



Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Estudio de la respuesta de anticuerpos de  
pacientes infectados con el virus SARS-CoV-2 y  
sus contactos cercanos.

Para obtener el título de:  
Licenciada en Farmacia

Presenta:  
Rivero Arredondo Silvia Vanessa

Asesores:  
Dr. Constantino III Roberto López Macías

Cuautitlán Izcalli, Edo. De México



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Contenido

1.	Abreviaturas .....	4
2.	Índice de Figuras .....	7
3.	Índice de Tablas .....	7
4.	Resumen.....	8
5.	Introducción.....	9
6.	Marco teórico .....	10
a.	Los coronavirus.....	10
i.	Estructura y mecanismo de acción de los coronavirus.....	11
b.	Epidemiología .....	14
c.	Aspectos clínicos.....	14
i.	Factores de riesgo.....	16
d.	Respuesta inmunitaria contra Coronavirus.....	17
i.	Respuesta inmunitaria innata .....	18
ii.	Respuesta inmunitaria adaptativa.....	21
iii.	Respuesta de anticuerpos.....	23
7.	Planteamiento del problema .....	25
8.	Justificación .....	26
9.	Hipótesis .....	27
10.	Objetivo general.....	28
a.	Objetivo particular.....	28
11.	Materiales y métodos.....	29
a.	Diseño general del estudio.....	29
b.	Universo de trabajo .....	29
c.	Criterios de selección de la muestra.....	29
i.	Criterios de inclusión.....	29
ii.	Criterios de no inclusión .....	29
iii.	Criterios de exclusión.....	30
d.	Tamaño de muestra .....	30
e.	Obtención y procesamiento de muestras .....	30
i.	Recolección de datos clínicos .....	30
ii.	Recolección de las muestras.....	31
f.	Respuesta de anticuerpos. ....	31

i.	Preparación de la muestra .....	31
ii.	Interpretación de los resultados .....	32
g.	Anticuerpos neutralizantes .....	32
i.	Interpretación de resultados .....	33
h.	Aspectos éticos.....	33
12.	Resultados.....	35
a.	Muestra de estudio.....	35
b.	Aspectos clínicos .....	36
c.	Índice de anticuerpos de pacientes COVID-19 hospitalizados.....	38
d.	Seroconversión de anticuerpos de pacientes COVID-19 hospitalizados.....	39
e.	Seroprevalencia de anticuerpos de pacientes COVID-19 convalecientes y contactos .....	40
f.	Capacidad de neutralización de los anticuerpos en diferentes grupos de pacientes .....	42
13.	Discusión de resultados .....	43
14.	Conclusiones.....	51
15.	Referencias .....	52
16.	Anexo 1. Carta de aprobación del proyecto .....	67

## 1. Abreviaturas

°C	Grado Celsius
ACE2	Enzima Convertidor de Angiotensina 2
APC	Antigen-presenting Cells (Células Presentadoras de Antígeno)
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
BAL	Lavado Bronco alveolar
CF	Factor de calibración
CK	Creatina Cinasa
CLIA	Ensayo de quimioluminiscencia
CLR	C-Type Lectin Receptor (Receptor de Lectina Tipo C)
CMN SXXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
COVID-19	Coronavirus disease-2019
DC	Dendritic cells (Células dendríticas)
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DO	Densidad Óptica
E	Proteína de Envoltura
ECs	Endothelial cells (Células endoteliales)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas)
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment (Compartimiento intermedio retículo endoplásmico-Golgi)
ESPII	Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional
E2	Estradiol
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GISAID	Global Initiative on Sharing All Influenza Data
HAS	Hipertensión arterial sistémica
HAT	Proteasa similar a la tripsina
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxidasa de rábano)
IAM	Infarto Agudo de Miocardio

IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRC	Insuficiencia renal crónica
kb	Kilobases
LGS	Ley General de Salud
M	Proteína de Membrana
MCP-1	Proteína Químico-atrayente de Monocitos 1
MERS	Síndrome Respiratorio de Oriente Medio
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complejo Principal de Histocompatibilidad)
min	Minuto
µL	Microlitro
mL	Mililitro
N	Proteína nucleocápside
nAb	Anticuerpos neutralizantes
NK	Natural Killer
NLR	NOD-like receptor (Receptores tipo NOD)
nm	Nanómetro
nsps	Proteínas no-estructurales
NYHA	New York Heart Association
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
PAFI	Presión parcial de oxígeno arterial y la fracción inspirada de oxígeno
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos)
PCR	Proteína C Reactiva
PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptores de Reconocimiento de Patrones)

RBD	Receptor Binding Domain (Dominio de Unión al Receptor)
RE	Retículo Endoplásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)
Rx	Rayos X
S	Proteína Spike
SAM	Síndrome de Activación Macrofágica
SARS	Síndrome Agudo Respiratorio Severo
SDRA	Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
sg RNA	RNA subgenómico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIRA	Síndrome de Insuficiencia Respiratoria Aguda
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSA	Secretaria de Salud
Tc	Tomografía Computarizada
TLR	Toll like receptor (Receptores tipo Toll)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UIMIQ	Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
UMAE	Unidad Médica de Alta Especialidad
VC	Valor de Corte
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VMI	Ventilación Mecánica Invasiva

## 2. Índice de Figuras

Figura 1. Representación gráfica de la estructura de SARS-CoV-2. Proteínas estructurales de los coronavirus. [Modificado de BioRender (2022). Human Coronavirus Structure] .....	11
Figura 2. Ciclo de replicación de los coronavirus humanos [Modificado de (Hartenian et al., 2020)] .....	12
Figura 3. Índice de anticuerpos $\alpha$ -SARS-CoV-2 en pacientes graves y críticos. ...	39
Figura 4. Seroconversión de anticuerpos IgM e IgG en pacientes críticos y graves a partir del inicio de síntomas.....	40
Figura 5. Seroprevalencia de anticuerpos $\alpha$ -SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes y contactos .....	41
Figura 6. Capacidad de neutralización de los anticuerpos de las diferentes cohortes de pacientes COVID-19 .....	42

## 3. Índice de Tablas

Tabla 1. Síntomas clínicos asociados a COVID-19 .....	15
Tabla 2. Características de los grupos de pacientes y contactos cercanos.....	35
Tabla 3. Aspectos clínicos generales de pacientes COVID-19 hospitalizados .....	37

#### **4. Resumen**

La alta tasa de contagio y mortalidad de la COVID-19, derivado de la infección por el virus SARS-CoV-2, llevaron a que en enero de 2020 se declarara una emergencia sanitaria a nivel internacional. Las implicaciones relacionadas con las medidas de contención se basan en el distanciamiento social, que tienen aspectos sociales, económicos y psicológicos. Biológicamente se espera que también existan secuelas en aquellas personas que padezcan y sobrevivan a la enfermedad, sobre todo en aquellos que presenten cuadros graves o críticos de COVID-19.

Hasta la fecha, a pesar que se ha demostrado que la infección por el virus SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19 induce inmunidad, existe heterogeneidad entre los métodos, participantes y ensayos realizados, lo que limita conocer la cinética de anticuerpos, así como su relación con la severidad y pronóstico de los pacientes.

En el presente proyecto se plantea el estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes COVID-19, personas convalecientes y contactos cercanos (familiares y personal de salud tratante); mediante la determinación de anticuerpos de clase IgM e IgG a través de pruebas inmunoquímicas convencionales como ELISA.

Además, se plantea analizar en pacientes hospitalizados la relación entre la respuesta de anticuerpos y parámetros bioquímicos; así como la seroprevalencia y capacidad neutralizante de los anticuerpos en pacientes COVID-19.

## 5. Introducción

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome agudo respiratorio severo (SARS-CoV-2) puede producir un amplio espectro de síntomas y severidad de la enfermedad, desde casos asintomáticos y leves, hasta desenlaces fatales. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta el 21 de septiembre de 2021 se han reportado 228 millones de casos y 4.5 millones de muertes asociadas con el COVID-19. En México, hasta la misma fecha se han confirmado 3.6 millones de casos positivos y 275,000 muertes.

Hasta la fecha, los distintos estudios realizados durante la pandemia han demostrado que la gran mayoría de pacientes COVID-19 generan una fuerte respuesta de anticuerpos en contra del virus, en particular contra la proteína N, S y el dominio de unión al receptor (RBD). Algunos estudios reportan que la respuesta es medible en tiempos tempranos después de la aparición de los síntomas; sin embargo, se ha observado que hay una gran variabilidad entre los pacientes de acuerdo a la severidad de su enfermedad. Estos anticuerpos regulan de manera importante la respuesta inmunitaria, neutralizando las partículas virales y regulando la respuesta inflamatoria mediante la unión a receptores Fc $\alpha$ R en monocitos y macrófagos inflamatorios en diversos sistemas, como el respiratorio y digestivo.

