e IL-21 que promueven la polarización a linfocitos T foliculares (TFH). Los linfocitos TFH interactúan con los linfocitos B de centros germinales y a través de la producción de IL-21, llevan a cabo la maduración de las células B y la diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos neutralizantes con alta afinidad y de larga vida. Los linfocitos Th1 producen IL-2 e IFN- γ y junto con la interacción de las APC, los linfocitos T citotóxicos (CD8+) reconocen moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) y con la subsecuente coestimulación de CD80/86 se activan. Los linfocitos T CD8+ activados inducen la apoptosis de las células infectadas por el SARS-CoV-2 mediante la unión del ligando de FAS (FasL) con su receptor (Fas) **(10)**. Por otra parte, los linfocitos B al actuar como APC pueden reconocer y captar la proteína S del SARS-CoV-2 para presentarla en forma de péptidos a los linfocitos Th1, diferenciándose mediante las moléculas de co-estimulación CD40L/CD40 a células plasmáticas secretoras de anticuerpos neutralizantes, que inhiben la entrada del virus en las células sanas y llevan a cabo su eliminación **(10)**.

Después de llevar a cabo la eliminación del virus y superar la infección, los linfocitos que llevaron a cabo su función son eliminados por apoptosis para regular la respuesta inmune y un conjunto de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B y anticuerpos neutralizantes específicos al SARS-CoV-2 se conservan para activar de manera más rápida la respuesta inmune en un segundo contacto y controlar la infección, denominándose a esta característica de la inmunidad adaptativa como memoria inmunológica **(10)**.

Memoria inmunológica contra SARS-CoV-2

La memoria inmunológica es la capacidad del sistema inmune adaptativo de reconocer y activar de manera más rápida la respuesta inmune en contra de un patógeno previamente reconocido, siendo la base de la inmunidad protectora proporcionada por infecciones previas y por la vacunación. Se desarrolla en 4 componentes principales de la inmunidad adaptativa que están conformados por los linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B y anticuerpos circulantes **(11)**.

Los linfocitos T de memoria, ya sean T CD4+ o T CD8+, amplifican la respuesta inmune en contra de un patógeno en un periodo de tiempo corto, mientras que las clonas de los linfocitos B de memoria se dividen más rápido y producen anticuerpos con una mayor afinidad, en comparación a los linfocitos que no han reconocido a su antígeno específico denominándose como linfocitos T y B naive. Así mismo, los linfocitos T y B de memoria que presentan el receptor de quimiocinas CCR7 migran a los ganglios linfáticos, producen respuestas proliferativas muy rápidas y generan una gran cantidad de células efectoras al encontrarse nuevamente con el antígeno, denominándose células de memoria central, mientras que las células T y B de memoria que carecen de CCR7 migran al sitio de inflamación en tejidos periféricos y representan una población de células efectoras que producen citocinas o presentan características citotóxicas para responder rápidamente ante un reencuentro con el antígeno, denominándose células de memoria efectora **(11)**.

La producción de este tipo de poblaciones con el fenotipo de memoria se da a partir de una infección (inmunidad natural), vacunación o inmunidad híbrida conformada por la combinación de la inmunidad inducida posterior a una infección y la inmunidad inducida por la vacunación **(11)**.

En el caso de la infección previa, se produce una memoria inmunitaria robusta que incluye los 4 componentes de la inmunidad adaptativa. Con respecto a la vacunación, se producen niveles altos de los 4 componentes de la inmunidad adaptativa con fenotipo de memoria. Sin embargo, dichos niveles disminuyen durante un periodo de tiempo corto, generalmente de meses. Finalmente, la inmunidad híbrida, produce un incremento de la memoria inmunológica basada en los 4 componentes de la inmunidad adaptativa, principalmente los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos contra el patógeno causal de la infección previa, manteniendo dicha memoria inmunológica a lo largo del tiempo mediante la vacunación **(11)**.

En COVID-19, la infección previa proporciona aproximadamente 80% a 95% de protección contra las reinfecciones sintomáticas de COVID-19 durante más de 8 meses para la cepa silvestre del SARS-CoV-2. De esta manera, la memoria

inmunológica es una parte fundamental de la respuesta inmune para controlar la enfermedad de COVID-19 y disminuir el número de reinfecciones **(11)**.

Tratamientos contra COVID-19

Los tratamientos que se han utilizado y estudiado para combatir la enfermedad de COVID-19 son muy diversos. Sin embargo, la mayoría se basan en la inhibición del SARS-CoV-2 dependiendo de la etapa en que se encuentre su replicación viral.

Medicamentos para inhibir la entrada del virus:

- a) **Umifenovir (Arbidol):** Es un medicamento aprobado en China y Rusia para el tratamiento de la influenza y otras infecciones virales respiratorias, el cual ha demostrado en experimentos *in vitro* que tiene actividad contra el SARS-CoV-2 al inhibir la interacción entre la proteína S y el receptor ACE2 y evitar la fusión de membranas **(12,13)**. Sin embargo, otros estudios clínicos demostraron que este tratamiento no mejora el pronóstico ni acelera la eliminación del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 leve a moderado **(14,15)**.
- b) **Mesilato de Camostat:** Medicamento aprobado en Japón para el tratamiento de la pancreatitis y la esofagitis por reflujo postoperatorio, el cual se ha demostrado en estudios en ratones silvestres (WT) infectados con una cepa de SARS-CoV que puede evitar el ingreso del virus a las células al bloquear la actividad de TMPRSS2 y así proteger de la infección letal con SARS-CoV **(16,17)**. Con respecto al SARS-CoV-2, un estudio reveló que bloquea la entrada del virus en las células pulmonares humanas, por lo que es considerado un potencial fármaco antiviral frente a la enfermedad de COVID-19 **(18)**.

Medicamentos para inhibir la replicación del virus:

- a) **Remdesivir:** Medicamento de primera línea para el tratamiento de adultos y adolescentes con neumonía que requieren oxígeno suplementario, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado su actividad contra el SARS-CoV-2, específicamente inhibiendo a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) **(19)**, la cual es una enzima crucial en el ciclo de vida del virus tanto en la replicación del genoma viral como en la transcripción **(20)**. En estudios clínicos, se demostró que este tratamiento acorta el tiempo de recuperación en adultos hospitalizados por COVID-19 grave **(4)**.
- b) **Favilavir:** Medicamento antiviral desarrollado en Japón para tratar la influenza y ha sido aprobado en Rusia, China e India para el tratamiento de COVID-19, debido a que un estudio clínico en China reportó una reducción significativa de los signos de la enfermedad observados

mediante imágenes de tórax y acortó el tiempo de eliminación del virus (21), presentando una mejoría clínica del 87.8% y 60.3% en pacientes con COVID-19 leve y grave a los 14 días, respectivamente (22). Sin embargo, el tamaño de muestra en el estudio fue pequeño, por lo que se deben llevar a cabo ensayos controlados aleatorios a gran escala (4).

Agentes inmunomoduladores:

- a) **Dexametasona:** Corticosteroide que se usa en una amplia gama de afecciones para aliviar la inflamación a través de sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, el cual en un ensayo de recuperación demostró reducir la mortalidad en un 33% de los pacientes hospitalizados por COVID-19 que recibieron ventilación mecánica invasiva y en un 20% de pacientes que recibieron oxígeno (23).
- b) **Tocilizumab y Sarilumab:** Anticuerpos específicos del receptor de la interleucina-6 (IL-6), usados anteriormente para la artritis, demostraron en un ensayo no controlado ser efectivos para combatir el COVID-19 grave al atenuar la tormenta de citocinas (24).
- c) **Eculizumab:** Anticuerpo monoclonal específico que inhibe la proteína proinflamatoria C5 del complemento, demostró en resultados preliminares una caída de los marcadores inflamatorios y los niveles de proteína C reactiva, por lo cual sugiere ser una opción para el tratamiento de COVID-19 grave (25).
- d) **Interferón de tipo I (IFN I):** Datos *in vitro* mostraron que el SARS-CoV-2 es muy sensible al IFN de tipo I, por lo que sugiere una eficacia potencial en el tratamiento temprano del COVID-19 (26). Además, la inhalación de vapor de lopinavir/ritonavir combinado con IFN- α está incluida en la pauta de tratamiento del COVID-19 (27).

Otra estrategia es bloquear la unión de la proteína S al receptor ACE2 mediante hACE2 recombinante soluble, anticuerpos monoclonales específicos o inhibidores de fusión que se dirigen a la proteína S (28–30).

Así mismo, se han utilizado terapias complementarias que tienen como finalidad acortar el tiempo de recuperación entre las cuales se encuentra el plasma de donadores convalecientes de COVID-19 y las inmunoglobulinas hiperinmunes. Sin embargo, pueden ocasionar diversos efectos adversos (aumento de la infección mediado por anticuerpos, lesión pulmonar aguda asociada a la transfusión y reacciones alérgicas a la transfusión) o tienen una disponibilidad limitada debido al alto costo para su desarrollo (2).

Actualmente, dentro de los tratamientos farmacológicos principales para COVID-19 se encuentran el uso de antivirales como el remdesivir que mejora el tiempo de recuperación entre 11 a 15 días en pacientes sin ventilación mecánica, el uso de agentes antiinflamatorios como la dexametasona que

reduce la mortalidad a los 28 días de tratamiento en pacientes con COVID-19 grave que requieren oxígeno suplementario y en pacientes con una duración de los síntomas mayor a los 7 días, el uso de anticoagulantes (heparina), inmunomoduladores (tocilizumab, sarilumab, anakinra, ruxolitinib) y antifibróticos (inhibidores de la tirosina cinasa). La asignación de un tratamiento depende de la etapa de la infección y sus complicaciones, siendo los inhibidores virales los más efectivos al principio de la infección, mientras que los agentes inmunomoduladores son más efectivos en pacientes hospitalizados para prevenir la progresión de la enfermedad y los anticoagulantes son efectivos para prevenir complicaciones tromboembólicas. Sin embargo, este tipo de tratamientos únicamente alivian los síntomas o ayudan en una recuperación temprana del paciente, pero no generan una protección inmunológica contra el SARS-CoV-2, por lo que la alternativa clínica principal para disminuir el número de infecciones y la gravedad por COVID-19 a través de la generación de protección inmunológica por anticuerpos y células de memoria específicas contra SARS-CoV-2 son las vacunas (2).

Vacunas contra SARS-CoV-2

Las vacunas tienen como objetivo principal estimular el sistema inmune a través de la administración del agente causal o antígenos asociados a una determinada enfermedad para la producción de una respuesta inmune robusta, específica y efectiva contra dicho agente, logrando así controlar o reducir los efectos patológicos de la enfermedad (31).

Desde el comienzo de la pandemia de COVID-19, una gran diversidad de vacunas han entrado en proceso de desarrollo biofarmacéutico enfocadas en contra de la proteína S del SARS-CoV-2, aprobándose para su uso en la población general después de establecer su seguridad y eficacia. La eficacia se refiere al grado en que una vacuna previene la infección sintomática o en algunos casos, la infección asintomática de una determinada enfermedad; en el caso de las vacunas de COVID-19 el grado en que previene la infección sintomática, principalmente el estado grave y la mortalidad de la enfermedad dentro de un ensayo clínico controlado, mientras que para el caso de la protección generada por la vacuna en la población en general el término utilizado es efectividad (32).

Las vacunas contra COVID-19 se diferencian por el tipo de plataforma utilizada para su desarrollo, las cuales son las siguientes:

- a) **Virus Inactivado:** Son virus completos que no infectan células y no pueden replicarse (32). Se producen *in vitro* inactivando el SARS-CoV-2 purificado con formaldehído y mezclándolo con un adyuvante como alumbre, generando un amplio repertorio de epítopos de células T. Sin embargo, presentan menor inmunogenicidad debido a la alteración de la

estructura del antígeno por el proceso de fijación, así como dificultades en el proceso de producción y riesgo de infección, asociados con la inactivación incompleta del virus **(33)**. Entre las vacunas de virus inactivado aprobadas se encuentra la vacuna Sinovac (Coronavac) y Covaxin (BBV152Covaxin) que presentaron una eficacia del 50.6% al 92.3% contra el SARS-CoV-2 **(32)**.

- b) **Nanopartículas de subunidades de proteína:** Se producen mediante la incorporación de la proteína S recombinante o el dominio RBD de la proteína S purificada en micelas de polisorbato 80 con la adición del adyuvante basado en saponina Matrix-M, logrando así generar una sólida inmunidad humoral y mediada por células **(33)**. Por ejemplo, la vacuna Novavax (Covovax o NVX-CoV2373) presentó una eficacia del 89% al 91.6% contra la cepa silvestre del SARS-CoV-2 **(32)**.
- c) **Vectores adenovirales recombinantes no replicantes:** Son sistemas de administración que contienen ácidos nucleicos que codifican un antígeno **(32)**. Utilizan tecnologías de terapia génica para la producción de la proteína S como antígeno en las células huésped **(33)**. Las principales vacunas aprobadas de este tipo de plataforma son Cansino (Ad5-nCoVcovidecia), AstraZeneca (AZD1222Covishield) y Sputnik V (Gam-COVID-Vac), las cuales presentaron una eficacia del 65% al 91.6% contra la cepa silvestre del SARS-CoV-2 **(32)**. La vacuna AstraZeneca induce la seroconversión de anticuerpos IgG específicos contra el dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 a los 14 y 28 días **(34)**. La vacuna Janssen (Ad26.COV2-S) presentó una eficacia del 69.4% **(32)** e induce la producción de anticuerpos de clase IgG neutralizantes contra el dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 a los 29 días **(35)**.
- d) **RNA:** Se basan en mRNA con la información genética para la síntesis de la proteína S. El mRNA es encapsulado en nanopartículas lipídicas (principalmente lípidos de polietilenglicol y colesterol) que contribuyen a controlar el tamaño, la forma y la estabilidad de la proteína vírica sintetizada **(32,33)**. Las vacunas Pfizer-BioNTech (BNT162b2) y Moderna (mRNA-1273) fueron las primeras vacunas basadas en mRNA autorizadas, presentando una eficacia superior al 90% contra la cepa silvestre del SARS-CoV-2 **(32)**, induciendo la seroconversión de anticuerpos IgG específicos contra la proteína S del SARS-CoV-2 a los 21 y 28 días, respectivamente **(36,37)**.