## **6. Marco teórico**

Los coronavirus, descritos por primera vez en la década de los años 60, son capaces de provocar infecciones respiratorias e intestinales en humanos y animales (Cui et al., 2019). A pesar que en un inicio, los coronavirus circulantes causaban infecciones leves; no fue hasta el 2002, con el brote del Síndrome agudo respiratorio severo (SARS, por sus siglas en inglés Severe acute respiratory syndrome), en la provincia de Guandong, China, que comenzaron a ser considerados altamente patogénicos para los humanos (Zhong et al., 2003).

Diez años después del SARS, emergió otro coronavirus patogénico, el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS, por sus siglas en inglés Middle East respiratory syndrome), el cual se detectó por primera vez en Arabia Saudita (Zaki et al., 2012).

El 31 de diciembre de 2019, autoridades de salud en China informaron a través de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de un brote de neumonía de etiología desconocida en Wuhan, China (H. Lu et al., 2020); y que estaría asociado a un nuevo coronavirus.

Desde entonces, el SARS-CoV-2 fue considerado como el séptimo coronavirus que afecta a los humanos, junto a los otros coronavirus ya conocidos: HKU1, NL63, OC43, 229E, que causan enfermedades respiratorias del tracto superior en pacientes inmunocomprometidos, así como niños y adultos mayores (Su et al., 2016).

### **a. Los coronavirus**

Los coronavirus forman parte de la subfamilia *Coronavirinae* de la familia *Coronaviridae*. Esta subfamilia se divide en cuatro géneros: alfa, beta, gama y delta. Los géneros alfa y beta únicamente infectan mamíferos; mientras que, los gama y delta infectan principalmente aves (Woo et al., 2012).

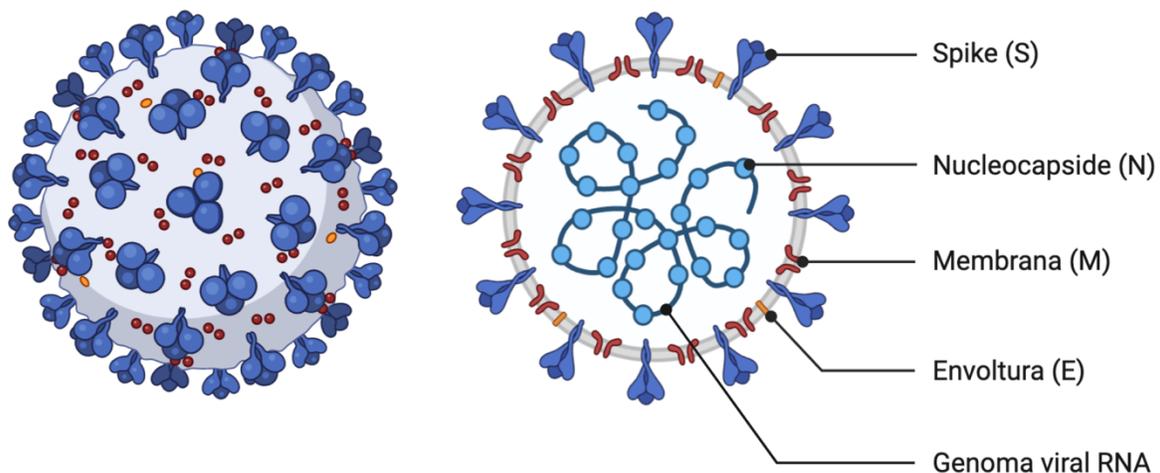
Para los humanos, los coronavirus forman parte del gran espectro de virus, que causan resfriados y enfermedades respiratorias severas (Cui et al., 2019).

### i. Estructura y mecanismo de acción de los coronavirus

Los coronavirus son un grupo de virus con envoltura, no segmentados y con material genético (RNA) de cadena sencilla (Fung & Liu, 2019). Sus partículas son esféricas o pleomórficas y tienen un diámetro de 70 a 120nm (Graham et al., 2013).

El genoma de los coronavirus es de sentido positivo con un tamaño de 27 a 30kb y contiene un número variado de marcos abiertos de lectura (ORF). La replicasa de los coronavirus esta codificada por dos ORFs superpuestos (ORF1a y ORF1b) que ocupan dos tercios del genoma y codifican para dos poliproteínas y 16 proteínas no estructurales (Hokello et al., 2020). Los genes estructurales y accesorios, por su parte, se traducen de RNAs subgenómicos (sgRNAs) generados durante la transcripción y replicación (V'kovski et al., 2020).

El resto de los ORFs codifican para cuatro proteínas estructurales, Nucleocápside (N), proteína de Membrana (M), Spike (S) y la proteína de Envoltura (E), además de otras proteínas no estructurales (Figura 1) (Boopathi et al., 2020).



*Figura 1. Representación gráfica de la estructura de SARS-CoV-2. Proteínas estructurales de los coronavirus. [Modificado de BioRender (2022). Human Coronavirus Structure]*

Al interior del virus la proteína N se une al RNA formando una nucleocápside simétrica helicoidal que juega un papel importante en la replicación y transcripción del virus (Sarma et al., 2020). En la superficie viral, la proteína M es la más abundante y se cree que es el organizador central del ensamblaje de los coronavirus; mientras que, la proteína S media el anclaje y fusión del virus a los

receptores de las células huésped para facilitar la entrada viral (Kirchdoerfer et al., 2016).

La proteína E, es el componente más pequeño y menos abundante de la superficie; sin embargo, tiene un papel importante relacionado con el ensamblaje del virus, permeabilidad e interacción entre la célula del virus y el huésped (Gupta et al., 2020).

Diversos estudios han revelado la estructura completa del spike (proteína S) en su estado abierto o cerrado. Esta glicoproteína se compone de tres cadenas iguales organizadas en dos dominios: la subunidad S1 y S2, asociadas con el reconocimiento celular y la fusión viral respectivamente (Wrapp et al., 2020).

El ciclo de replicación de los coronavirus se divide en varios pasos: unión y entrada, traducción de la replicasa viral, transcripción del genoma y replicación, traducción de proteínas estructurales y, ensamblaje y liberación de los viriones (Figura 2).

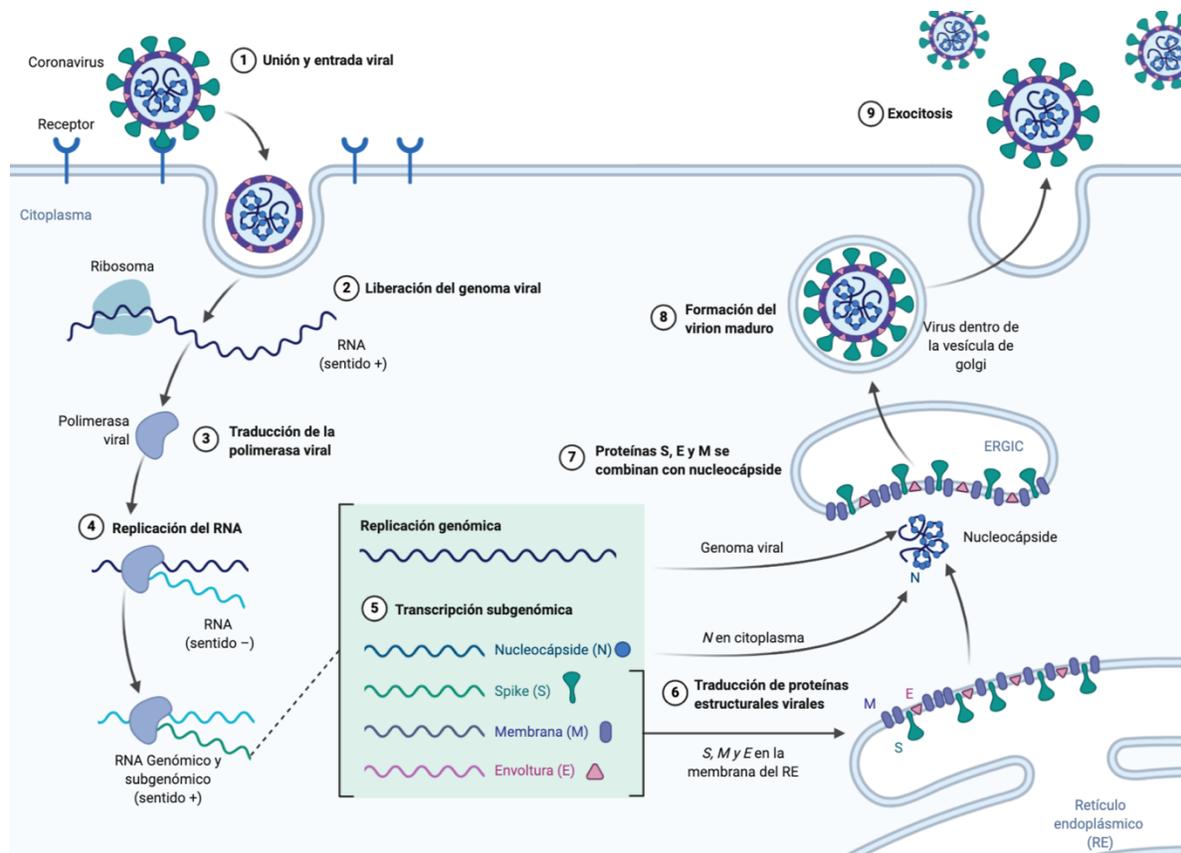


Figura 2. Ciclo de replicación de los coronavirus humanos [Modificado de (Hartenian et al., 2020)]

Los coronavirus se unen a la superficie del receptor e insertan su material genético dentro del citoplasma del hospedero mediante endocitosis o directamente por fusión membranal. Al ingresar al huésped, se inicia la replicación del RNA viral con la síntesis de poliproteínas (pp1a/pp1ab). La transcripción ocurre mediante la síntesis de secuencias de RNA subgenómicos (sgRNA) y termina con las secuencias reguladoras de transcripción, ubicadas entre los llamados marcos de lectura abiertos (ORF), que guían la producción de polipéptidos para producir proteínas no estructurales (NSP 1-16) y estructurales, incluidas proteínas del spike, membrana, envoltura y nucleocápside. Finalmente, los NSP y las proteínas estructurales promueven el ensamblaje y la liberación del virus.

El mecanismo de entrada del virus implica el reconocimiento del dominio de unión del receptor (RBD), que se encuentra en la proteína S, por la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). El receptor ACE2 se expresa en los pulmones, intestino delgado, testículo, riñones, corazón, tiroides, tejido adiposo, cerebro, vaso sanguíneo y músculos (M. Y. Li et al., 2020). Después de la fusión, algunas proteasas del huésped como la serina proteasa transmembranal tipo 2 (TMPRSS2) (Hoffmann et al., 2020), cisteína proteasas endosomales, catepsina B y L (CatB/L) y la proteasa similar a la tripsina (HAT), anclan la proteína S e inician los cambios conformacionales necesarios para la fusión del virus con la membrana, permitiendo que la nucleocápside se libere al citoplasma (Fung & Liu, 2019).

Durante el ciclo de vida intracelular, los coronavirus expresan y replican su RNA genómico para producir grandes copias que son incorporadas en las nuevas partículas virales que se producen. Después de la entrada del virus en las células, se libera el RNA genómico, que rápidamente traduce dos marcos abiertos de lectura (ORF1a y ORF1b). Las poliproteínas resultantes son co-transcritas y procesadas en proteínas individuales no-estructurales (nsps) que forman el complejo de replicación y transcripción. Junto con la expresión de nsps, la biogénesis de organelos virales de replicación crea un microambiente protector para la replicación del RNA genómico y transcripción de RNAs subgenómicos (sg RNAs). Las proteínas estructurales que se traducen se traslocan a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y transitan a través del compartimiento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC), donde interactúan con la N-encapsulada; por otra parte, el RNA genómico recién producido da como resultado la gemación en el lumen de vesículas secretoras. Finalmente, los viriones son secretados de las células infectadas por exocitosis (V'kovski et al., 2020).

## **b. Epidemiología**

En diciembre de 2019, se confirmaron 41 casos de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, uno de los principales centros de transporte en China (Du Toit, 2020).

Mediante análisis molecular, empleando secuenciación masiva en distintas muestras como fluido de pulmón, raspado nasofaríngeo y sangre, de pacientes que presentaron sintomatología respiratoria y antecedentes de haber visitado el mercado local de pescados y animales salvajes (R. Lu et al., 2020), el 7 de enero se identificó un nuevo coronavirus denominado 2019-nCoV (Corman et al., 2020).

El 13 y 15 de enero, fueron reportados los primeros casos importados en Tailandia y Japón; y a partir del 21 de enero, la OMS comenzó a publicar reportes de los contagios en países afectados (Phan et al., 2020).

El 30 de enero, la OMS anunció la situación como una nueva Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII); es decir, un evento que representa riesgo de dispersión internacional de una enfermedad, la cual requiere una respuesta coordinada. Adicionalmente, designó a la enfermedad como COVID-19 (acrónimo de Coronavirus disease-2019) (López-Ortiz et al., 2020).

En México, el primer caso confirmado de COVID-19 se presentó en la Ciudad de México el 27 de febrero, se trataba de un mexicano con antecedentes de viaje a Italia (*Coronavirus En México: Confirman Los Primeros Casos de Covid-19 En El País - BBC News Mundo*, n.d.).

Hasta el 21 de septiembre de 2021, a nivel mundial se han reportado 228 millones de casos confirmados; mientras que, hasta la misma fecha en México, la Secretaría de Salud (SSA) reportó 3.6 millones de casos confirmados y 275,000 defunciones por COVID-19 (*Nuevo Coronavirus En El Mundo COVID-19. Comunicado Técnico Diario | Secretaría de Salud | Gobierno | Gob.Mx*, n.d.).

## **c. Aspectos clínicos**

La presentación de los aspectos clínicos por la infección por SARS-CoV-2 es similar a los de SARS-CoV y MERS-CoV. El periodo de incubación de la COVID-19 puede

variar de 2 a 14 días, pero el promedio es de 3 a 17 días después de la exposición (Chen et al., 2020). La respuesta provocada puede ser variable entre los pacientes; sin embargo, se ha observado que involucra afectaciones a nivel respiratorio, entérico, hepático y neurológico (He et al., 2020).

Evidencias sugieren que el SARS-CoV-2 es altamente transmisible de persona a persona, afectando principalmente a adultos mayores y personas con enfermedades crónico degenerativas, a través de gotas o contacto cercano (M. Zhou et al., 2020).

El espectro de síntomas va desde pacientes sin síntomas (asintomáticos), pero diagnosticados con RT-PCR; hasta aquellos que presentan síntomas más comunes como fiebre, fatiga, tos seca, mialgia y disnea. Los síntomas menos comunes incluyen producción de esputo, dolores de cabeza, hemoptisis y problemas gastrointestinales como náusea, vómito y diarrea (Q. Li et al., 2020).

Una parte de los pacientes pueden sufrir de falta de aliento, normalmente en la segunda semana de la infección, y puede estar acompañado o progresar a hipoxemia. Además algunos pacientes pueden progresar a neumonía (M. Zhou et al., 2020).

Al igual que la diferencia en las manifestaciones clínicas, pueden presentarse diferencias en los periodos de incubación por diferentes sustancias producidas por células presentes en el epitelio respiratorio (Lee et al., 2020). Sin embargo, de acuerdo a la severidad de los síntomas los pacientes pueden ser clasificados como leves, moderados, graves y críticos (Tabla 1).

Tabla 1. Síntomas clínicos asociados a COVID-19

Tipo	Síntomas
Leve	Relacionados con infecciones en el tracto respiratorio superior, fiebre, fatiga, mialgia, tos, dolor de garganta, escurrimiento nasal y estornudos; sin neumonía.
Moderado	Con neumonía, fiebre y tos frecuente, algunos pueden presentar jadeos, pero no hipoxemia o falta de respiración.

Grave	Disnea con cianosis central, frecuencia respiratoria $\geq 30/\text{min}$ , saturación de oxígeno $\leq 93\%$ , y/o infiltrado pulmonar $>50\%$ durante 24/48h.
Crítico	Falla respiratoria, choque séptico, y/o falla múltiple orgánica

Modificado de (He et al., 2020)

Esta clasificación clínica es importante porque da pistas sobre la prognosis y mortalidad causada por COVID-19. La mayoría de los casos (81%) se clasificaron como leves o moderados en adultos; mientras que en niños la mayoría de ellos fueron leves (Bulut & Kato, 2020).

Los análisis de laboratorio demostraron que pacientes con COVID-19 presentaban leucopenia y linfopenia; y elevados niveles de lactato deshidrogenasa y creatinina cinasa. La mitad de los pacientes tenían una función hepática anormal, con niveles elevados de alanina o aspartato aminotransferasa. Adicionalmente, la mayoría de los pacientes presentaban niveles normales de procalcitonina en suero, pero la proteína C-reactiva (PCR) se encontraba arriba de lo normal; y un tercio de ellos presentaban dímero-D elevado (C. Huang et al., 2020).

#### **i. Factores de riesgo**

Factores ambientales, epigenéticos y genéticos afectan en el progreso de la enfermedad y la tasa de supervivencia. Por tanto, las características propias de cada población explican el por que hay países donde el impacto por la exposición al virus es mayor.