La protección inmunológica que inducen las vacunas contra SARS-CoV-2 se produce a partir de la administración vía intramuscular de cualquier vacuna mencionada anteriormente, en donde el antígeno (generalmente la proteína S) es capturado por APCs como lo son las células dendríticas, que se activan a través de la interacción con los PRR. Las células dendríticas activadas se trasladan hacia los ganglios linfáticos y a través de las moléculas MHC-I y

MHC-II presentan el péptido antigénico a los linfocitos T CD4+ y a los linfocitos T CD8+, respectivamente. Por lo tanto, las células dendríticas activan las células T CD4+ y T CD8+ que comienzan a diferenciarse en diversas subpoblaciones de linfocitos T y de esta manera, interactuar con las células B para el desarrollo de células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos y con una elevada afinidad por la proteína de la vacuna. Además de la generación de células efectoras, las vacunas desarrollan células de memoria para una protección ante un reencuentro con el SARS-CoV-2 **(38)**.

Vacuna Abdala

En el año 2022, Cuba presentó su primera vacuna basada en una plataforma subunitaria de proteína recombinante denominada “Abdala”, la cual fue desarrollada utilizando la levadura *Pichia pastoris* como microorganismo de expresión y el gel de hidróxido de aluminio como adyuvante. Su formulación incluye el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína recombinante del SARS-CoV-2. En cuestión de eficacia, se demostró una alta efectividad para prevenir enfermedades graves y la muerte por COVID-19 en la población cubana **(39)**. Recientemente, a principios del 2023, en México se aprobó su uso como dosis de refuerzo en la población mexicana. Sin embargo, se desconoce si induce una protección inmunológica en contra del SARS-CoV-2, por lo que se requieren llevar a cabo estudios de calidad que permitan conocer la eficacia de la vacuna Abdala como dosis de refuerzo **(40)**. Por lo tanto, en México las vacunas aprobadas son Sinovac (Coronovac), Covaxin (BBV152Covaxin), AstraZeneca (AZD1222Covishield), Sputnik V (Gam-COVID-Vac), Cansino (Ad5-nCoVcovidecia), Janssen (Ad26.COVID-S), Moderna (mRNA-1273), Pfizer-BioNTech (BNT162b2) y Abdala **(40)**.

ANTECEDENTES

A partir del 2020, nuestra comprensión del SARS-CoV-2 y del COVID-19 ha evolucionado rápidamente, principalmente en la comprensión de la respuesta inmune que se produce en contra de este patógeno **(41)**. En diversos estudios se examinó la respuesta de los linfocitos T CD4+ en contra de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes de COVID-19, reportando respuestas de células T CD4+ en contra de las proteínas S, N y M, siendo la proteína S el antígeno en inducir una respuesta inmune fuerte mediada por linfocitos T CD4+ **(42–45)**, lo cual ayudó en el desarrollo de la mayoría de las vacunas contra SARS-CoV-2, ya que dicha proteína es el antígeno que utilizan para inducir una respuesta inmune celular y humoral en contra del SARS-CoV-2 **(46)**.

De acuerdo a la gravedad de la infección por COVID-19, se ha reportado un incremento en las respuestas de linfocitos T CD4+ entre los 2 a 4 días posteriores al inicio de los síntomas, asociándose con una eliminación viral acelerada y por lo tanto con un mayor control de la infección primaria por SARS-CoV-2 **(44)**. Sin embargo, la ausencia prolongada de linfocitos T CD4+ se asoció con COVID-19 grave o fatal **(43,47)**, lo que sugiere que las respuestas de linfocitos T CD4+ son importantes para la prevención de COVID-19 grave **(44)**. Así mismo, se ha observado una relación de los linfocitos T foliculares circulantes (cTFH) con la producción de anticuerpos neutralizantes específicos contra SARS-CoV-2 y con una gravedad reducida de la enfermedad **(48,49)**.

La mayoría de las personas infectadas con SARS-CoV-2 producen anticuerpos neutralizantes de clase IgG a los 19 días del inicio de los síntomas **(50)**, siendo la proteína S y el dominio RBD el antígeno principal en más del 90% de los anticuerpos neutralizantes producidos **(51,52)**. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el dominio RBD de la proteína S es mediado por células B extrafoliculares **(53)**. Así mismo, el incremento de células B extrafoliculares activadas y el incremento de anticuerpos neutralizantes, se asocia con el estado grave de la enfermedad **(51,54)**.

En personas recuperadas de COVID-19, se ha reportado la producción de células T de memoria específicas contra SARS-CoV-2 **(48,55)** que persisten al menos 6 meses posteriores a la infección y se diferencian predominantemente en linfocitos Th1 y TFH **(56)**. En un estudio de 188 personas previamente infectadas con SARS-CoV-2, se observó un incremento de los linfocitos B de memoria conforme transcurría el tiempo, presentando una mayor cantidad de linfocitos B de memoria específicas a RBD a los 6 meses posterior a los primeros síntomas comparada al mes de iniciar los síntomas, produciendo anticuerpos neutralizantes **(57)**. Además, en 2 estudios con más de 1000 personas recuperadas de COVID-19, se reportó que los títulos de anticuerpos

de clase IgG contra el SARS-CoV-2 en circulación se mantenían durante 3 a 4 meses **(58,59)**.

Como ya se mencionó, la respuesta a la pandemia del SARS-CoV-2 se ha basado en el desarrollo e implementación de diversas plataformas de vacunas contra el SARS-CoV-2 que sean seguras y eficaces para su uso en un gran número de personas **(32)**. El objetivo de la vacunación es la producción de una respuesta inmune robusta y protectora contra las proteínas estructurales del virus (S, M o N) mediante la producción de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2 y el desarrollo de memoria inmunológica de linfocitos T y B para reducir tanto la gravedad de la enfermedad como el número de reinfecciones **(60)**. De esta manera, se ha disminuido el número de contagios y de casos graves por COVID-19 a nivel mundial, ya que la vacunación induce una respuesta inmune temprana y eficiente que elimina al virus del SARS-CoV-2 tan pronto como ingresa al huésped **(11)**.

En trabajadores de la salud holandeses que padecieron COVID-19 leve a moderado y que se vacunaron con plataformas de mRNA o viral, se reportó la presencia de respuestas de linfocitos T específicos a la proteína S1 y anticuerpos anti-RBD de clase IgG posterior a la infección, incrementando sus niveles después de la primera dosis y manteniéndose después de la segunda dosis, independientemente del tipo de plataforma de vacunación administrada. Así mismo, no existió correlación entre una respuesta mediada por linfocitos T y una mediada por anticuerpos específicos a SARS-CoV-2, asociándose a una heterogeneidad en la durabilidad y producción de la inmunidad celular y humoral contra SARS-CoV-2 **(61)**.

Con respecto a la memoria inmunológica inducida por la vacunación contra SARS-CoV-2, se ha reportado un incremento de linfocitos T CD4+ de memoria después de la segunda dosis de Pfizer o Moderna, manteniendo sus niveles a los 6 meses de la vacunación, mientras que los linfocitos cTFH se mantuvieron después de la vacunación y disminuyeron después de 6 meses. Además, observaron un incremento de linfocitos B de memoria efectora y una disminución de linfocitos B de memoria central después de la vacunación. Por otra parte, reportaron un incremento en la producción de anticuerpos de clase IgG anti-RBD y anti-S después de la vacunación con plataformas de mRNA y vector viral, disminuyendo a los 6 meses de la vacunación. Finalmente, no existió correlación entre los títulos de anticuerpos y los niveles tanto de linfocitos cTFH como de linfocitos B de memoria a los 6 meses de la vacunación, por lo que la protección inmunológica después de la vacunación se basa en mayor medida en la inmunidad celular que en la humoral **(62)**.

Nuestro grupo de trabajo estudió la producción de anticuerpos y los cambios en las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos T y B en personas sin antecedente y con antecedente de COVID-19 vacunadas contra SARS-CoV-2,

reportando un incremento en la producción de anticuerpos anti-RBD de clase IgG después de la primera dosis y manteniéndose después de la segunda dosis. En el caso de las poblaciones de linfocitos T y B, se reportó un incremento de las células T CD4+ y una disminución de los linfocitos TFH después de la segunda dosis, mientras que los linfocitos B y linfocitos B de memoria efectora disminuyeron después de la segunda dosis, lo que sugiere una participación clave de estas subpoblaciones celulares en la respuesta temprana y activación eficiente de linfocitos B que se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos IgG anti-RBD que tienen como finalidad una protección contra posibles re-infecciones y prevenir el estado grave de la enfermedad **(60)**.

En el año 2022, Cuba presentó su primera vacuna contra SARS-CoV-2 denominada Abdala, la cual en un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en personal del hospital “Saturnino Lara” de Santiago de Cuba, reportó un incremento en los títulos de anticuerpos anti-RBD de clase IgG y en su porcentaje de inhibición a la unión de RBD-ACE2 después de las 3 dosis aplicadas, por lo que los anticuerpos producidos por la vacuna Abdala presentan una actividad funcional capaz de neutralizar al SARS-CoV-2 **(39,63)**.

JUSTIFICACIÓN

La pandemia de COVID-19 originada por el SARS-CoV-2 ocasionó millones de casos y de muertes a nivel mundial, además presenta una alta tasa de mutación que incrementa la probabilidad de reinfección aun con la administración de vacunas contra el SARS-CoV-2, por lo que es considerado un tema de interés clínico en la actualidad.

Las vacunas contra el SARS-CoV-2 han demostrado una alta eficacia (>90%) para neutralizar al virus, reduciendo tanto el número de casos como de muertes en todo el mundo. Las vacunas inducen una respuesta inmune robusta, eficaz y protectora, basada en la producción de anticuerpos neutralizantes de clase IgG y de linfocitos T y B de memoria en contra del SARS-CoV-2. Por tal motivo, el desarrollo “temprano” y eficaz de las vacunas contra el SARS-CoV-2 basadas en varias plataformas resultó en una alta demanda de compra global, por lo que algunos países decidieron desarrollar su propia vacuna para tener una mayor accesibilidad a este tratamiento para su población, como es el caso de Cuba con la vacuna Abdala.

Actualmente se incluyó la vacuna Abdala como parte del esquema de refuerzo para la población mexicana. Sin embargo, existen pocos reportes acerca de la eficacia de esta vacuna para generar una protección inmune mediada por anticuerpos y el desarrollo de memoria inmunológica o mejorar la memoria inmunológica preexistente contra el SARS-CoV-2 cuando se usa como dosis de refuerzo.

HIPÓTESIS

La vacuna Abdala empleada como dosis de refuerzo incrementará la producción de anticuerpos anti-RBD neutralizantes de clase IgG, así como inducirá cambios en los porcentajes de linfocitos B, linfocitos T y sus subpoblaciones con fenotipos de memoria.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la producción de anticuerpos anti-RBD de clase IgG, linfocitos B, linfocitos T cooperadores (Th), linfocitos TFH y sus fenotipos de memoria antes y después de la vacunación con Abdala.

Objetivos Particulares.

Antes y después de la vacunación con Abdala, determinar:

- La presencia de anticuerpos anti-RBD neutralizantes de clase IgG mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
- Los porcentajes de linfocitos B (CD19+), linfocitos B de memoria (CD19+CD21+CD27+) y linfocitos B de memoria efectora (CD19+CD21-CD27+) mediante citometría de flujo multiparamétrica.
- Los porcentajes de linfocitos Th (CD3+CD4+), linfocitos TFH (CD3+CD4+CXCR5+CCR7-), linfocitos T de memoria central (CD3+CD4+CD45RO+CCR7+) y linfocitos T de memoria efectora (CD3+CD4+CD45RO+CCR7-) mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Después de la vacunación y en presencia de la proteína RBD recombinante, determinar:

- La presencia de anticuerpos anti-RBD neutralizantes de clase IgG mediante ELISA.
- Los porcentajes de plasmablastos (CD19+CD27+CD38High), linfocitos T activados (CD3+CD4+CD25+) y la concentración de IL-2 e IFN- γ mediante citometría de flujo multiparamétrica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico.

Se colectaron muestras sanguíneas de 24 personas que laboran en el Instituto de Oftalmología “F.A.P. Conde de Valenciana I.A.P.” y recibieron como refuerzo la vacuna Abdala contra SARS-CoV-2. 1-2 días antes de la vacunación (pre-Abdala), se obtuvieron de 10-12 mL de sangre periférica mediante punción venosa en tubos con EDTA como anticoagulante y posterior a los 14 ± 5 días de la vacunación (post-Abdala), se colectaron de 10-12 mL de sangre periférica en tubos con heparina de litio. Además, se colectaron muestras sanguíneas pre-Abdala y post-Abdala en tubos con gel separador y sin aditivo para la obtención de suero (**Figura 1**). El comité científico (CI-055-2021), de bioseguridad (CB-056-2021) y de bioética (CEI-2020/10/09) del Instituto de Oftalmología “F.A.P. Conde de Valenciana I.A.P.” aprobaron este estudio.

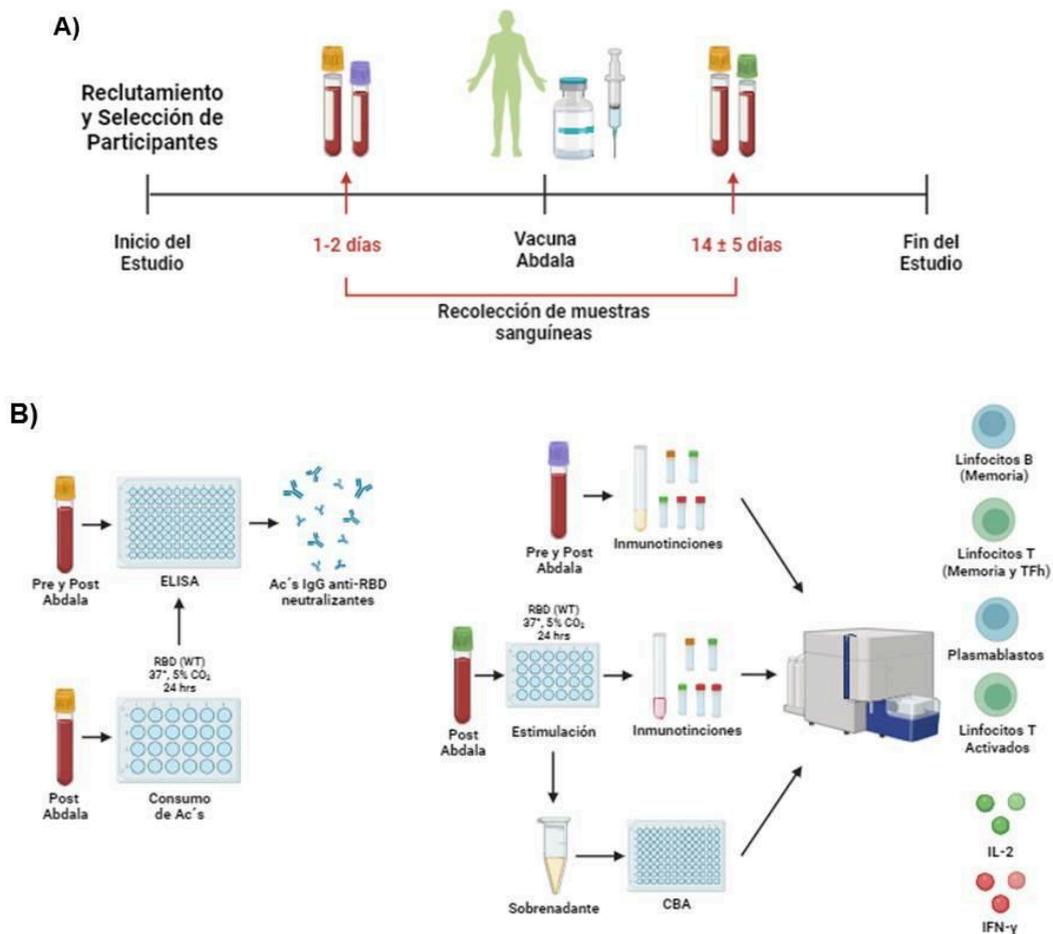


Figura 1. A) Diseño Experimental. Reclutamiento y selección de participantes. Se colectaron muestras de sangre 1-2 días antes de la vacunación con Abdala y 14 ± 5 días después de su aplicación, indicándose con la flecha roja. **B)** Estrategia Experimental. Las muestras de suero pre y post-Abdala se emplearon para los ensayos de ELISA, mientras que las muestras post-Abdala se emplearon para el consumo de anticuerpos. Las muestras de sangre pre y post-Abdala recolectadas en tubo con EDTA se emplearon para las inmuntinciones, mientras

que las muestras post-Abdala recolectadas en tubo con heparina de litio se emplearon para el ensayo de estimulación. Las muestras se adquirieron y analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Criterios de selección de los sujetos de estudio.

Se incluyó personal del instituto vacunado contra SARS-CoV-2 que decidió recibir como refuerzo la vacuna Abdala. Dicho personal no presentó COVID-19 en un periodo mínimo de 3 meses, sin antecedentes o diagnóstico de alguna enfermedad crónica-degenerativa y que aceptaron participar en el protocolo mediante firma de consentimiento informado. Se excluyeron aquellas personas que dieron positivo a COVID-19 tres meses previos a la toma de muestra, con antecedente o diagnóstico de alguna enfermedad crónica-degenerativa, bajo tratamiento con inmunosupresores y/o que no aceptaron participar en el protocolo. Se eliminaron a las personas que no cumplieron con las tomas de muestra solicitadas para el estudio, cuya muestra biológica fue insuficiente y aquellas que decidieron retirar su consentimiento para participar en el protocolo.

Consumo de anticuerpos en presencia de la proteína RBD del SARS-CoV-2.

Se adicionaron 200 μ L de suero post-Abdala por pocillo en placas de 24 pozos y se adicionó la proteína RBD recombinante de la cepa Wild Type del SARS-CoV-2 (0.5 μ g/mL) (UDIBI, IPN) en medio RPMI suplementado (10% Suero Fetal Bovino y 1% de Antibiótico) (Gibco), mientras que como control negativo se adicionó medio RPMI suplementado (Gibco). Posteriormente, se incubaron las placas a 36°C durante 24 horas. Al terminar la incubación, se recolectó los sueros y centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, se recuperaron los sueros en tubos Eppendorf de 0.6 mL y se almacenaron a -80°C hasta su uso en el ensayo de ELISA.

Determinación de IgG anti-RBD en suero mediante ELISA.

Se llevó a cabo la determinación de anticuerpos de clase IgG anti-RBD empleando el kit de ELISA UDITEST-V2G (UDIBI, IPN) en las muestras de suero de personas pre y post vacunadas con Abdala, así como en las muestras del ensayo de consumo de anticuerpos, siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante.

Se removió por inversión el líquido excedente de la placa de 96 pozos y se adicionaron 100 μ L de cada muestra diluida 1:100, así como del control negativo y positivo y se incubó por hora y media a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó 6 veces la placa con 200 μ L de solución amortiguadora de fosfatos con surfactante (solución de lavado), removiendo la solución entre

cada lavado. Se adicionaron 50 μL del anticuerpo anti-IgG humana acoplada a HRP (anticuerpo secundario) y se incubó una hora a temperatura ambiente. Después, se lavó 6 veces la placa con 200 μL de solución de lavado, removiendo la solución entre cada lavado y se adicionaron 100 μL de solución de peróxido de hidrógeno (A) y 3, 3', 5, 5', tetrametilbenzidina en solvente orgánico (sustrato de revelado), se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se adicionaron 50 μL de solución de ácido metanosulfónico (solución de paro) y se determinó la densidad óptica (O.D.) empleando el espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 450 nm con una corrección a 595 nm. Cada muestra se analizó por duplicado y se promediaron los valores obtenidos.

Ensayo de estimulación con la proteína RBD del SARS-CoV-2 a partir de sangre periférica.

El ensayo de estimulación se llevó a cabo en muestras de sangre periférica post-Abdala, se adicionaron 400 μL de sangre periférica por pocillo en placas de 24 pozos y como estímulo se empleó la proteína RBD recombinante de la cepa Wild Type del SARS-CoV-2 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (UDIBI, IPN) en medio RPMI suplementado (10% Suero Fetal Bovino y 1% de Antibiótico) (Gibco). Como control negativo se empleó medio RPMI suplementado (Gibco) y como control positivo se empleó medio RPMI suplementado (Gibco), Isonomicina (0.3 mg/mL) y Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente, se incubaron las placas a 36°C y 5% CO_2 durante 24 horas. Al terminar la incubación, se recolectó la suspensión celular y centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, se recolectaron los sobrenadantes en tubos Eppendorf de 0.6 mL y se almacenaron a -80°C hasta su uso en la determinación de citocinas, mientras que la porción celular se recuperó con 300 μL de medio RPMI (Gibco) para su fenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica.

Fenotipificación de las poblaciones celulares.

Para llevar a cabo la fenotipificación de las muestras pre y post Abdala se emplearon anticuerpos monoclonales acoplados a fluoróforos. Para identificar los linfocitos B, linfocitos B de memoria y linfocitos B de memoria efectora, se adicionaron los anticuerpos: α -CD19 FITC (Clona: HIB19, BD Pharmingen), α -CD21 PE (Clona: B-ly4, BD Pharmingen) y α -CD27 APC-H7 (Clona: M-T271, BD Pharmingen). Para los linfocitos Th, linfocitos TFH, linfocitos T de memoria central y linfocitos T de memoria efectora, se empleó la combinación de anticuerpos: α -CD3 BV421 (Clona: UCHT1, BD Horizon), α -CD4 PECy5 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen), α -CXCR5 Alexa Fluor 488 (Clona: RF8B2, BD Pharmingen), α -CCR7 PE (Clona: 3D12, BD Pharmingen) y α -CD45RO PECy7 (Clona: UCHL1, BD Pharmingen).

En las células colectadas del ensayo de estimulación, se emplearon los anticuerpos α -CD19 FITC (Clona: HIB19, BD Pharmingen), α -CD27 APC-H7 (Clona: M-T271, BD Pharmingen) y α -CD38 PECy7 (Clona: HB-7, BioLegend) para la identificación de plasmablastos y, los anticuerpos α -CD3 BV421 (Clona: UCHT1, BD Horizon), α -CD4 PECy5 (Clona: RPA-T4, BD Pharmingen) y α -CD25 APC (Clona: M-A251, BD Pharmingen) para la identificación de los linfocitos T activados.

Tinción de membrana.

A 100 μ L de sangre total o 100 μ L de células estimuladas, se adicionaron las siguientes combinaciones de anticuerpos: anticuerpos α -CD19, α -CD21 y α -CD27, anticuerpos α -CD3, α -CD4, α -CXCR5, α -CD45RO y α -CCR7, anticuerpos α -CD19, α -CD27 y α -CD38 o anticuerpos α -CD3, α -CD4 y α -CD25. Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó la lisis de los eritrocitos presentes en las muestras adicionando 1 mL de Lysing Solution (BD, Catálogo: 349202), se incubaron en oscuridad por 10 minutos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 1mL de PBS/BSA/Azida de sodio (ScienCell, Catálogo: 0303) y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron y fijaron en 300 μ L de solución Stabilizing Fixative (BD, Catálogo: 338036). Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Lyrics cell sorter (BD Biosciences) empleando el software BD FACSuite (BD), posteriormente se analizaron en el software FlowJo v10.8.1 (BD FlowJo Software). Finalmente, los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software).

Adquisición y análisis de datos por citometría de flujo multiparamétrica.

Se realizó la gráfica de tamaño área (FSC-A) vs tamaño altura (FSC-H), delimitando la región correspondiente a las células individuales (Singlets) y a partir de esa región se realizó la gráfica de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC), donde se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos. Se adquirieron 20,000 eventos de la región de linfocitos. A continuación, se realizó un gráfico de SSC-A vs CD3 para delimitar la región correspondiente a los linfocitos T y a partir de esta región, se realizó un gráfico de CD3 vs CD4 para seleccionar la región de los linfocitos Th (CD3+CD4+). En muestras pre y post-Abdala, a partir de la población de linfocitos Th, se realizó un gráfico de CXCR5 vs CCR7 para identificar y cuantificar los linfocitos TFH (CD3+CD4+CXCR5+CCR7-), así como un gráfico de CD45RO vs CCR7 para identificar y cuantificar los linfocitos T de memoria central (CD3+CD4+CD45RO+CCR7+) y memoria efectora (CD3+CD4+CD45RO+CCR7-) (**Figura 2A**). En muestras estimuladas, a partir

de la región de linfocitos Th, se empleó un gráfico de CD25 vs CD4 para identificar y cuantificar los linfocitos T activados (CD3+CD4+CD25+) (**Figura 2B**). Por otra parte, se realizó un gráfico de SSC-A vs CD19 para delimitar la región correspondiente a los linfocitos B. En muestras pre y post-Abdala, a partir de esta región, se empleó un gráfico de CD27 vs CD21 para identificar y cuantificar los linfocitos B de memoria (CD19+CD21+CD27+) y de memoria efectora (CD19+CD21-CD27+) (**Figura 2A**). En muestras estimuladas, a partir de la región de linfocitos B, se realizó un gráfico de CD27 vs CD38 para identificar y cuantificar los plasmablastos (CD19+CD27+CD38High) (**Figura 2B**). Las regiones positivas y negativas de cada población se verificaron con base en el control de fluorescencia menos uno (FMO) (**Anexo 1 y 2**).

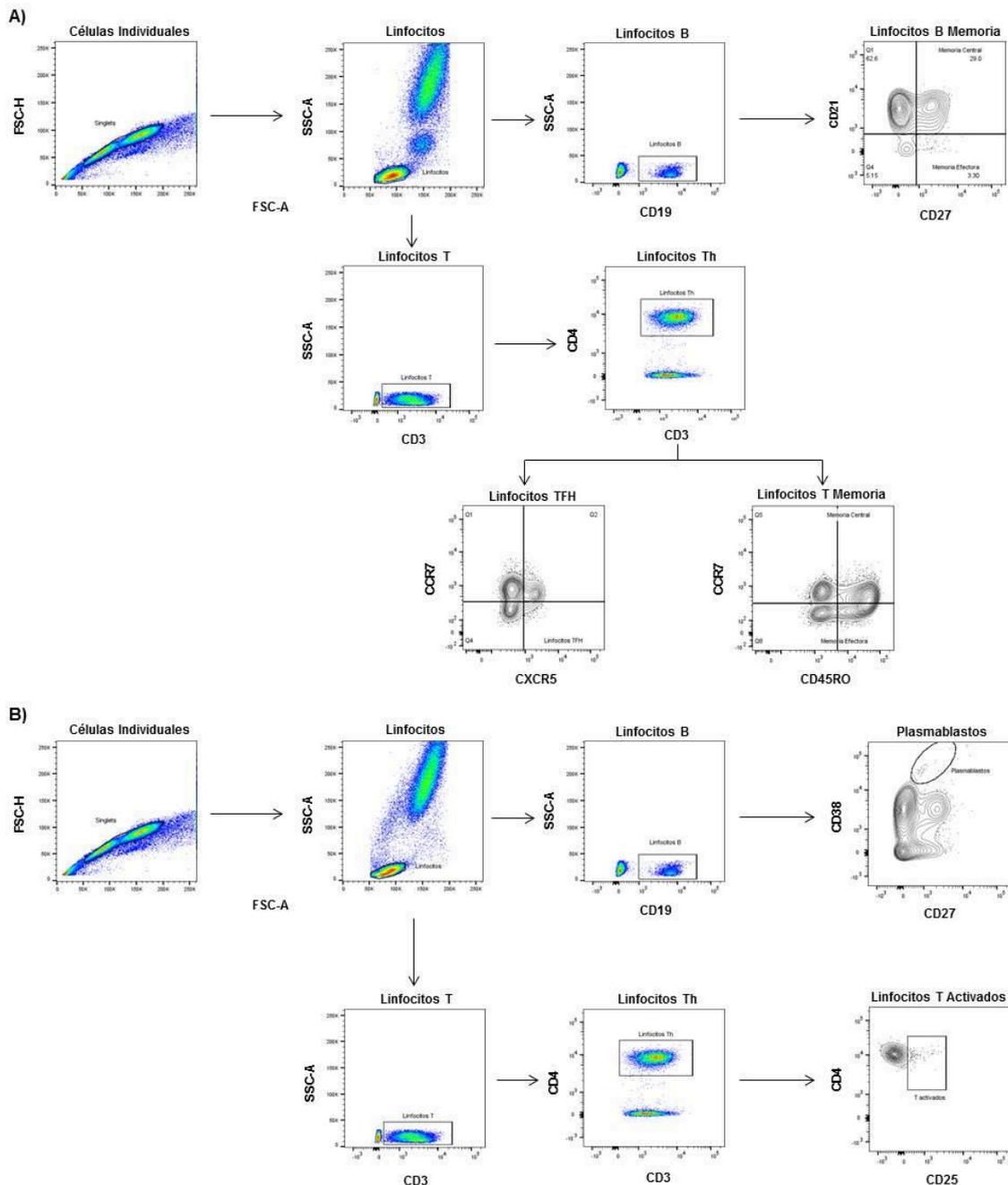


Figura 2. Estrategia representativa del análisis por citometría de flujo multiparamétrica. **A)** Análisis de las poblaciones de linfocitos B, linfocitos Th, linfocitos TFH y sus subpoblaciones de memoria central y memoria efectora. Muestra post-Abdala. **B)** Análisis de las poblaciones de plasmablastos y linfocitos T activados. Muestra post-Abdala posterior al ensayo de estimulación.