A pesar que las infecciones por COVID-19 se han presentado en todos los grupos de edad, los pacientes con edad avanzada son más susceptibles a contagiarse (Dudley & Lee, 2020).

En un meta-análisis en el que se evaluaron a 46,248 pacientes de ocho estudios, se detecto que la mayoría de los pacientes críticos, presentaba comorbilidades como hipertensión, diabetes mellitus, problemas cardiovasculares y enfermedades respiratorias (J. Yang et al., 2020a). Adicionalmente, otro estudio demostró que la hipertensión, problemas cardiovasculares, diabetes mellitus, fumar, enfermedad

pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades renales crónicas eran más frecuentes en pacientes hospitalizados (Amir et al., 2020).

#### **d. Respuesta inmunitaria contra Coronavirus**

El sistema inmunológico monitorea la entrada de patógenos, combate infecciones y contribuye a la renovación y remodelación del tejido después del daño tisular. El tracto respiratorio es la principal puerta de entrada para los virus y es un desafío para el sistema inmunitario eliminar las partículas virales y células infectadas sin causar daño e inflamación que comprometa la función pulmonar. Este equilibrio se logra a través de mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos; así como, mecanismos inmunoreguladores y anti-inflamatorios (Shi et al., 2020).

Las infecciones virales generalmente están relacionadas con una respuesta inmunitaria crucial para la eliminación del virus, que involucra una cascada de eventos de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Sin embargo, debido a que la COVID-19 es una enfermedad emergente, no se conoce mucho sobre los cambios inmunológicos que ocurren en los pacientes (Golsorkhi & Ravanshad, 2020).

Después de la infección, el sistema inmunitario innato es activado para combatir al patógeno mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que desencadenan una cascada de señalización intracelular que conlleva a la síntesis de mediadores inflamatorios (Addi et al., 2008). Los macrófagos infectados por el virus presentan niveles excesivos de citocinas inflamatorias, las cuales se cree que son responsables de la respuesta inmunitaria desregulada por SARS-CoV (Channappanavar & Perlman, 2017). Después de eso, la respuesta inmunitaria adaptativa aparece; las células T, incluidas las CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son cruciales para este paso. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos específicos contra el virus, mientras que los CD8<sup>+</sup> matan directamente las células infectadas (Traggiai et al., 2004). Adicionalmente, las células T regulan al sistema inmunitario para prevenir su sobre activación; sin embargo, SARS-CoV puede romper este mecanismo al iniciar la apoptosis de células T mediada por TNF, que

da como resultado una respuesta inmunitaria incontrolada (Rodrigue-Gervais et al., 2014).

#### **i. Respuesta inmunitaria innata**

Los componentes de la respuesta inmunitaria innata son los primeros en detectar y eliminar las infecciones virales. Las células del sistema inmunitario innato secretan citocinas pro-inflamatorias que inhiben la replicación viral, estimulan la respuesta del sistema inmunitario adaptativo y reclutan otras células del sistema inmunitario al sitio de infección. Los granulocitos liberan enzimas y proteínas tóxicas. Los monocitos se transportan a los tejidos y se diferencian a macrófagos; los cuales, junto con los neutrófilos, fagocitan y destruyen patógenos y células infectadas (McKechnie & Blish, 2020).

El SARS-CoV-2 ingresa al huésped principalmente a través del tracto respiratorio, mucosa oral o epitelio conjuntival (Rizzo et al., 2020), afectando predominantemente a las células epiteliales alveolares, las células endoteliales vasculares y los macrófagos. Una vez que el virus entra a la célula blanco, el sistema inmunológico mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), reconoce a las partículas virales a través de los PRRs, como los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR) y MDA5 (Shah et al., 2020), desencadenando la respuesta de interferones de tipo I (IFN-I). Los IFN-I son responsables de la transcripción de elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) que desempeñan un papel importante en la resistencia a las infecciones virales, induciendo la maduración de células presentadoras de antígenos (APC), regulando la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86 y producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$ , involucradas en la activación de células T, células B y natural killer (NK) (Theofilopoulos et al., 2005).

En las células, el IFN- $\alpha/\beta$  puede inducir la formación de homodímeros STAT1, que promueven la transcripción de genes estimulados por IFN. Otros efectos antivirales inducidos por IFN-I consisten en la inducción de PKR (Proteína-cinasa inducida por

RNA), que al unirse a dsRNA conduce a la fosforilación del eIF2a (factor de iniciación de la traducción en eucariontes 2-alfa), bloqueando la traducción de mRNAs propios y virales; así mismo, se da la producción de las proteínas de unión a MX y guanilato (Verhelst et al., 2013). Por otro lado, Moreno-Eutimio y colaboradores, mediante enfoques informáticos describieron que TLR 7/8 pueden reconocer al RNA monocatenario del virus (ssRNA), lo que conduce a una mayor producción de IFN-I, importantes para el inicio de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa contra el virus (Moreno-Eutimio et al., 2020).

Las células NK son linfocitos de la respuesta inmunitaria innata que representan la primera línea de defensa contra las infecciones virales (Smyth et al., 2005). Tienen múltiples mecanismos para eliminar a las células infectadas por el virus mediante la participación de receptores de muerte extracelular, incluidos el ligando de Fas (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). También eliminan a las células infectadas a través de la exocitosis de los gránulos citolíticos, mediante la liberación de perforina y granzimas que desencadenan la apoptosis a través de caspasas (Smyth et al., 2005). Sin embargo, las células NK de pacientes con COVID-19 sobre-expresan marcadores de agotamiento celular como TIM-3 y PD-1 y presentan menor expresión de NKG2D y una capacidad reducida de secreción de IFN- $\gamma$ , relacionado con un mal pronóstico de la patología (Liao et al., 2020).

La reducción de los porcentajes de algunas células del sistema inmunitario innato puede jugar un papel importante en COVID-19. El conteo bajo de eosinófilos sugiere un marcador de bajo pronóstico para los pacientes. De acuerdo a estudios realizados por Du y colaboradores, 81% de los pacientes que ingresaron al hospital por COVID-19 presentaban un conteo bajo de eosinófilos (Du et al., 2020); esto correlaciona con lo reportado en otros estudios donde se demostró que un porcentaje bajo de eosinófilos era menos frecuente en pacientes convalecientes que fueron hospitalizados (F. Liu et al., 2020).

Por otro lado, en el transcriptoma de fluido de lavado bronco alveolar (BAL) de pacientes críticos, se observó un aumento en las DCs, neutrófilos activos y macrófagos (Z. Zhou et al., 2020). Además, se han observado altos porcentajes de

monocitos en pacientes con patologías severas en pulmón (Y. Zhou et al., 2020). Otras células involucradas son las células endoteliales pulmonares (ECs), asociadas con el desarrollo de complicaciones pulmonares como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), debido a la modificación de la integridad de la barrera vascular, promoción de un estado pro-coagulativo y desregulación de infiltrado celular inflamatorio (Teuwen et al., 2020).

Diversos estudios han documentado la presencia en plasma de citocinas y quimiocinas en pacientes COVID-19, y su asociación con el progreso de la enfermedad. De acuerdo a un estudio de pacientes COVID-19 graves y críticos en Wuhan, China, estos presentaban altas concentraciones en plasma de IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-8, IL-9, IFN- $\gamma$ , CCL4 y TNF- $\alpha$ , en comparación con pacientes sanos, lo que sugiere una respuesta celular de tipo Th1. Además, los pacientes críticos, tenían concentraciones más altas de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3 y TNF- $\alpha$ , comparadas con pacientes graves (C. Huang et al., 2020). En el mismo estudio, se demostró que niveles de IL-6 en plasma son más altos en pacientes críticos que pacientes sanos, pero no aquellos graves; lo cual, además, sugiere estar relacionado con una predicción de la mortalidad debido a que IL-6 puede activar la vía de coagulación y células endoteliales vasculares (Ruan et al., 2020; Tanaka et al., 2016). Resultados similares se reportaron en una cohorte de pacientes en Estados Unidos, que reportaron un incremento en circulación de IL-6, IL-1Ra, CCL2, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9 y CXCL16, comparado con pacientes con problemas respiratorios negativos a COVID-19 (Blanco-Melo et al., 2020). Ninguno de los estudios reportó un incremento de IFN de tipo I y III, que pueden estar asociados con la falta del control de la replicación del virus y la corta vida de estas citocinas *in vivo*. Sin embargo, es importante resaltar la respuesta moderada de IFN para restringir la replicación de SARS-CoV-2 *in vitro*; para limitar la propagación.