Determinación de IL-2 e IFN- γ en sobrenadante.

Se realizó la cuantificación de IL-2 e IFN- γ en los sobrenadantes obtenidos del ensayo de estimulación, empleando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD), siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante.

Se adicionaron 50 μ L de las perlas de captura a los tubos de citometría. Posteriormente, se añadieron 50 μ L de las diluciones del estándar de citocinas Th1/Th2/Th17 humanas a los tubos marcados como control o se añadieron 50 μ L de los sobrenadantes a los tubos. Posteriormente, se adicionaron 50 μ L del reactivo de detección PE Th1/Th2/Th17 humana y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Después, se adicionó 1 mL de solución de lavado y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 300 μ L de solución de lavado. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Lyric (BD) empleando el software BD FACSuite (BD), posteriormente se analizaron en el software FlowJo v10.8.1 (BD FlowJo Software). Finalmente, los resultados fueron graficados con el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software).

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el software GraphPad Prism 9. Se realizó la prueba Shapiro-Wilks para obtener la distribución de los datos, la cual dio como resultado una distribución no Gaussiana, por lo que se empleó la prueba de Wilcoxon para la comparación de dos grupos pareados. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. Se consideró un valor de p menor a 0.05 como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Población de estudio.

Se analizaron muestras de 24 personas, tomadas 1-2 días antes de la vacunación (pre-Abdala) y a los 14 ± 5 días posterior a la vacunación (post Abdala) con Abdala. La distribución con respecto al género fue de 3 personas masculinas y de 21 personas femeninas. La edad promedio del grupo de estudio fue de 39 años con un rango de 23 a 58 años. El grupo tenía el esquema completo de vacunación contra SARS-CoV-2 y al menos una dosis de refuerzo aplicada entre 5 y 13 meses antes de la vacuna Abdala. Ningún participante refirió haber cursado con COVID-19 durante los últimos 6 meses. Posterior a la vacunación con Abdala, no presentaron reacciones adversas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Datos demográficos

	Participantes
<i>n</i>	24
Género (Hombre/Mujer)	3 / 21
Edad (años) (Rango)	39 (23 - 58)
Esquema completo de vacunación contra SARS-CoV-2	24 (100%)
Dosis de refuerzo	24 (100%)
Tiempo en meses desde la última dosis (Rango)	10 (5 - 13)
Reacciones adversas	0

Densidad óptica de anticuerpos neutralizantes IgG anti-RBD inducida por la vacuna Abdala.

Se ha demostrado que la vacuna Abdala induce la producción de anticuerpos IgG neutralizantes contra el dominio RBD en población cubana. Sin embargo, es necesario conocer si esta vacuna es capaz de producir anticuerpos cuando se utiliza como dosis de refuerzo. Se determinó la O.D. antes y después de la vacunación con Abdala y observamos un incremento significativo en las muestras post-Abdala comparada con las muestras pre-Abdala (1.1826 vs 1.0664; $p < 0.0001$) (**Figura 3**). Este resultado demuestra que la vacuna Abdala es capaz de inducir la producción de anticuerpos de clase IgG anti-RBD neutralizantes por lo que se sugiere que puede brindar protección contra el SARS-CoV-2.

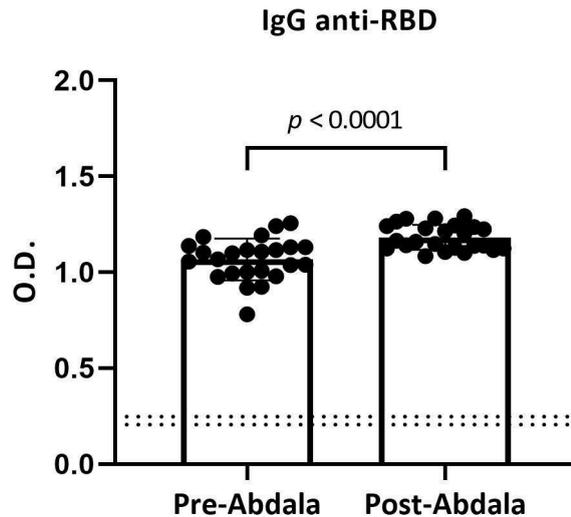


Figura 3. Densidad óptica (O.D.) de anticuerpos IgG anti-RBD neutralizantes pre y post Abdala. n=24. Los valores de referencia positivo y negativo se representan con las líneas punteadas. Media \pm desviación estándar.

Porcentaje de linfocitos B, linfocitos B de memoria y memoria efectora posterior a la aplicación de la vacuna Abdala.

Como se observó que la vacuna Abdala induce la producción de anticuerpos IgG anti-RBD, analizamos el porcentaje de linfocitos B (CD19+) ya que se relacionan con la producción de anticuerpos. Observamos una disminución en el porcentaje de linfocitos B en las muestras post-Abdala comparado con las muestras pre-Abdala (12.545% vs 14.467%, $p=0.0103$) (**Figura 4A**). Además, evaluamos los porcentajes de linfocitos B de memoria ya que son importantes para mantener una protección a largo plazo. Analizamos tanto los linfocitos B de memoria (CD19+CD21+CD27+), como los de memoria efectora (CD19+CD21-CD27+). Detectamos un incremento en los linfocitos B de memoria, mientras que en los linfocitos B de memoria efectora, detectamos una disminución en las muestras post-Abdala comparado con las muestras pre-Abdala (23.4083% vs 17.2208%; $p < 0.0001$ y 2.2687% vs 3.4462%; $p < 0.0001$), respectivamente (**Figura 4B y 4C**). Estos resultados sugieren que la vacuna Abdala incrementa el porcentaje de linfocitos B de memoria que podrían ser capaces de mantener la protección a largo plazo. En el caso de los linfocitos B de memoria efectora pudieron haber disminuido debido a que cierto porcentaje de linfocitos B probablemente se activó.

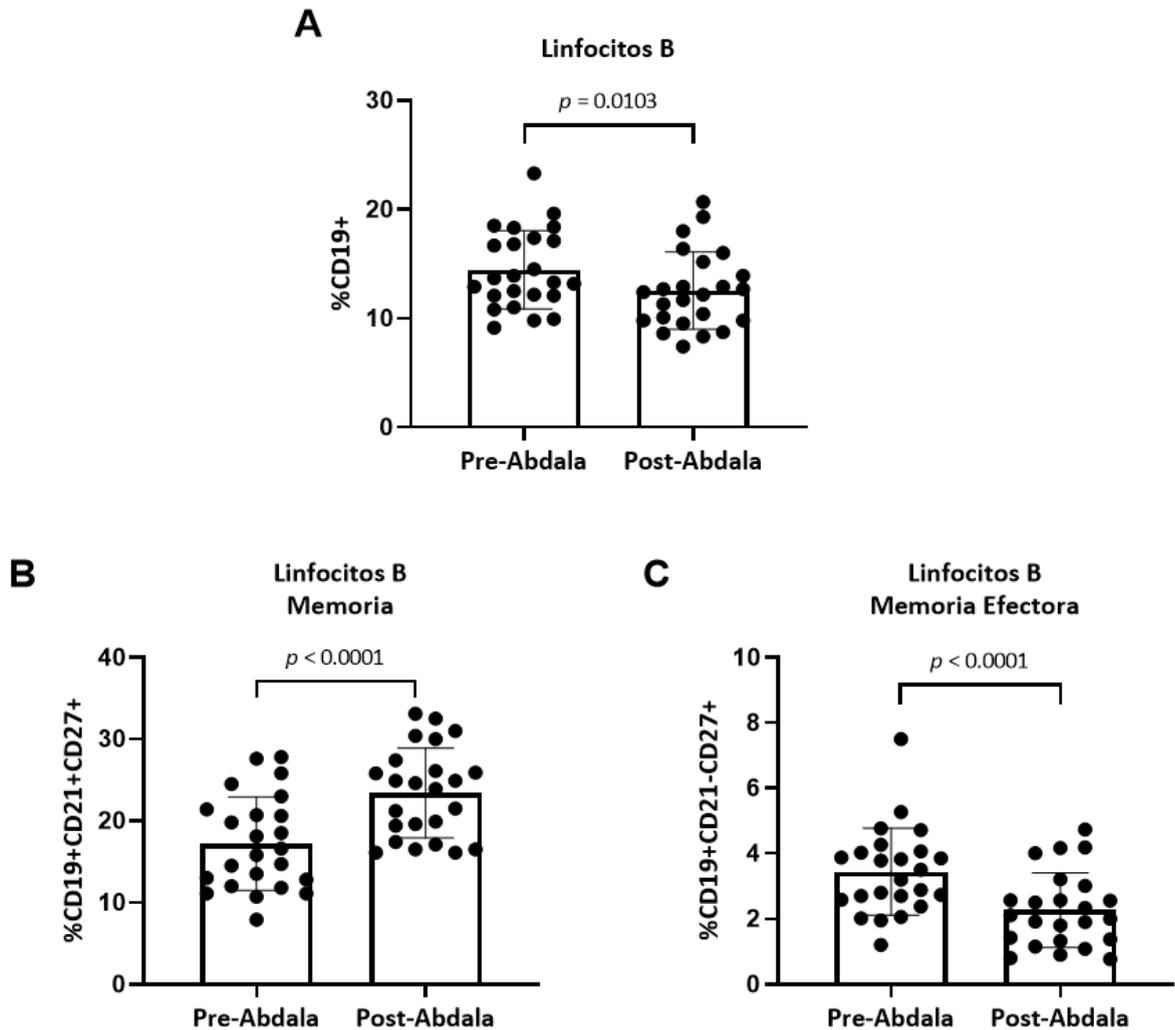


Figura 4. Comparación de los porcentajes de **A)** linfocitos B, **B)** linfocitos B de memoria y **C)** linfocitos B de memoria efectora antes y después de la vacunación con Abdala. $n=24$. Media \pm desviación estándar.

Porcentaje de linfocitos Th, linfocitos TFH, linfocitos T de memoria central y efectora inducido por la vacuna Abdala.

Otro componente importante en la protección contra el SARS-CoV-2 son los linfocitos Th (CD3+CD4+), por lo que determinamos el porcentaje de estos linfocitos. Observamos un incremento en el porcentaje de linfocitos Th en las muestras post-Abdala comparado con las muestras pre-Abdala (65.0875% vs 57.7542%, $p < 0.0001$) (**Figura 5A**). Entre las subpoblaciones de linfocitos Th, determinamos a los linfocitos TFH (CD4+CXCR5+CCR7-) ya que entre sus funciones se encuentra la de activar a los linfocitos B y polarizar a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Observamos un incremento en el porcentaje de linfocitos TFH posterior a la vacunación con Abdala comparado con antes de la vacunación (7.645% vs 5.4371%, $p=0.0064$) (**Figura 5B**). Este

resultado sugiere que estos linfocitos TFH podrían ayudar a la activación de los linfocitos B para la producción de anticuerpos posterior a la vacunación. Por otra parte, para conocer si hay una protección a largo plazo posterior a la vacuna estudiamos los porcentajes de linfocitos T de memoria efectora (CD4+CD45RO+CCR7-) y linfocitos T de memoria central (CD4+CD45RO+CCR7+). Observamos un incremento en el porcentaje de linfocitos T de memoria efectora en las muestras post-Abdala con respecto a las muestras previas a la vacunación (34.0458% vs 21.6904%, $p < 0.0001$) (**Figura 5C**). Mientras que el porcentaje de linfocitos T de memoria central fue similar en ambas muestras (32.6125% vs 33.3167%) (**Figura 5D**). Estos resultados sugieren que posterior a la vacunación se mantiene una respuesta a largo plazo, la cual podría actuar de manera temprana en un reencuentro con el SARS-CoV-2.

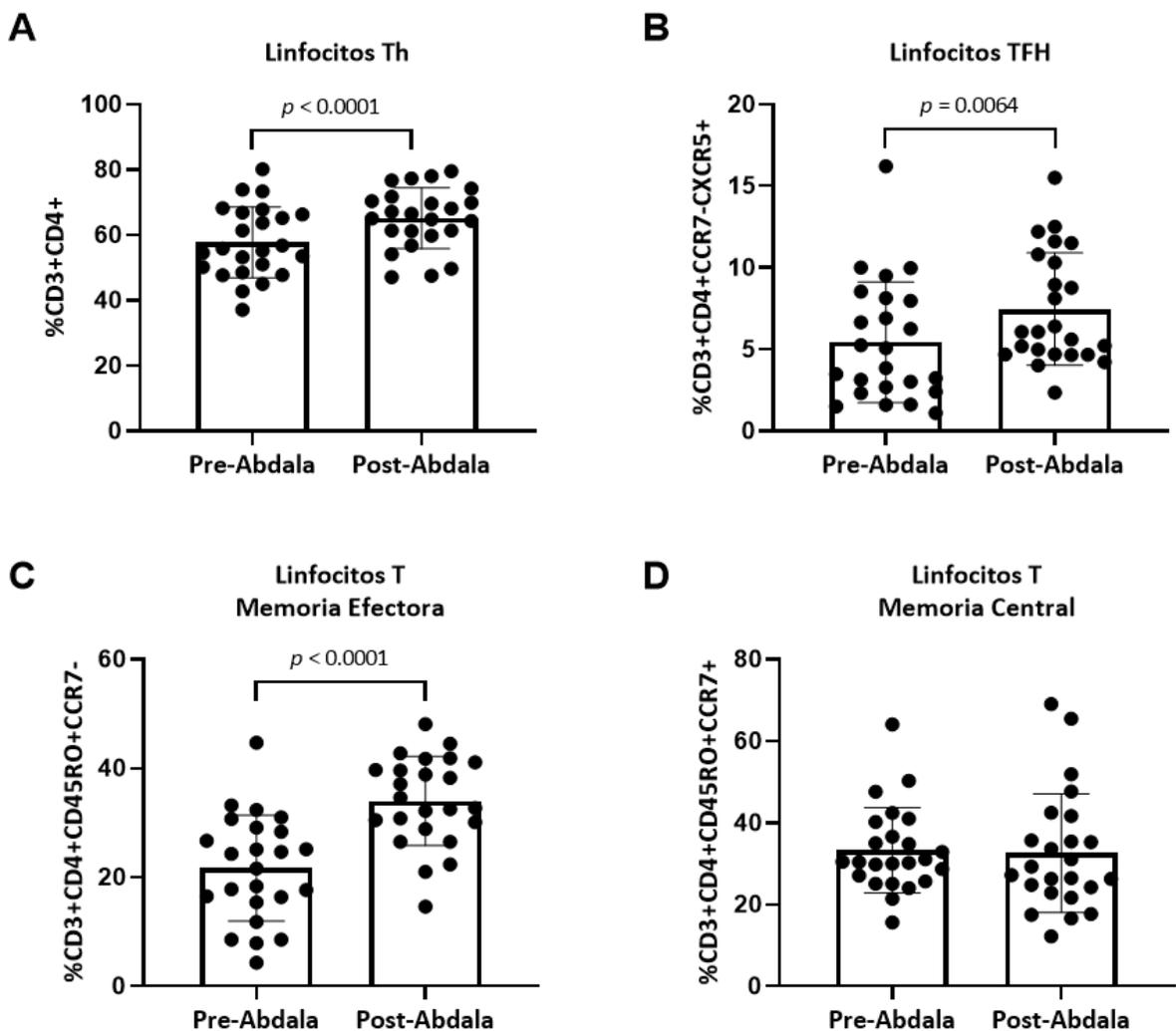


Figura 5. Comparación de linfocitos T pre y post-Abdala. **A)** Porcentaje de linfocitos Th. **B)** Porcentaje de linfocitos TFH. **C)** Porcentaje de linfocitos T de memoria efectora. **D)** Porcentaje de linfocitos T de memoria central. $n=24$. Media \pm desviación estándar.

Densidad óptica de anticuerpos IgG anti-RBD neutralizantes posterior a un encuentro con la proteína RBD recombinante.

La eficacia de los anticuerpos IgG anti-RBD producidos por la vacuna Abdala se basa en la capacidad de reconocer específicamente y con una determinada afinidad al dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Después de la vacunación, se determinó la O.D. de anticuerpos IgG anti-RBD posterior a una incubación con la proteína RBD recombinante. Observamos una disminución de la O.D. en las muestras incubadas con la proteína comparadas con el control negativo (1.0069 vs 1.1201; $p < 0.0048$) (**Figura 6**). Este resultado sugiere que los anticuerpos reconocen a la proteína RBD del SARS-CoV-2.

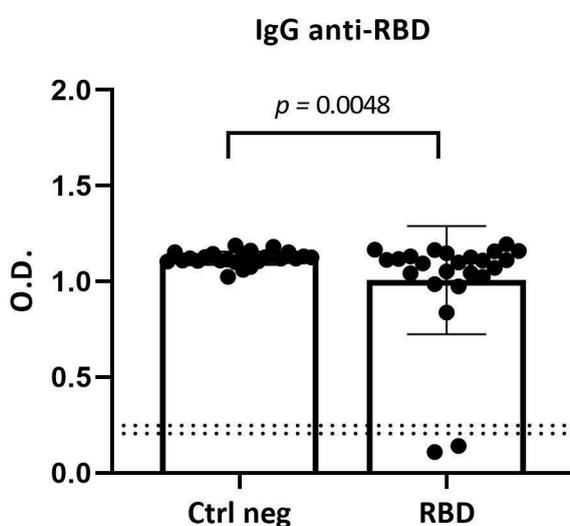


Figura 6. Densidad óptica de anticuerpos IgG anti-RBD neutralizantes en muestras incubadas con RBD recombinante y control negativo. $n=24$. Los valores de referencia positivo y negativo se representan con las líneas punteadas. Media \pm desviación estándar.

Porcentaje de plasmablastos posterior a un estímulo con la proteína RBD recombinante.

Los plasmablastos son células que se producen al activarse los linfocitos B y tienen la capacidad de producir anticuerpos en una respuesta temprana en contra de un patógeno. Se determinaron los porcentajes de plasmablastos (CD19+CD27+CD38High) y observamos su incremento posterior al estímulo con respecto al control negativo (2.9817% vs 2.5746%, $p=0.0126$) (**Figura 7**). Este resultado sugiere que los linfocitos B que se han generado a lo largo de las inmunizaciones son capaces de activarse en contra de la proteína RBD, manteniendo así la protección a largo plazo.

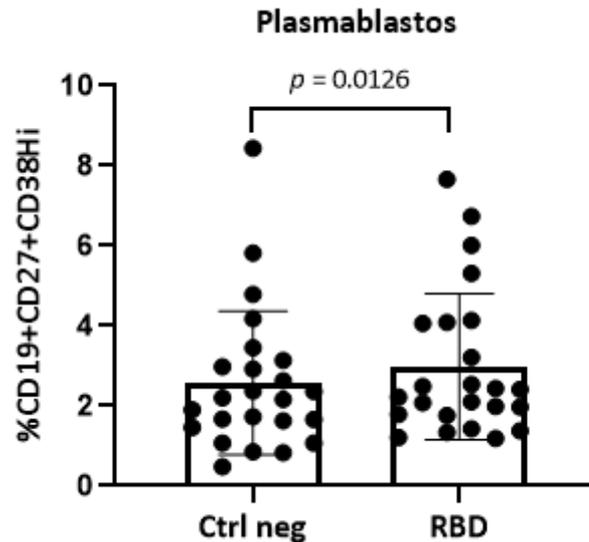


Figura 7. Comparación de los porcentajes de plasmablastos antes y después del estímulo con la proteína RBD recombinante. n=24. Media \pm desviación estándar.

Porcentaje de linfocitos T activados y producción de IL-2 e IFN- γ posterior a un estímulo con la proteína RBD recombinante.

Los linfocitos T al activarse llevan a cabo sus funciones efectoras entre las cuales se encuentra la producción de citocinas, por lo que se determinó el porcentaje de linfocitos T activados (CD3+CD4+CD25+) y la concentración de IL-2 e IFN- γ . Observamos un incremento tanto en los porcentajes de linfocitos T activados como en la concentración de IL-2 e IFN- γ posterior al estímulo con respecto al control negativo (2.895% vs 1.5096%, $p < 0.0001$, 12.33 pg/mL vs 3.06 pg/mL, $p < 0.0001$ y 13.8277 pg/mL vs 3.9735 pg/mL, $p < 0.0001$, respectivamente) (**Figura 8A, 8B y 8C**). Estos resultados demuestran que los linfocitos T tienen la capacidad de activarse y producir IL-2 e IFN- γ , por lo que podría participar en una respuesta en contra del SARS-CoV-2.

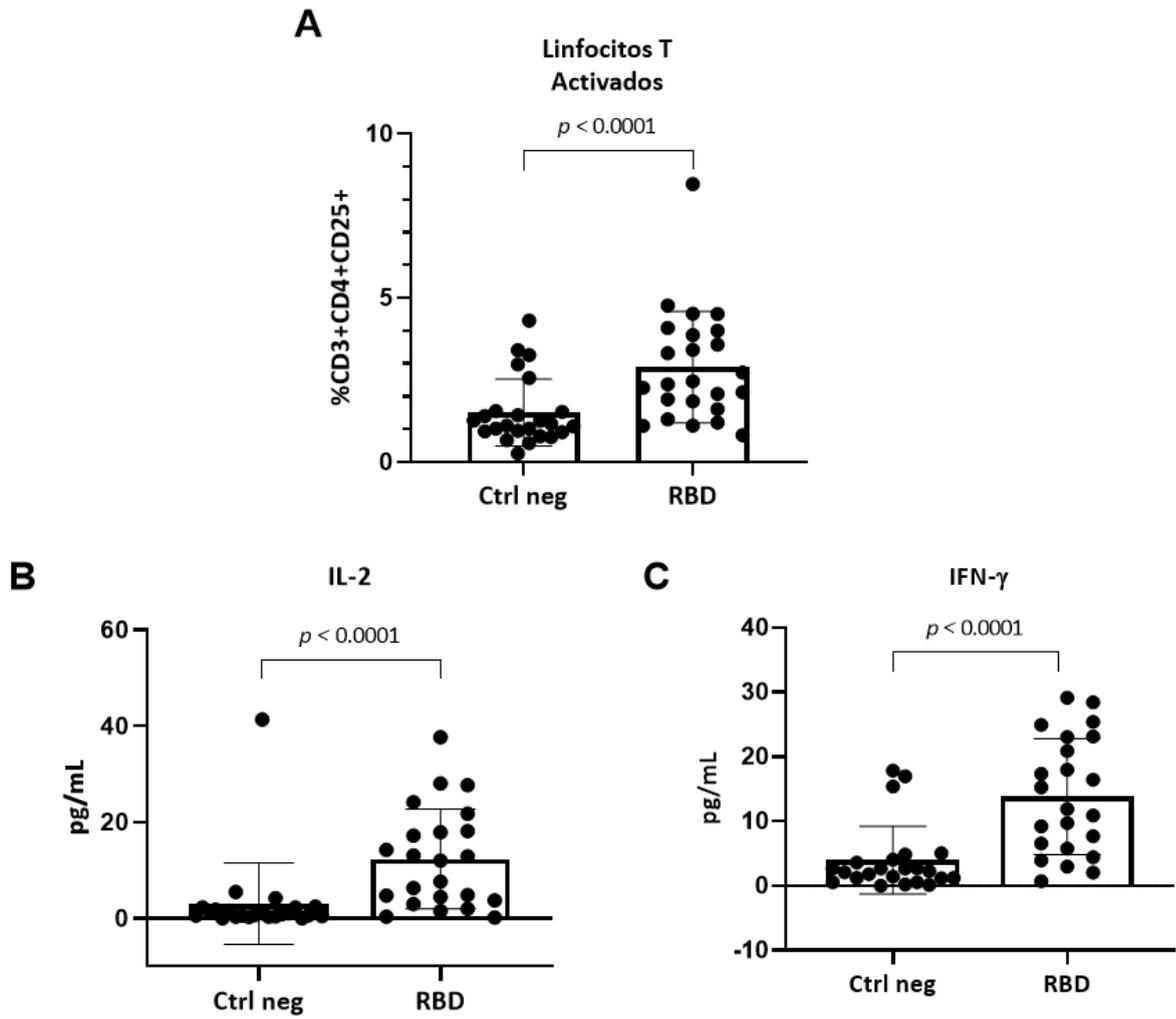


Figura 8. Comparación de **A)** linfocitos T activados y concentración de **B)** IL-2 e **C)** IFN- γ antes y después del estímulo con la proteína RBD recombinante. n=23. Media \pm desviación estándar.

DISCUSIÓN

Las vacunas contra COVID-19 han demostrado una alta eficacia para neutralizar el SARS-CoV-2 y así disminuir tanto el número de casos como el número de muertes a nivel mundial, debido a que inducen una respuesta inmune robusta, eficaz y protectora, basada principalmente en la producción de anticuerpos neutralizantes contra el dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Sin embargo, su autorización de emergencia otorgada por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha ocasionado una alta demanda para su adquisición a nivel mundial.

Algunos países decidieron desarrollar sus propias vacunas para tener una mayor accesibilidad de este tratamiento en su población y reducir costos de adquisición, como es el caso de la vacuna cubana Abdala, la cual se basa en una plataforma subunitaria de proteína recombinante y al igual que las demás vacunas, va dirigida hacia el dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Sin embargo, los reportes que existen relacionados a esta vacuna no abordan la inmunidad celular, por lo que es necesario estudiar más a fondo dicha inmunidad y la respuesta a largo plazo a través de la memoria inmunológica. Por lo anterior, en este estudio evaluamos la producción de anticuerpos IgG anti-RBD neutralizantes, los porcentajes de linfocitos B, linfocitos T y sus fenotipos de memoria.