De manera interesante, las citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  y su agonista IL-1Ra están implicadas en todos los estudios. Análisis transcripcionales longitudinales de sangre de un paciente crítico sugiere, que la expresión elevada de IL-1A e IL-1B precede el punto más bajo de la función respiratoria; mientras que otras citocinas,

incluidas la IL-6, alcanzan su punto más alto después de la mejoría. Estos datos sugieren que IL-1 podría jugar un papel importante en la patogénesis (Ong et al., 2020). Un aspecto importante de este estudio, fue la comparativa de un caso crítico con dos casos leves, en los cuales las citocinas pro-inflamatorias no están elevadas. Un segundo estudio también demostró que estas citocinas no estaban elevadas en pacientes leves (Thevarajan et al., 2020). Ambos estudios indican que la respuesta pro-inflamatoria es característica de pacientes críticos.

Finalmente, estudios relacionados con la respuesta local de citocinas en BAL y la expresión de genes, Zhou y Xiong, observaron una regulación positiva de CXCL17, un quimioatrayente de DC inmaduras y monocitos, así como de IL1RN e IL-1 $\beta$ ; además de una regulación positiva de quimiocinas responsable del reclutamiento de neutrófilos (CXCL1, CXCL2, CXCL6) y monocitos (CCL2 y CCL8) en pulmón (Xiong et al., 2020; Z. Zhou et al., 2020). Esto sugiere que la regulación de quimiocinas, particularmente las quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos; están relacionadas al daño en tejido derivado del incremento en la producción de citocinas.

## **ii. Respuesta inmunitaria adaptativa**

La respuesta de células T es un componente clave en la respuesta inmunitaria adaptativa contra la infección viral. Las células T CD8<sup>+</sup> son importantes por su citotoxicidad específica dirigida contra células infectadas, mientras las células T CD4<sup>+</sup> son importantes porque activan las células CD8<sup>+</sup> y células B, así como la producción de citocinas que favorecen el reclutamiento celular (Tay et al., 2020).

Estudios recientes describen la presencia de células T circulantes en pacientes graves después de 7 días del inicio de síntomas (Thevarajan et al., 2020). Así mismo, Grifoni y colaboradores determinaron la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas contra SARS-CoV-2 y observaron células T CD4<sup>+</sup> en todos los pacientes, pero CD8<sup>+</sup> solo en algunos (Grifoni et al., 2020).

Por otra parte, Sekine y colaboradores, demostraron que SARS-CoV-2 promueve una alta respuesta de células T de memoria funcionales; en pacientes severos recuperados de COVID-19, la respuesta de células T fue más alta que en pacientes

con síntomas leves y contactos cercanos, incluso en ausencia de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2 (Sekine et al., 2020).

Un aspecto importante a considerar es la linfopenia causada por infecciones virales. En condiciones fisiológicas normales, las células T son sometidas a la proliferación homeostática; después de episodios de linfopenia causada por agentes infecciosos, este mecanismo se activa para recuperar la población en sangre periférica (Boyman et al., 2009). Diversas hipótesis explican la linfopenia en pacientes COVID-19: 1) los linfocitos expresan ACE2 y estos mueren tras la infección viral, 2) los virus destruyen directamente los órganos linfáticos que involucran la destrucción de células linfoides, 3) la generación de la tormenta de citocinas puede desencadenar la apoptosis de linfocitos o el bloqueo de linfopoyesis, 4) alteraciones metabólicas inducidas por la infección del virus implica la generación de moléculas que resulta en la depleción de células linfoides y finalmente, 5) la linfopenia puede reflejar las diferencias en el reclutamiento de linfocitos en tejidos fuera de sangre periférica (Rodríguez et al., 2020).

Estudios en los cambios de subsets de linfocitos demostraron la reducción en los porcentajes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como células B en la sangre, principalmente en pacientes severos (Qin et al., 2020).

Después de la infección, las células T CD4<sup>+</sup> son activadas en órganos linfoides secundarios y migran a tejidos inflamados. Cuando se elimina el patógeno, la mayoría de estas células sufren apoptosis, pero una pequeña población sobrevive y se convierte en células de memoria prolongada capaces de responder de manera más eficiente y rápida a una segunda infección (Gray et al., 2018). De acuerdo a datos preliminares, pacientes críticos expresan una disminución en el porcentaje de células T de memoria cooperadoras y reguladoras en sangre comparadas con pacientes leves o graves (Qin et al., 2020). Estudios más detallados acerca del fenotipo de las células T en pacientes críticos, demostraron que tanto las células T CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup> expresan altos niveles de marcadores de activación (CD38 o CD44) (Braun et al., 2020).

La evaluación de pacientes en terapia intensiva reflejó el incremento en la expresión de OX40 en células T CD4<sup>+</sup> y CD137 en CD8<sup>+</sup> (Y. Zhou et al., 2020). OX40 es

conocido por promover la producción de citocinas; mientras que el CD137, miembro de los receptores de la familia TNF, es una potente molécula co-estimuladora para células T (Zhu et al., 2007). Adicionalmente, estudios fenotípicos demostraron un incremento en la concentración de células Th17 CCR6<sup>+</sup> pro-inflamatorias y una reducción en el número de células T citotóxicas supresoras y reguladoras CD28<sup>+</sup> (X. W. Xu et al., 2020). Es posible que la disminución prolongada de células CD8<sup>+</sup> sea un pronóstico de la severidad, al relacionarse con la eliminación viral por la secreción de perforinas, granzimas e IFN- $\gamma$  (Liblau et al., 2002).

Otra vía alterada en la COVID-19 es la correspondiente a IL-7, factor de crecimiento hematopoyético secretado por células estromales en la médula ósea y DCs, que estimula la diferenciación y proliferación de células de linaje linfoide; el aumento en su expresión en sangre periférica durante la infección puede representar el intento de contrarrestar la linfopenia inducida por SARS-CoV-2 (Xiong et al., 2020).

### **iii. Respuesta de anticuerpos**

Se ha reportado que la respuesta humoral contra el SARS-CoV-2 es similar a la de otras infecciones por coronavirus, lo que implica la producción característica de IgG e IgM. Al inicio de la infección las células B desarrollan una respuesta temprana contra la proteína NP, mientras que los anticuerpos contra la proteína S pueden detectarse después de 4 u 8 días desde la aparición de los síntomas iniciales (Y. J. Tan et al., 2004). Aunque la proteína NP es más pequeña que la proteína S, es altamente inmunogénica y la ausencia de sitios de glicosilación da como resultado la producción de anticuerpos neutralizantes específicos contra ella (Meyer et al., 2014).

A pesar que el grado y la duración de la protección aún no se conoce completamente, estudios recientes sugieren que la respuesta inmunitaria humoral contra el SARS-CoV-2 tiene menos duración en pacientes que experimentan pocos síntomas. Mientras que los resultados preliminares sugieren que la transferencia pasiva de anticuerpos de pacientes convalecientes tiene eficacia terapéutica (Rubin, 2020). Además, pacientes con inmunodeficiencias humorales primarias, demostraron que los anticuerpos no tienen una participación crítica en la respuesta

inmunitaria contra SARS-CoV-2; lo que sugiere que las complicaciones del COVID-19 podrían estar asociadas con la presencia de células B disfuncionales o una respuesta celular deficiente (Soresina et al., 2020).

Con respecto a la cinética de respuesta de anticuerpos en COVID-19. La mayoría de los estudios serológicos enfocados en la fase aguda de la infección sugieren que los anticuerpos IgM aparecen entre los días 8 a 12 y decaen en la semana 12. Por el contrario, los anticuerpos IgG aparecen al día 14 y duran por más tiempo. La intensidad de la respuesta de IgG parece estar relacionada con la carga viral y severidad de la enfermedad; de acuerdo con Long y colaboradores, los pacientes asintomáticos tienen menores niveles de anticuerpos IgG específicos contra el virus (Long et al., 2020).

Un estudio realizado en Australia, demostró la presencia en sangre de anticuerpos IgM e IgG específicos para SARS-CoV-2, durante el periodo de convalecencia y hasta 7 días después de la resolución de los síntomas (Thevarajan et al., 2020). Un estudio más reciente demostró que IgM e IgG pueden ser detectados a partir del día 4 después del inicio de síntomas y hasta el día 11 después de la infección (Xiang et al., 2020).

Long y colaboradores, utilizaron un ensayo de quimioluminiscencia y reportaron que la seroconversión de IgM a IgG puede ocurrir simultáneamente, a los 7 días después del inicio de síntomas (Long et al., 2020). Un estudio más reciente, confirma estos resultados; lo que sugiere que los valores de IgM como marcadores de la fase aguda podrían no estar relacionado con el diagnóstico de la infección (X. Xu et al., 2020). En otro estudio serológico realizado, se demostró que 13 días después del inicio de síntomas 99% de los pacientes con infección leve tenían anticuerpos contra la proteína S de SARS-CoV-2 y 97% de estos pacientes presentaban anticuerpos neutralizantes (nAb) un mes después de la resolución de la enfermedad (GeurtsvanKessel et al., 2020; Suthar et al., 2020). A pesar que algunos pacientes leves tenían bajos niveles de nAb, la actividad antiviral es alta y persiste hasta 40 días después del inicio de síntomas (Fafi-Kremer et al., 2020; Robbiani et al., 2020). Sin embargo, la falta de metodologías similares imposibilita poder compararlos con otros estudios.