La vacunación tiene como objetivo la producción de anticuerpos neutralizantes, que corresponden al componente de la respuesta inmune con el cual evalúan la eficacia de las vacunas. En el caso de la vacuna Abdala, Hernández et al. reportó un incremento en la producción de anticuerpos de la clase IgG en contra de la proteína RBD del SARS-CoV-2 en sujetos no vacunados **(63)**. En nuestro estudio, la vacuna se utilizó como dosis de refuerzo en población que ya contaba con el esquema de vacunación completo y al menos una dosis de refuerzo, a pesar de este hecho, observamos un incremento en la producción de anticuerpos IgG anti-RBD posterior a la vacunación, por lo que este incremento podría deberse a la activación de la inmunidad preexistente causada por las dosis anteriores. Además, este incremento fue similar al reportado previamente en la 2da dosis con respecto a los sujetos no vacunados **(60)**, lo que nos indicaría que llegamos a una meseta en la producción de anticuerpos.

A pesar de que los anticuerpos neutralizantes son el componente con el cual se evalúa la eficacia de las vacunas, los linfocitos B son fundamentales para la producción de estos. En nuestro estudio, observamos una disminución en el porcentaje de linfocitos B posterior a la vacunación con Abdala, previamente nosotros reportamos una disminución en el porcentaje de linfocitos B posterior a la 2da dosis independientemente del tipo de vacuna **(60)**, por lo que cierto porcentaje de linfocitos B podría diferenciarse a linfocitos B de memoria y

linfocitos B foliculares que se caracterizan por localizarse en centro germinal **(64)**. Los linfocitos B de memoria tienen la capacidad de reconocer al agente causal de una manera rápida, se clasifican en linfocitos B de memoria (de reposo) que preferentemente se encuentran en centro germinal y de memoria efectora (activada) que se encuentran en circulación **(65)**, debido a lo anterior, estudiamos a los linfocitos B de memoria para evaluar la protección inmunológica a largo plazo.

Dan et al. reportó un incremento en los linfocitos B de memoria a los 6 meses posteriores al inicio de los síntomas, asociándolo con una producción eficaz de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto con una inmunidad protectora humoral contra el SARS-CoV-2 **(57)**. En el caso de las vacunas, diversos estudios mencionan que la vacunación de refuerzo reactiva los linfocitos B de memoria preexistentes incrementando su porcentaje **(66–74)**. En nuestro caso observamos un incremento en los porcentajes de linfocitos B de memoria después de la vacunación, por lo que la vacuna Abdala como dosis de refuerzo podría inducir la proliferación de los linfocitos B de memoria preexistentes de los participantes del estudio. Por otra parte, Hartley et al. observó en personas vacunadas con dosis de refuerzo posterior a los 6 o hasta 12 meses, un porcentaje menor de linfocitos B de memoria en circulación **(65)**. Debido a que evaluamos los cambios en los porcentajes de linfocitos B de memoria a las 2 semanas, desconocemos si estos linfocitos B de memoria disminuirán después de 6 meses, por lo cual tendríamos que realizar la determinación de estos linfocitos B a los 6 meses posterior a la vacuna Abdala en el mismo grupo de estudio. Por otra parte, en el caso de los linfocitos B de memoria efectora, observamos una disminución en su porcentaje, esta disminución también ha sido reportada posterior a la 2da dosis de vacunación contra COVID-19 **(60)**, lo cual podría deberse a que cierto porcentaje de estos linfocitos B se diferenciación a células plasmáticas o plasmablastos **(75)**.

Además de la participación de los anticuerpos y de linfocitos B, para controlar y eliminar una infección viral de manera eficaz se requiere de la inducción y activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. En diversos estudios enfocados en la respuesta inmune adaptativa posterior a una infección de SARS-CoV-2, mencionan que la presencia e incremento de los porcentajes de linfocitos T CD4+ se asocia con un mayor control de la infección primaria, al disminuir tanto los síntomas como la gravedad de la enfermedad, así como con una eliminación viral rápida **(43,44,47)**. En el caso de las vacunas contra COVID-19 han reportado un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ posterior a cada dosis **(44,60,61)**. En personas vacunadas con Abdala observamos un incremento en los porcentajes de linfocitos T CD4+. Entre las funciones principales de los linfocitos T CD4+ se encuentra la diferenciación hacia distintas subpoblaciones que brindan protección contra enfermedades infecciosas. Entre estas subpoblaciones, se encuentran los linfocitos TFH que

facilitan las respuestas de centro germinal, anticuerpos y células plasmáticas de larga duración tanto en infecciones virales como en el caso de las vacunas **(64)**. Se ha reportado que en pacientes previamente infectados, la participación e incremento de esta subpoblación se asocia con una disminución de la gravedad de COVID-19 **(48,49,56)**. En nuestro estudio, encontramos un incremento en el porcentaje de linfocitos TFH posterior a la vacunación, por lo que este incremento puede ser debido a que se está favoreciendo la diferenciación hacia esta subpoblación para ayudar en la activación de los linfocitos B o linfocitos B de memoria para su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Es necesario evaluar las citocinas relacionadas a la diferenciación de esta subpoblación a fin de corroborar esta propuesta.

En el caso de los linfocitos T, es importante la presencia de memoria inmunológica para actuar de manera temprana y eficaz en una reinfección. Estos linfocitos se dividen en linfocitos T de memoria central (TCM) que se dirigen a los ganglios linfáticos y linfocitos T de memoria efectora (TEM) que se encuentran en la sangre y tejidos periféricos **(41,76)**. En nuestro estudio, posterior a la vacunación con Abdala observamos un valor similar en los porcentajes de linfocitos TCM, debido a que como se mencionó anteriormente estos se encuentran preferentemente en ganglio linfático, mientras que el incremento en los linfocitos TEM puede deberse a que la vacuna induce su proliferación para posteriormente llevar a cabo sus funciones efectoras **(41,77)**. En contraste, Goel et al. reportó en personas vacunadas con Pfizer y Moderna, una disminución de linfocitos TCM y porcentajes similares de linfocitos TEM a lo largo de 6 meses posteriores a la vacunación **(78)**. Sin embargo, ambos hallazgos pueden asociarse con una protección a largo plazo contra la enfermedad grave o reinfección en individuos vacunados

Una de las características con la cual se evalúa la eficacia de los anticuerpos es la afinidad o capacidad que tienen para reconocer a un antígeno. Diversos reportes han analizado la afinidad de los anticuerpos generados tanto en pacientes convalecientes de COVID-19, como en personas vacunadas con distintas plataformas vacunales en contra del SARS-CoV-2 **(75,79)**. En este sentido, para evaluar si los anticuerpos inducidos por Abdala tenían la capacidad de reconocer la proteína RBD, incubamos los sueros obtenidos post-Abdala con la proteína RBD recombinante, observamos una disminución en los niveles de anticuerpos, por lo que estos anticuerpos podrían generar una protección inmunológica al reconocer dicho antígeno y llevar a cabo su actividad neutralizante. Sin embargo, desconocemos la afinidad de estos anticuerpos por el antígeno RBD, por lo que sería necesario llevar a cabo ensayos de afinidad.

Por otra parte, para conocer si los linfocitos B conservan la capacidad de activarse en presencia de la proteína RBD después de la vacuna, los estimulamos con la proteína RBD recombinante. Los linfocitos B al activarse se diferencian en una población productora de anticuerpos denominada plasmablastos, los cuales actúan en una respuesta inmune temprana **(75)**. Diversos estudios reportan que los plasmablastos incrementan dentro de los 7 a 10 días posteriores al inicio de la infección o posterior a la vacunación **(75,80,81)**. En nuestro caso, observamos un incremento en el porcentaje de plasmablastos, por lo que los linfocitos B conservan su capacidad de activarse e inducir una protección a largo plazo. Sin embargo, se ha reportado que los plasmablastos son de vida corta y disminuyen después de la eliminación viral o un mes después de la vacunación **(65,75,80,82)**, por lo que podríamos realizar un seguimiento en nuestro grupo de estudio para conocer los cambios en esta población.

Además, debido a que la respuesta de linfocitos T es importante en infecciones virales, analizamos si la proteína RBD induce la activación de linfocitos T. Algunos estudios han reportado un incremento en los porcentajes de linfocitos T activados posterior a la vacunación contra SARS-CoV-2 **(43,77)**. En nuestro estudio, observamos un incremento en el porcentaje de linfocitos T activados, mediante la expresión de la molécula CD25 que actúa como receptor de alta afinidad de la IL-2, la cual se caracteriza por inducir la proliferación de linfocitos T **(83)**. Además, observamos un incremento en la concentración de IL-2 e IFN- γ , las cuales son secretadas principalmente por los linfocitos T cooperadores 1 (Th1) y se relacionan con la inducción de una respuesta inmune mediada por linfocitos T **(42)**. Se ha reportado en pacientes con COVID-19 y en personas vacunadas posterior a la 1ra dosis el incremento de IL-2 e IFN- γ , manteniendo sus niveles posterior a la 2da dosis **(42,55,77,84)**. Estos resultados, refuerzan que la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T conserva la capacidad de actuar en contra del antígeno, manteniendo la protección inmunológica a largo plazo.

En conclusión, la vacuna Abdala induce la producción de anticuerpos y mantiene la memoria inmunológica. Además, los linfocitos T y B mantienen la capacidad de reconocer al antígeno en encuentros posteriores. Finalmente, nuestros hallazgos pueden usarse como un primer acercamiento para demostrar los cambios que induce la vacuna Abdala en el sistema inmunológico cuando se utiliza como dosis de refuerzo.

CONCLUSIÓN

La vacuna Abdala induce la producción de anticuerpos IgG e incrementa la memoria inmunológica en personas previamente vacunadas con esquema completo y al menos una dosis de refuerzo. Además, los linfocitos T y B mantienen la capacidad de activarse en presencia del dominio RBD del SARS-CoV-2 posterior a la vacunación, por lo que la vacuna funciona como refuerzo.

FUENTES BIBLIOGRÁFICAS

1. Pasten, J. C. M. (s/f). Mapa en tiempo real de casos de coronavirus por Johns Hopkins School. *CVOED - Centro virtual de operaciones en emergencias y desastres*. Recuperado el 28 de abril de 2023, de http://cvoed.imss.gob.mx/mapa_coronavirus/
2. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., & Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, 324(8), 782–793. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>
3. Chams, N., Chams, S., Badran, R., Shams, A., Araji, A., Raad, M., Mukhopadhyay, S., Stroberg, E., Duval, E. J., Barton, L. M., & Hajj Hussein, I. (2020). COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Frontiers in Public Health*, 8, 383. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00383>
4. Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
5. Pastian-Soto, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
6. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
7. Saavedra Hernández, D., & García Verdecia, B. (2014). Inmunosenescencia: Efectos de la edad sobre el sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(4), 332–345.
8. Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshev, V. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>
9. Sanz, J. M., Gómez Lahoz, A. M., & Martín, R. O. (2021). Papel del sistema inmune en la infección por el SARS-CoV-2: Inmunopatología de la COVID-19. *Medicine*, 13(33), 1917–1931. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.05.005>
10. Primorac, D., Vrdoljak, K., Brlek, P., Pavelić, E., Molnar, V., Matišić, V., Erceg Ivkošić, I., & Parčina, M. (2022). Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Frontiers in Immunology*, 13, 848582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848582>
11. Sette, A., & Crotty, S. (2022). Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunological Reviews*, 310(1), 27–46. <https://doi.org/10.1111/imr.13089>
12. Wang, X., Cao, R., Zhang, H., Liu, J., Xu, M., Hu, H., Li, Y., Zhao, L., Li, W., Sun, X., Yang, X., Shi, Z., Deng, F., Hu, Z., Zhong, W., & Wang, M. (2020). The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discovery*, 6(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0169-8>
13. Zhu, Z., Lu, Z., Xu, T., Chen, C., Yang, G., Zha, T., Lu, J., & Xue, Y. (2020). Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *Journal of Infection*, 81(1), e21–e23. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.060>

14. Liu, Y.-M., Xie, J., Chen, M.-M., Zhang, X., Cheng, X., Li, H., Zhou, F., Qin, J.-J., Lei, F., Chen, Z., Lin, L., Yang, C., Mao, W., Chen, G., Lu, H., Xia, X., Wang, D., Liao, X., Yang, J., ... Li, H. (2021). Kidney Function Indicators Predict Adverse Outcomes of COVID-19. *Med*, 2(1), 38-48.e2. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.09.001>
15. Lian, N., Xie, H., Lin, S., Huang, J., Zhao, J., & Lin, Q. (2020). Umifenovir treatment is not associated with improved outcomes in patients with coronavirus disease 2019: A retrospective study. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 917–921. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.026>
16. Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F., & Matsuyama, S. (2012). Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *Journal of Virology*, 86(12), 6537–6545. <https://doi.org/10.1128/JVI.00094-12>
17. Zhou, Y., Vedantham, P., Lu, K., Agudelo, J., Carrion, R., Nunneley, J. W., Barnard, D., Pöhlmann, S., McKerrow, J. H., Renslo, A. R., & Simmons, G. (2015). Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*, 116, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.01.011>
18. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
19. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., & Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30(3), 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
20. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
21. Leung, E. L.-H., Pan, H.-D., Huang, Y.-F., Fan, X.-X., Wang, W.-Y., He, F., Cai, J., Zhou, H., & Liu, L. (2020). The Scientific Foundation of Chinese Herbal Medicine against COVID-19. *Engineering (Beijing, China)*, 6(10), 1099–1107. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.08.009>
22. Preliminary Report of the Favipiravir Observational Study in Japan (2020), Recuperado el 28 de abril del 2023, de https://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_casereport_en_200529.pdf
23. Horby, P., Shen Lim, W., Emberson, J. R., Mafham, M., Bell, J. L., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Green, C., Felton, T., Chadwick, D., Rege, K., Fegan, C., Chappell, L. C., Faust, S. N., Jaki, T., ... Martin J. Landray. (2021). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 384(8), 693–704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>
24. Xu, X., Han, M., Li, T., Sun, W., Wang, D., Fu, B., Zhou, Y., Zheng, X., Yang, Y., Li, X., Zhang, X., Pan, A., & Wei, H. (2020). Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(20), 10970–10975. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>
25. Diurno, F., Numis, F. G., Porta, G., Cirillo, F., Maddaluno, S., Ragozzino, A., De Negri, P., Di Gennaro, C., Pagano, A., Allegorico, E., Bressy, L., Bosso, G.,

- Ferrara, A., Serra, C., Montisci, A., D'Amico, M., Schiano Lo Morello, S., Di Costanzo, G., Tucci, A. G., ... Facchini, G. (2020). Eculizumab treatment in patients with COVID-19: Preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *24*(7), 4040–4047. https://doi.org/10.26355/eurrev_202004_20875
26. Stockman, L. J., Bellamy, R., & Garner, P. (2006). SARS: Systematic Review of Treatment Effects. *PLOS Medicine*, *3*(9), e343. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030343>
 27. Sallard, E., Lescure, F.-X., Yazdanpanah, Y., Mentre, F., & Peiffer-Smadja, N. (2020). Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Research*, *178*, 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
 28. Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M., Leopoldi, A., Garreta, E., Pozo, C. H. del, Prosper, F., Romero, J. P., Wirnsberger, G., Zhang, H., Slutsky, A. S., Conder, R., Montserrat, N., Mirazimi, A., & Penninger, J. M. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*, *181*(4), 905-913.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.004>
 29. Tian, X., Li, C., Huang, A., Xia, S., Lu, S., Shi, Z., Lu, L., Jiang, S., Yang, Z., Wu, Y., & Ying, T. (2020). Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 382–385. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729069>
 30. Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., Qi, F., Bao, L., Du, L., Liu, S., Qin, C., Sun, F., Shi, Z., Zhu, Y., Jiang, S., & Lu, L. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Research*, *30*(4), 343–355. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>
 31. Hill, A., Beitelshes, M., & Pfeifer, B. A. (2021). Vaccine Delivery and Immune Response Basics. En B. A. Pfeifer & A. Hill (Eds.), *Vaccine Delivery Technology* (Vol. 2183, pp. 1–8). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4_1
 32. Fiolet, T., Kherabi, Y., MacDonald, C.-J., Ghosn, J., & Peiffer-Smadja, N. (2022). Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: A narrative review. *Clinical Microbiology and Infection*, *28*(2), 202–221. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>
 33. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
 34. Ewer, K. J., Barrett, J. R., Belij-Rammerstorfer, S., Sharpe, H., Makinson, R., Morter, R., Flaxman, A., Wright, D., Bellamy, D., Bittaye, M., Dold, C., Provine, N. M., Aboagye, J., Fowler, J., Silk, S. E., Alderson, J., Aley, P. K., Angus, B., Berrie, E., ... Stafford, E. (2021). T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nature Medicine*, *27*(2), 270–278. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01194-5>
 35. Zhu, F.-C., Guan, X.-H., Li, Y.-H., Huang, J.-Y., Jiang, T., Hou, L.-H., Li, J.-X., Yang, B.-F., Wang, L., Wang, W.-J., Wu, S.-P., Wang, Z., Wu, X.-H., Xu, J.-J., Zhang, Z., Jia, S.-Y., Wang, B.-S., Hu, Y., Liu, J.-J., ... Chen, W. (2020). Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, *396*(10249), 479–488.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)

36. Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Hammitt, L. L., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
37. Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S. A., Rouphael, N., Creech, C. B., McGettigan, J., Khetan, S., Segall, N., Solis, J., Brosz, A., Fierro, C., Schwartz, H., Neuzil, K., Corey, L., ... Zaks, T. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 384(5), 403–416. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
38. Noor, R. (2022). Host Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the COVID-19 Vaccine-Induced Immunity against SARS-CoV-2 and Its Variants. *Viruses*, 14(11), 2541. <https://doi.org/10.3390/v14112541>
39. Más-Bermejo, P. I., Dickinson-Meneses, F. O., Almenares-Rodríguez, K., Sánchez-Valdés, L., Guinovart-Díaz, R., Vidal-Ledo, M., Galbán-García, E., Olivera-Nodarse, Y., Morgado-Vega, I., Dueñas-Carrera, S., Pujol, M., Hernández-Bernal, F., Limonta-Fernández, M., Guillén-Nieto, G., Muzio-González, V. L., & Ayala-Ávila, M. (2022). Cuban Abdala vaccine: Effectiveness in preventing severe disease and death from COVID-19 in Havana, Cuba; A cohort study. *The Lancet Regional Health - Americas*, 16, 100366. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100366>
40. Sanitarios, C. F. para la P. contra R. (s/f). *Vacunas COVID 19 autorizadas*. gob.mx. Recuperado el 28 de abril de 2023, de <http://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/vacunas-covid-19-autorizadas>
41. Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
42. Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., Silva, A. M. de, Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 181(7), 1489-1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
43. Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M., Wendisch, D., Georg, P., Kurth, F., Hippenstiel, S., Dingeldey, M., Kruse, B., Fauchere, F., Baysal, E., Mangold, M., Henze, L., Lauster, R., Mall, M. A., Beyer, K., Röhmel, J., Voigt, S., Schmitz, J., ... Thiel, A. (2020). SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 587(7833), 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
44. Moderbacher, C. R., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., Weiskopf, D., Belanger, S., Abbott, R. K., Kim, C., Choi, J., Kato, Y., Crotty, E. G., Kim, C., Rawlings, S. A., Mateus, J., Tse, L. P. V., Frazier, A., Baric, R., Peters, B., ... Crotty, S. (2020). Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 183(4), 996-1012.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
45. Peng, Y., Mentzer, A. J., Liu, G., Yao, X., Yin, Z., Dong, D., Dejnirattisai, W., Rostron, T., Supasa, P., Liu, C., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Zhao, Y.,

- Stuart, D. I., Paesen, G. C., Grimes, J. M., Antson, A. A., Bayfield, O. W., Hawkins, D. E. D. P., ... Dong, T. (2020). Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nature Immunology*, 21(11), 1336–1345. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
46. Grigoryan, L., & Pulendran, B. (2020). The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Seminars in Immunology*, 50, 101422. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101422>
47. Tan, A. T., Linster, M., Tan, C. W., Le Bert, N., Chia, W. N., Kunasegaran, K., Zhuang, Y., Tham, C. Y. L., Chia, A., Smith, G. J., Young, B., Kalimuddin, S., Low, J. G. H., Lye, D., Wang, L.-F., & Bertoletti, A. (2020). *Early induction of SARS-CoV-2 specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients*. *Immunology*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.15.341958>
48. Meckiff, B. J., Ramírez-Suástegui, C., Fajardo, V., Chee, S. J., Kusnadi, A., Simon, H., Eschweiler, S., Grifoni, A., Pelosi, E., Weiskopf, D., Sette, A., Ay, F., Seumois, G., Ottensmeier, C. H., & Vijayanand, P. (2020). Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell*, 183(5), 1340-1353.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.001>
49. Juno, J. A., Tan, H.-X., Lee, W. S., Reynaldi, A., Kelly, H. G., Wragg, K., Esterbauer, R., Kent, H. E., Batten, C. J., Mordant, F. L., Gherardin, N. A., Pymm, P., Dietrich, M. H., Scott, N. E., Tham, W.-H., Godfrey, D. I., Subbarao, K., Davenport, M. P., Kent, S. J., & Wheatley, A. K. (2020). Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(9), 1428–1434. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0995-0>
50. Long, Q.-X., Liu, B.-Z., Deng, H.-J., Wu, G.-C., Deng, K., Chen, Y.-K., Liao, P., Qiu, J.-F., Lin, Y., Cai, X.-F., Wang, D.-Q., Hu, Y., Ren, J.-H., Tang, N., Xu, Y.-Y., Yu, L.-H., Mo, Z., Gong, F., Zhang, X.-L., ... Huang, A.-L. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6), 845–848. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
51. Piccoli, L., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Walls, A. C., Beltramello, M., Silacci-Fregni, C., Pinto, D., Rosen, L. E., Bowen, J. E., Acton, O. J., Jaconi, S., Guarino, B., Minola, A., Zatta, F., Sprugasci, N., Bassi, J., Peter, A., Marco, A. D., ... Veessler, D. (2020). Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, 183(4), 1024-1042.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
52. Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., Bangaru, S., Torres, J. L., Okba, N. M. A., Claireaux, M., Kerster, G., Bentlage, A. E. H., van Haaren, M. M., Guerra, D., Burger, J. A., Schermer, E. E., Verheul, K. D., van der Velde, N., van der Kooi, A., van Schooten, J., ... van Gils, M. J. (2020). Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*, 369(6504), 643–650. <https://doi.org/10.1126/science.abc5902>
53. Anderson, E. M., Goodwin, E. C., Verma, A., Arevalo, C. P., Bolton, M. J., Weirick, M. E., Gouma, S., McAllister, C. M., Christensen, S. R., Weaver, J., Hicks, P., Manzoni, T. B., Oniyide, O., Ramage, H., Mathew, D., Baxter, A. E., Oldridge, D. A., Greenplate, A. R., Wu, J. E., ... Hensley, S. E. (2020). *Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection*. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2020.11.06.20227215>
54. Woodruff, M. C., Ramonell, R. P., Nguyen, D. C., Cashman, K. S., Saini, A. S.,

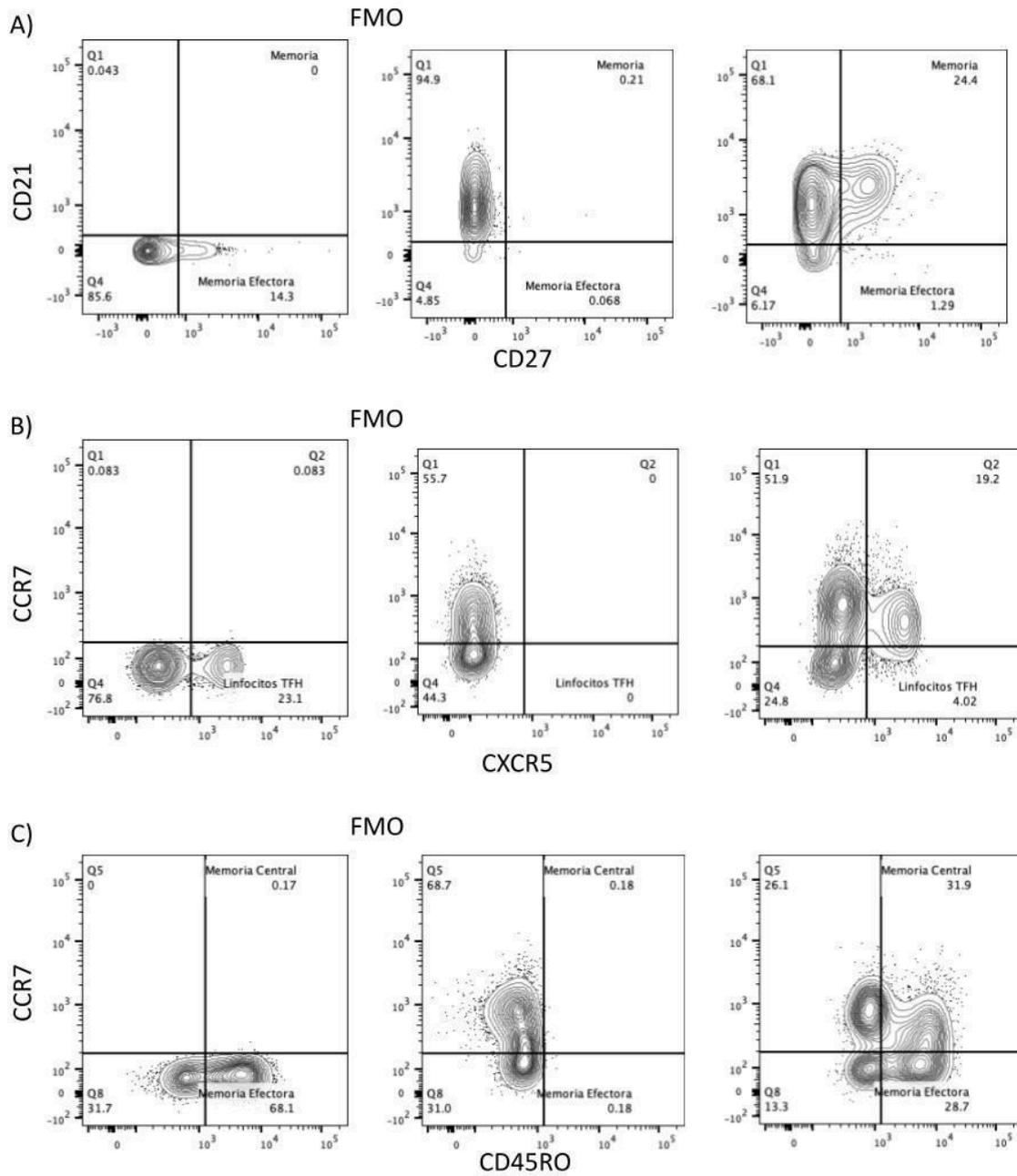
- Haddad, N. S., Ley, A. M., Kyu, S., Howell, J. C., Ozturk, T., Lee, S., Suryadevara, N., Case, J. B., Bugrovsky, R., Chen, W., Estrada, J., Morrison-Porter, A., Derrico, A., Anam, F. A., ... Sanz, I. (2020). Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nature Immunology*, *21*(12), 1506–1516. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>
55. Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O., Strålin, K., Gorin, J.-B., Olsson, A., Llewellyn-Lacey, S., Kamal, H., Bogdanovic, G., Muschiol, S., Wullimann, D. J., Kammann, T., Emgård, J., Parrot, T., Folkesson, E., Akber, M., Berglin, L., Bergsten, H., Brighenti, S., ... Buggert, M. (2020). Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, *183*(1), 158-168.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
 56. Zuo, J., Dowell, A., Pearce, H., Verma, K., Long, H., Begum, J., Aiano, F., Amin-Chowdhury, Z., Hallis, B., Stapley, L., Borrow, R., Linley, E., Ahmad, S., Parker, B., Horsley, A., Amirthalingam, G., Brown, K., Ramsay, M., Ladhani, S., & Moss, P. (2020). Robust SARS-CoV-2-specific T-cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Immunology*. <https://doi.org/10.1101/2020.11.01.362319>
 57. Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., ... Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, *371*(6529), eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
 58. Gudbjartsson, D. F., Norddahl, G. L., Melsted, P., Gunnarsdottir, K., Holm, H., Eythorsson, E., Arnthorsson, A. O., Helgason, D., Bjarnadottir, K., Ingvarsson, R. F., Thorsteinsdottir, B., Kristjansdottir, S., Birgisdottir, K., Kristinsdottir, A. M., Sigurdsson, M. I., Arnadottir, G. A., Ivarsdottir, E. V., Andresdottir, M., Jonsson, F., ... Stefansson, K. (2020). Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *New England Journal of Medicine*, *383*(18), 1724–1734. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026116>
 59. Wajnberg, A., Amanat, F., Firpo, A., Altman, D. R., Bailey, M. J., Mansour, M., McMahon, M., Meade, P., Mendu, D. R., Muellers, K., Stadlbauer, D., Stone, K., Strohmeier, S., Simon, V., Aberg, J., Reich, D. L., Krammer, F., & Cordon-Cardo, C. (2020). Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, *370*(6521), 1227–1230. <https://doi.org/10.1126/science.abd7728>
 60. Islas-Vazquez, L., Cruz-Aguilar, M., Velazquez-Soto, H., Jiménez-Corona, A., Pérez-Tapia, S. M., & Jimenez-Martinez, M. C. (2022). Effector-Memory B-Lymphocytes and Follicular Helper T-Lymphocytes as Central Players in the Immune Response in Vaccinated and Nonvaccinated Populations against SARS-CoV-2. *Vaccines*, *10*(10), 1761. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101761>
 61. Mak, W. A., Koeleman, J. G. M., Vliet, M. van der, Keuren, F., & Ong, D. S. Y. (2022). SARS-CoV-2 antibody and T cell responses one year after COVID-19 and the booster effect of vaccination: A prospective cohort study. *Journal of Infection*, *84*(2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.003>
 62. Zhang, Z., Mateus, J., Coelho, C. H., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Gálvez, R. I., Cortes, F. H., Grifoni, A., Tarke, A., Chang, J., Escarrega, E. A., Kim, C., Goodwin, B., Bloom, N. I., Frazier, A., Weiskopf, D., Sette, A., & Crotty, S. (2022). Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell*, *185*(14), 2434-2451.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.022>