## **7. Planteamiento del problema**

En los meses de diciembre a marzo de 2020 se desencadenó una epidemia de coronavirus a nivel mundial, cuyo agente etiológico es el SARS-CoV-2. En México, hasta el 21 de septiembre de 2021, se han reportado 3.6 millones de casos confirmados, con una tasa de letalidad cercana al 9%, muy por arriba de lo reportado internacionalmente (3 a 5%).

Una de las ramas efectoras importantes para la generación de inmunidad de larga duración contra los virus, es la respuesta de anticuerpos; sin embargo, no todos los anticuerpos que se generan son capaces de inducir protección. Se ha observado que SARS-CoV-2 es capaz de generar una respuesta inmunitaria, en pacientes infectados se ha descrito la presencia de anticuerpos de tipo IgM e IgG; sin embargo, poco se conoce sobre la respuesta de anticuerpos durante el curso de la infección y su papel en la resolución de la misma. Así mismo, poco se conoce sobre la duración de esta respuesta inmunitaria en pacientes convalecientes y la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados.

## **8. Justificación**

Distintos estudios realizados han demostrado que la gran mayoría de pacientes con COVID-19 generan una fuerte respuesta de anticuerpos en contra del virus SARS-CoV-2, en particular dirigida hacia la proteína N, S y RBD. Algunos reportan que la respuesta es medible tan temprano como 4 y hasta 12 semanas después de la aparición de los síntomas; sin embargo, se ha observado que hay una gran variabilidad entre los pacientes.

Por otro lado, hasta la fecha, no se ha investigado a fondo si existe una posible correlación entre la respuesta de anticuerpos y parámetros clínicos de la enfermedad. Adicionalmente, es de vital importancia investigar la seroprevalencia de anticuerpos, en diferentes poblaciones para determinar si una persona convaleciente cuenta con inmunidad y la duración de la misma.

## **9. Hipótesis**

Los pacientes COVID-19 graves y críticos que desarrollen anticuerpos IgG contra la proteína S del virus de SARS-CoV-2 controlarán de mejor manera los procesos inflamatorios; por tanto, tendrán mejores parámetros clínicos y bioquímicos, en comparación con pacientes que no presenten estos anticuerpos. Adicionalmente, los pacientes convalecientes presentarán anticuerpos con capacidad neutralizante.

## **10. Objetivo general**

Estudiar de la respuesta de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 en pacientes infectados y contactos cercanos (familiares y personal de salud) mediante la técnica de ELISA, con el fin de relacionarlo con la severidad de la COVID-19.

### **a. Objetivo particular**

1. Identificar aspectos clínicos (comorbilidades, sintomatología, conteo celular y evolución) de pacientes COVID-19.
2. Determinar el índice de anticuerpos de clase IgM e IgG contra la proteína N y S del virus de SARS-CoV-2 en suero de pacientes con COVID-19 y contactos cercanos, mediante la técnica de ELISA.
3. Determinar la seroconversión de anticuerpos de clase IgM e IgG contra la proteína N y S del virus de SARS-CoV-2, en pacientes COVID-19, mediante la técnica de ELISA.
4. Determinar la capacidad de neutralización de los anticuerpos en suero de pacientes con COVID-19 en estado grave, crítico y convalecientes, empleando un ensayo de ELISA competitivo.

## **11. Materiales y métodos**

### **a. Diseño general del estudio**

- Estudio analítico, transversal, prospectivo, clínico.

### **b. Universo de trabajo**

- a) Casos: Todos los pacientes con sospecha de infección por el virus SARS-CoV-2 que ingresaron en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) con la sintomatología asociada a COVID-19 (fiebre  $\geq 38$  °C, tos, fatiga, cefalea, disnea y anosmia), contactos cercanos (familiares y personal de salud); así como pacientes recuperados de la infección por COVID-19 que decidieron participar y firmaron el consentimiento informado.
- b) Controles: Muestras de personas sanas, colectadas durante la pandemia de influenza A(H1N1) en el año 2009.

### **c. Criterios de selección de la muestra**

#### **i. Criterios de inclusión**

- Pacientes mayores de 16 años de ambos sexos con sospecha clínica de infección por el virus SARS-CoV-2 que ingresen en la UMAE Hospital de Especialidades del CMN SXXI.
- Contactos cercanos (familiares y personal tratante) y pacientes recuperados, que deseen participar y firmen el consentimiento informado.

#### **ii. Criterios de no inclusión**

- Pacientes a los que se identifique otra causa de los síntomas diferentes a la infección por virus SARS-CoV-2, incluyendo cualquier infección viral o bacteriana, al momento del ingreso del paciente.
- Pacientes o representantes legales que no acepten participar en el estudio.

### **iii. Criterios de exclusión**

- Pacientes con expediente incompleto.
- Pacientes cuyas muestras sanguíneas no fueron factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o procesamiento de la misma.

### **d. Tamaño de muestra**

Considerando las condiciones de la pandemia y el número de pacientes que recientemente se están diagnosticando, se consideró una muestra por conveniencia e incluyeron a todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

### **e. Obtención y procesamiento de muestras**

En un modelo de muestreo no probabilístico de casos consecutivos, los pacientes y contactos cercanos que cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio (o los representantes legales) mediante consentimiento informado, se les realizó el siguiente protocolo.

### **i. Recolección de datos clínicos**

Se llenó una hoja de recolección de datos por paciente: identificación del paciente (lo cual no se reportó en el estudio), edad, fecha, parámetros de laboratorio incluyendo estudios de gabinete. Los datos como fiebre, tos, mialgia, artralgia, anosmia y disnea se registraron como variables dicotómicas (presencia y ausencia). La disnea se registró de acuerdo a la escala de la New York Heart Association (NYHA) que incluye:

Clase I. Sin limitación de la actividad física. La actividad ordinaria NO ocasiona fatiga excesiva, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.

Clase II. Ligera limitación de la actividad física. Confortables en reposo. La actividad ordinaria ocasiona fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.

Clase III. Marcada limitación de la actividad física. Confortables en reposo. Actividad física menor ocasiona fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso

Clase IV. Incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin disconfort. Los síntomas de insuficiencia cardíaca o de síndrome anginoso pueden estar presentes incluso en reposo.

En el caso de pacientes hospitalizados por el cuadro respiratorio, se recabaron las variables hematológicas correspondientes a biometría hemática y química sanguínea del mismo día de la toma de la primera muestra.

La información se manejó como información confidencial, por lo que las hojas de recolección de datos se mantuvieron a resguardo bajo llave en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ).

## **ii. Recolección de las muestras**

De aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de selección, se tomó una muestra de sangre periférica (6 mL) mediante venopunción humeral con previa asepsia de la zona. La sangre se colectó con sistemas Vacutainer® en tubos con heparina de litio (95 USP/ 6 mL) como anticoagulante.

### **f. Respuesta de anticuerpos.**

#### **i. Preparación de la muestra**

Para estudiar la respuesta de anticuerpos primero se generó un biobanco de suero y plasma de los pacientes reclutados. Previo a la determinación de anticuerpos, con el fin de limitar el riesgo al manejar las muestras en las cuales el virus puede estar presente; el suero o plasma de los pacientes se inactivó con calor por 1 h a 56 °C. Para la medición de anticuerpos contra SARS-CoV-2 se realizó un ensayo de ELISA mediante el Kit COVID-19 IgG e IgM (ERBALisa Manheim).

En una placa de dilución, se prepararon las muestras de los pacientes mediante una dilución 1:21, adicionando 10 µL de la muestra a 200 µL del diluyente. Posteriormente, se dispensaron 100 µL de la muestra diluida, calibrador y controles en los pozos correspondientes, y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente.

Al finalizar la incubación, las placas se lavaron con solución de lavado y adicionaron 100  $\mu$ L/pozo del conjugado enzimático, anti-IgM o IgG de humano acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés). Se incubaron las placas con el conjugado enzimático por 20 min a temperatura ambiente y, después, el exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando las placas con la solución de lavado y, finalmente se adicionaron 100  $\mu$ L/pozo de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato de la enzima HRP; la reacción se incubó por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente y se detuvo adicionando 100  $\mu$ L/pozo de la solución de stop.

Finalmente, la absorbancia de las placas se leyó en un espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

## ii. Interpretación de los resultados

Para el cálculo de los resultados, se verificó:

- Factor de calibración (CF): valor reportado en el inserto del Kit
- Valor de corte (VC): Densidad Óptica (DO) del calibrador  $\cdot$  CF
- Cálculo del índice de anticuerpos: Valor promedio de cada muestra / VC

Para la interpretación del índice de absorbancia, se consideró:

- $< 0.9$  Anticuerpos  $\alpha$ -COVID-19 no detectables
- $> 0.9$  Anticuerpos  $\alpha$ -COVID-19 detectables

## g. Anticuerpos neutralizantes

La determinación de la actividad neutralizante se determinó con el suero inactivado de los pacientes reclutados mediante el ensayo de ELISA competitivo con el kit Surrogate Virus Neutralization Test ELISA Kit de Genscript.

En una placa de dilución, se prepararon las muestras de los pacientes mediante una dilución 1:10, adicionando 10  $\mu$ L de la muestra a 90  $\mu$ L del diluyente. Posteriormente, se dispensaron 60  $\mu$ L de la muestra diluida, calibrador y controles en los pozos correspondientes de otra placa de dilución que contenía 60  $\mu$ L de la solución HRP-RBD, y se incubaron durante 30 min a 37 °C.

Transcurridos los 30 min, se tomaron 100 µL de la muestra y colocaron en la placa del kit, se incubaron a 37 °C durante 15 min, lavaron con la solución de lavado y colocó el TMB, incubando en oscuridad durante 20 min. Finalmente, se adicionaron 50 µL de la solución de stop y leyó la placa en el espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

#### **i. Interpretación de resultados**

Para el cálculo de los resultados se determinó el porcentaje de inhibición con la siguiente formula

$$\% \text{ Inhibición} = \left( 1 - \frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ control negativo}} \right) * 100$$

Para la interpretación del porcentaje de inhibición, se consideró:

- < 20% de inhibición es negativo
- > 20% de inhibición es positivo

#### **h. Aspectos éticos**

Para la realización del presente protocolo se solicitó la aprobación por los comités: nacional de ética y de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), proyecto con número de registro R-2020-785-095 (Anexo 1).

**Marco Legal:** Este estudio respetó las disposiciones enunciadas en la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Aunado a lo anterior, se respetaron los principios contenidos en el Código de Núremberg, el Informe Belmont, el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos, y el reglamento de la Ley General de Salud (LGS), en materia de investigación para la salud (Título Quinto).

**Riesgo de la Investigación:** Dado que este protocolo incluía la toma de muestras sanguíneas, se clasificó con un riesgo tipo II (mayor que el mínimo).

**Balance Riesgo/Beneficio:** Dado que los análisis biológicos se hicieron en el laboratorio, donde la UIMIQ cuenta con las medidas de bioseguridad necesarias para ello; el único riesgo real estuvo relacionado con la toma de sangre.

**Confidencialidad:** Todos los pacientes que ingresaron al estudio fueron tratados con apego estricto de confidencialidad. Las hojas de recolección de datos fueron mantenidas en resguardo en la UIMIQ.

**Selección de Participantes:** Se seleccionaron a los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y exentaban los criterios de exclusión o eliminación. Antes de invitar a cada paciente a participar en el proyecto, se le explicó ampliamente su patología y estrategias terapéuticas que le correspondían al momento, así como la posibilidad de participación en la investigación, riesgos y potenciales beneficios que pueden derivar de ello. Si el paciente decidía no ser seleccionado para el protocolo se continuaba su tratamiento tal y como estaba indicado.

## 12. Resultados

### a. Muestra de estudio

Las muestras recopiladas durante los meses de marzo a junio del 2020, consistieron en 137 pacientes confirmados para COVID-19, de los cuales 120 ingresaron al triage de la UMAE y 17 se encontraban en su periodo de convalecencia; así como 116 contactos (Tabla 2).

Los pacientes que ingresaron al triage de la UMAE y fueron hospitalizados, se dividieron en dos grupos:

**Graves:** Frecuencia respiratoria >30, Saturación de O<sub>2</sub> <90%, sin apoyo ventilatorio a su ingreso y PAFI (Presión parcial de oxígeno arterial y la fracción inspirada de oxígeno) <300.

- **Críticos:** Paciente grave con saturación de O<sub>2</sub> <82% que tenga ventilación mecánica invasiva (VMI), estado de choque, falla orgánica y/o respiratoria

Por otra parte, los contactos que no presentaron fiebre o algún síntoma de infección respiratoria se clasificaron en dos grupos de acuerdo a su nivel de exposición:

- **Leve:** Personas que no tuvieron contacto con pacientes infectados o muestras de ellos.
- **Alto:** Personal médico y residentes que trabajaban en el área COVID de la UMAE, así como personas que tienen contacto con pacientes infectados y/o sus muestras.

Tabla 2. Características de los grupos de pacientes y contactos cercanos.

	Pacientes			Contacto	
	Grave	Crítico	Convaleciente	Leve	Alto
Número (n)	38	82	17	29	87
Edad (años)	54 ± 17	53 ± 16	46 ± 17	41 ± 13	54 ± 2
Género (F, M)	13 : 25	27 : 55	7 : 10	12 : 17	63 : 24

Adicionalmente, para el grupo de control negativo, se utilizaron 12 muestras de sueros colectados de pacientes sanos durante la pandemia de influenza A(H1N1) en el 2009.

De acuerdo a las características generales recopiladas para los pacientes COVID-19 que fueron hospitalizados y/o que se encontraban en periodo de convalecencia, se observa, en la Tabla 2, que la media de edad es muy similar entre los grupos y la frecuencia de pacientes masculinos es mayor que la de femeninos.

## **b. Aspectos clínicos**

De los pacientes confirmados a SARS-CoV-2 hospitalizados en la UMAE, se analizaron aspectos clínicos como comorbilidades, síntomas que presentaban a su ingreso, conteo celular y evolución, con el fin de relacionarlos con la severidad e inducción de la inmunidad.

De acuerdo a los resultados observados en la Tabla 3, el porcentaje de comorbilidades y los síntomas que presentaron es mayor en pacientes críticos que graves. Por otra parte, en el conteo celular, los dos grupos presentaron valores de neutrófilos, proteína C reactiva (PCR), dímero D, fibrinógeno y ferritina elevados; en contraste con los valores de linfocitos, que se encontraban por debajo de los valores de referencia. Adicionalmente, los pacientes críticos tenían altos niveles de leucocitos y creatina cinasa (CK).

Finalmente, al comparar la evolución de los grupos, el porcentaje de pacientes que egresaron por mejoría es mayor en la cohorte de pacientes graves.

Tabla 3. Aspectos clínicos generales de pacientes COVID-19 hospitalizados

		Grave	Crítico
Número (n)		38	82
Edad (años)		54 ± 17	53 ± 16
Género (F, M)		13 : 25	27 : 55
IMC		29.6 ± 6.4	30.3 ± 6.5
<b>Comorbilidades</b>			
DM2 (%)		12	35
HAS (%)		11	26
Obesidad (%)		12	35
EPOC (%)		2	3
IRC (%)		1	9
Cáncer (%)		3	2
Otras		Cardiopatía Epilepsia Tabaquismo	Cardiopatía Psoriasis Tabaquismo Hipotiroidismo
<b>Sintomatología</b>			
Días desde el inicio de síntomas		9 ± 5	10 ± 6
Tos (%)		20	60
Mialgia (%)		17	36
Artralgia (%)		14	29
Anosmia (%)		3	10
Disnea (%)		23	71
<b>Conteo de células sanguíneas</b>			
	Valores de referencia		
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	4.6 - 10.6	8.73 ± 3.5	10.72 ± 4.56
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	150 - 450	257.76 ± 127.5	291.59 ± 133.21

Neutrófilos (%)	50 - 70	75.81 ± 12.57	83.47 ± 11.41
Linfocitos (%)	20 - 40	14.8 ± 8.83	9.69 ± 9.1
Monocitos (%)	0 - 12	5.10 ± 2.55	4.20 ± 2.28
Proteína C reactiva (mg/dL)	0 - 1	15.20 ± 9.72	18.76 ± 10.53
Dímero D (µg/mL)	0.1 - 0.8	2.67 ± 4.57	4.08 ± 5.3
Fibrinógeno (mg/dL)	200 - 400	662.6 ± 151.1	718.8 ± 179.2
Ferritina (µg/L)	24 - 336	1008.6 ± 824.8	756.1 ± 529.4
CK (U/L)	30 - 200	189.33 ± 217.72	249.27 ± 259.21
<b>Evolución</b>			
Egreso por mejoría (%)		66	38
Defunción (%)		29	45

(DM2: Diabetes mellitus tipo 2, HAS: Hipertensión arterial sistémica, EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, IRC: Insuficiencia renal crónica, CK: Creatina cinasa)

### c. Índice de anticuerpos de pacientes COVID-19 hospitalizados

De la cohorte de pacientes hospitalizados se determinó el índice de anticuerpos de clase IgM  $\alpha$ -S2 y N e IgG  $\alpha$ -S2 de SARS-CoV-2 para analizar si existían diferencias entre los grupos a su ingreso a la unidad y compararlos con los controles negativos, correspondientes a muestras tomadas durante la pandemia de influenza de A(H1N1) en 2009. Si el índice de anticuerpos tiene un valor mayor a 0.9 se considera que la muestra presenta anticuerpos.