63. Hernández-Bernal, F., Ricardo-Cobas, M. C., Martín-Bauta, Y., Navarro-Rodríguez, Z., Piñera-Martínez, M., Quintana-Guerra, J., Urrutia-Pérez, K., Urrutia-Pérez, K., Chávez-Chong, C. O., Azor-Hernández, J. L., Rodríguez-Reinoso, J. L., Lobaina-Lambert, L., Colina-Ávila, E., Bizet-Almeida, J., Rodríguez-Nuviola, J., Del Valle-Piñera, S., Ramírez-Domínguez, M., Tablada-Ferreiro, E., Alonso-Valdés, M., ... Muzio-González, V. L. (2022). Safety, tolerability, and immunogenicity of a SARS-CoV-2 recombinant spike RBD protein vaccine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1-2 clinical trial (ABDALA Study). *eClinicalMedicine*, *46*, 101383. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101383>
64. Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*, *50*(5), 1132–1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>
65. Hartley, G. E., Edwards, E. S. J., O’Hehir, R. E., & van Zelm, M. C. (2022). New insights into human immune memory from SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Allergy*, *77*(12), 3553–3566. <https://doi.org/10.1111/all.15502>
66. Busà, R., Sorrentino, M. C., Russelli, G., Amico, G., Miceli, V., Miele, M., Di Bella, M., Timoneri, F., Gallo, A., Zito, G., Di Carlo, D., Conaldi, P. G., & Bulati, M. (2022). Specific Anti-SARS-CoV-2 Humoral and Cellular Immune Responses After Booster Dose of BNT162b2 Pfizer-BioNTech mRNA-Based Vaccine: Integrated Study of Adaptive Immune System Components. *Frontiers in Immunology*, *13*, 856657. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856657>
67. Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: From basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, *21*(2), 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
68. Schultz, B. M., Melo-González, F., Duarte, L. F., Gálvez, N. M. S., Pacheco, G. A., Soto, J. A., Berríos-Rojas, R. V., González, L. A., Moreno-Tapia, D., Rivera-Pérez, D., Ríos, M., Vázquez, Y., Hoppe-Elsholz, G., Andrade-Parra, C. A., Vallejos, O. P., Piña-Iturbe, A., Iturriaga, C., Urzua, M., Navarrete, M. S., ... Bueno, S. M. (2022). A Booster Dose of CoronaVac Increases Neutralizing Antibodies and T Cells that Recognize Delta and Omicron Variants of Concern. *mBio*, *13*(4), e01423-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01423-22>
69. Gómez De La Torre, J. C., Cáceres-DelAguila, J. A., Muro-Rojo, C., De La Cruz-Escurrea, N., Copaja-Corzo, C., Hueda-Zavaleta, M., Arenas Siles, D., & Benites-Zapata, V. A. (2022). Humoral Immune Response Induced by the BBIBP-CorV Vaccine (Sinopharm) in Healthcare Workers: A Cohort Study. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *7*(5), 66. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7050066>
70. Noor, R. (2022). A review on the induction of host immunity by the current COVID-19 vaccines and a brief non-pharmaceutical intervention to mitigate the pandemic. *Bulletin of the National Research Centre*, *46*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00719-x>
71. Noor, R. (2021). Developmental Status of the Potential Vaccines for the Mitigation of the COVID-19 Pandemic and a Focus on the Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Moderna mRNA Vaccines. *Current Clinical Microbiology Reports*, *8*(3), 178–185. <https://doi.org/10.1007/s40588-021-00162-y>
72. Tseng, H. F., Ackerson, B. K., Luo, Y., Sy, L. S., Talarico, C. A., Tian, Y., Bruxvoort, K. J., Tubert, J. E., Florea, A., Ku, J. H., Lee, G. S., Choi, S. K., Takhar, H. S., Aragonés, M., & Qian, L. (2022). Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants. *Nature Medicine*, *28*(5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01753-y>

73. Gruell, H., Vanshylla, K., Tober-Lau, P., Hillus, D., Schommers, P., Lehmann, C., Kurth, F., Sander, L. E., & Klein, F. (2022). mRNA booster immunization elicits potent neutralizing serum activity against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature Medicine*, 28(3), 477–480. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01676-0>
74. Kuloğlu, Z. E., El, R., Guney-Esken, G., Tok, Y., Talay, Z. G., Barlas, T., Kuskucu, M. A., Albayrak, Ö., Doğan, Ö., Yavuz, S. Ş., Midilli, K., Ergönül, Ö., & Can, F. (2022). Effect of BTN162b2 and CoronaVac boosters on humoral and cellular immunity of individuals previously fully vaccinated with CoronaVac against SARS-CoV-2: A longitudinal study. *Allergy*, 77(8), 2459–2467. <https://doi.org/10.1111/all.15316>
75. Byazrova, M., Yusubalieva, G., Spiridonova, A., Efimov, G., Mazurov, D., Baranov, K., Baklaushev, V., & Filatov, A. (2021). Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. *Clinical & Translational Immunology*, 10(2), e1245. <https://doi.org/10.1002/cti2.1245>
76. Jarjour, N. N., Masopust, D., & Jameson, S. C. (2021). T Cell Memory: Understanding COVID-19. *Immunity*, 54(1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.009>
77. Huang, W.-T., Weng, S.-W., Tzeng, H.-T., Yen, F.-C., Chiang, Y.-S., & You, H.-L. (2022). Lymphocyte Subpopulations Associated with Neutralizing Antibody Levels of SARS-CoV-2 for COVID-19 Vaccination. *Vaccines*, 10(9), 1550. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091550>
78. Goel, R. R., Painter, M. M., Apostolidis, S. A., Mathew, D., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Lundgreen, K. A., Reynaldi, A., Houry, D. S., Pattekar, A., Gouma, S., Kuri-Cervantes, L., Hicks, P., Dysinger, S., Hicks, A., Sharma, H., Herring, S., Korte, S., Baxter, A. E., ... Wherry, E. J. (2021). mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*, 374(6572), abm0829. <https://doi.org/10.1126/science.abm0829>
79. Kim, W., Zhou, J. Q., Horvath, S. C., Schmitz, A. J., Sturtz, A. J., Lei, T., Liu, Z., Kalaidina, E., Thapa, M., Alsoussi, W. B., Haile, A., Klebert, M. K., Suessen, T., Parra-Rodriguez, L., Mudd, P. A., Whelan, S. P. J., Middleton, W. D., Teefey, S. A., Pusic, I., ... Ellebedy, A. H. (2022). Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature*, 604(7904), 141–145. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04527-1>
80. Kratzer, B., Trapin, D., Ettel, P., Körmöczi, U., Rottal, A., Tuppy, F., Feichter, M., Gattinger, P., Borochova, K., Dorofeeva, Y., Tulaeva, I., Weber, M., Grabmeier-Pfistershammer, K., Tauber, P. A., Gerdov, M., Mühl, B., Perkmann, T., Fae, I., Wenda, S., ... Pickl, W. F. (2021). Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy*, 76(3), 751–765. <https://doi.org/10.1111/all.14647>
81. Mathew, D., Giles, J. R., Baxter, A. E., Oldridge, D. A., Greenplate, A. R., Wu, J. E., Alanio, C., Kuri-Cervantes, L., Pampena, M. B., D'Andrea, K., Manne, S., Chen, Z., Huang, Y. J., Reilly, J. P., Weisman, A. R., Ittner, C. A. G., Kuthuru, O., Dougherty, J., Nzingha, K., ... Wherry, E. J. (2020). Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 369(6508), eabc8511. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
82. Cromer, D., Juno, J. A., Houry, D., Reynaldi, A., Wheatley, A. K., Kent, S. J., & Davenport, M. P. (2021). Prospects for durable immune control of SARS-CoV-2 and prevention of reinfection. *Nature Reviews Immunology*, 21(6), 395–404. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00550-x>

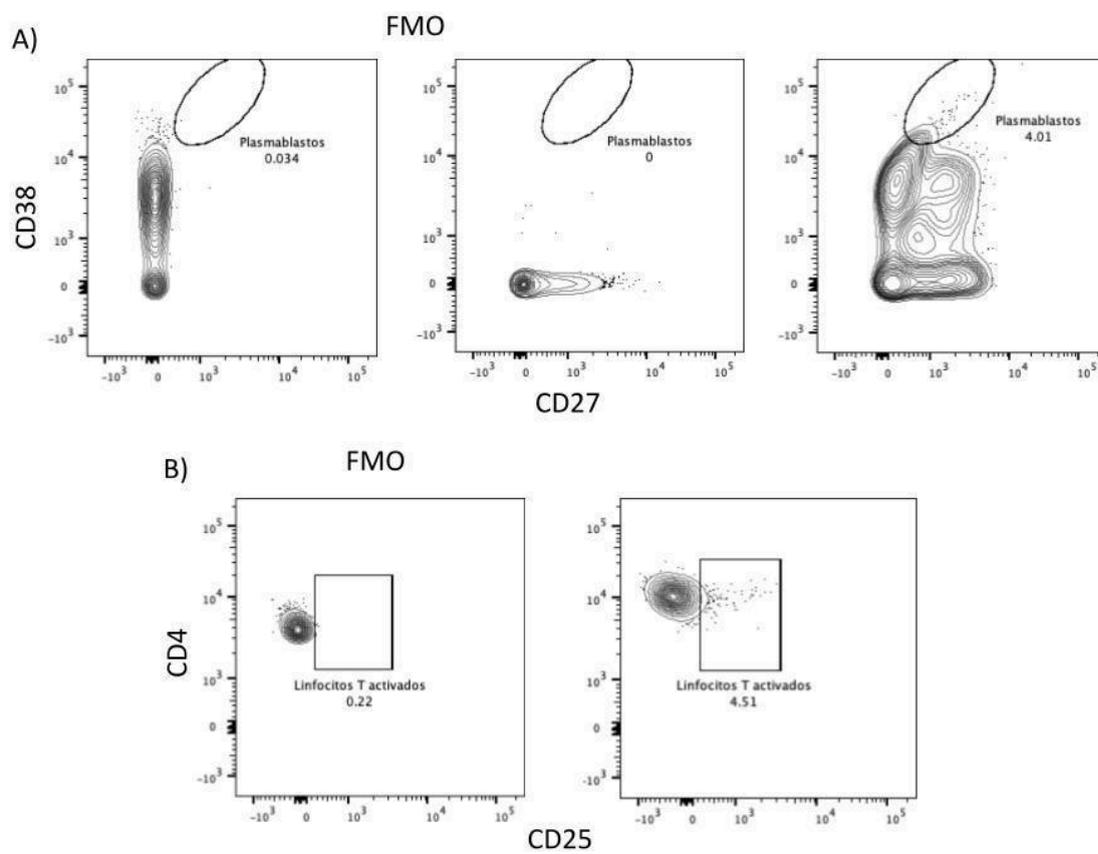
83. Peng, Y., Tao, Y., Zhang, Y., Wang, J., Yang, J., & Wang, Y. (2023). CD25: A potential tumor therapeutic target. *International Journal of Cancer*, 152(7), 1290–1303. <https://doi.org/10.1002/ijc.34281>
84. Rodda, L. B., Netland, J., Shehata, L., Pruner, K. B., Morawski, P. A., Thouvenel, C. D., Takehara, K. K., Eggenberger, J., Hemann, E. A., Waterman, H. R., Fahning, M. L., Chen, Y., Hale, M., Rathe, J., Stokes, C., Wrenn, S., Fiala, B., Carter, L., Hamerman, J. A., ... Pepper, M. (2021). Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*, 184(1), 169-183.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.029>

ANEXO 1



Fluorescencia menos uno (FMO) de CD21 y CD27 para definir los **A)** linfocitos B de memoria, CCR7 y CXCR5 para definir los **B)** linfocitos TFH y CCR7 y CD45RO para definir los **C)** linfocitos T de memoria.

ANEXO 2



Fluorescencia menos uno (FMO) de CD38 y CD27 para definir los **A)** plasmablastos y CD4 y CD25 para definir los **B)** linfocitos T activados.