Como se observa en la Figura 3, la media geométrica para los grupos graves y críticos, tanto para IgM como para IgG, se encuentra por encima del valor del corte; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el índice de anticuerpos entre estos grupos. Por el contrario, cuando se comparan con el control negativo, únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas para los anticuerpos de clase IgG  $\alpha$ -S2 de SARS-CoV-2 en ambos grupos.

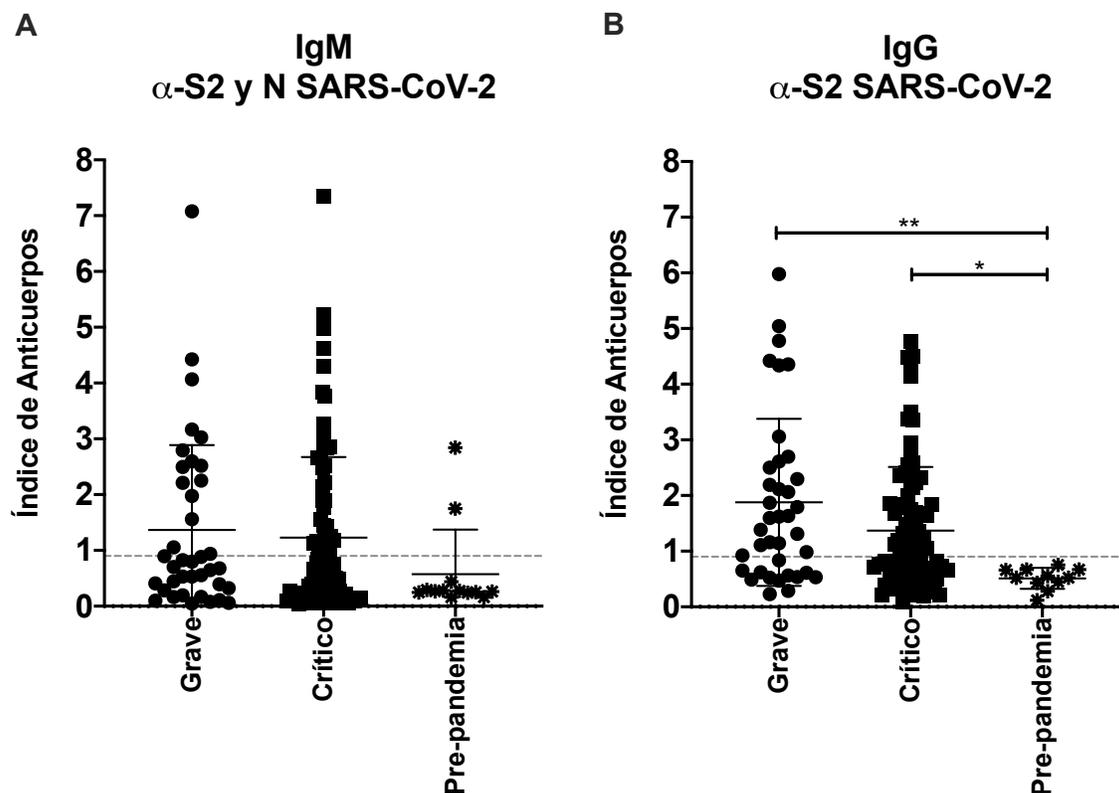


Figura 3. Índice de anticuerpos  $\alpha$ -SARS-CoV-2 en pacientes graves y críticos.

A) Índice de anticuerpos IgM  $\alpha$ -SARS-CoV-2 B) Índice de anticuerpos IgG  $\alpha$ -SARS-CoV-2. Se determinó por el método de ELISA el índice de anticuerpos de los pacientes COVID-19 graves y críticos al ingresar al hospital. (Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $P < 0.05^*$ ,  $P < 0.01^{**}$ )

#### d. Seroconversión de anticuerpos de pacientes COVID-19 hospitalizados

Para determinar la seroconversión de anticuerpos en los pacientes hospitalizados, se determinó el cambio en el índice de anticuerpos 10 y 20 días después del inicio de síntomas; debido a que no todos los pacientes tenían muestras en el periodo establecido, ya sea por mejoría o desenlace de los mismos, la cohorte final esta compuesta por 27 pacientes graves y 58 pacientes críticos.

Como se observa en la Figura 4, en pacientes críticos la seroconversión de anticuerpos para ambas clases presenta diferencia significativa; en contraste con

los pacientes graves que únicamente presentan cambio los anticuerpos de clase IgG.

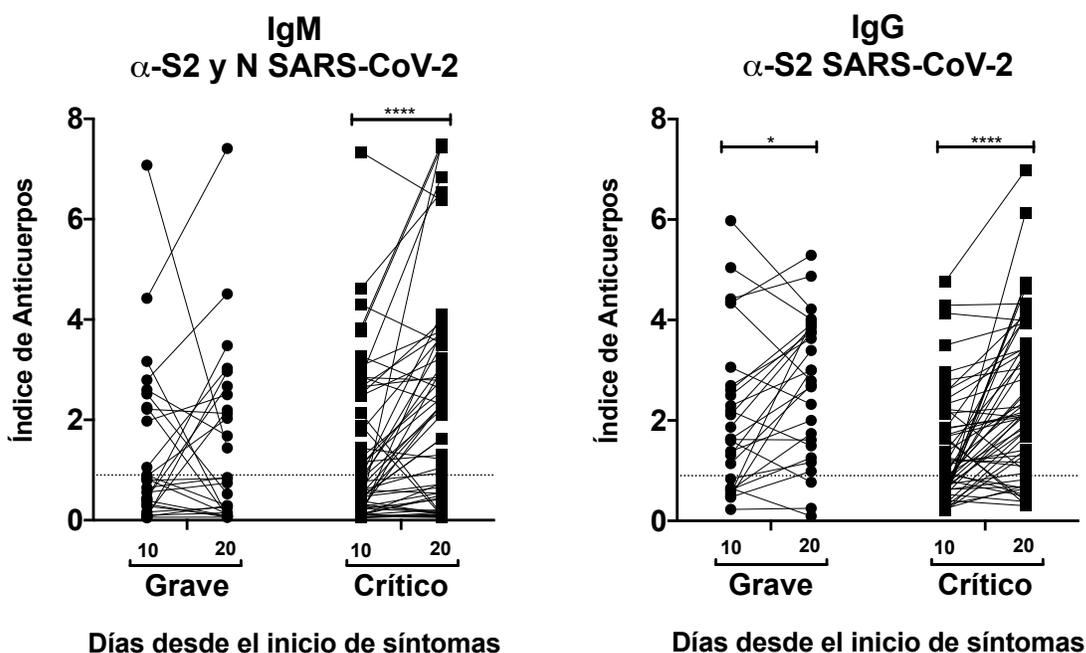


Figura 4. Seroconversión de anticuerpos IgM e IgG en pacientes críticos y graves a partir del inicio de síntomas.

A) Correlación de anticuerpos IgM  $\alpha$ -SARS-CoV-2 B) Correlación de anticuerpos IgG  $\alpha$ -SARS-CoV-2. La correlación del índice de anticuerpos de los pacientes graves y críticos, que se determinó por el método de ELISA, se realizó a dos tiempos desde la fecha del inicio de síntomas que reportaron, al día 10 y 20. (Diferencia significativa para la prueba U de Mann-Whitney  $P < 0.05^*$ ,  $P < 0.0001^{****}$ )

#### e. Seroprevalencia de anticuerpos de pacientes COVID-19 convalecientes y contactos

Por otra parte, para determinar la seroprevalencia de anticuerpos en pacientes COVID-19 durante su periodo de convalecencia, se analizaron muestras de suero entre 3 a 4 meses post-infección y compararon con muestras de personas que estaban o no en contacto directo con pacientes infectados.

De acuerdo a lo observado en la Figura 5, los pacientes convalecientes a COVID-19, presentan el mayor índice de anticuerpos tanto de IgM como de IgG con

respecto al resto de los grupos; sin embargo, la diferencia estadística es significativa únicamente en los anticuerpos de clase IgG. De igual forma, los contactos leves y críticos tienen diferencia estadística significativa en los anticuerpos de clase IgG, comparado con el control negativo.

Cabe destacar que, a pesar que la media del índice de anticuerpos de los contactos leves y altos se encuentra por debajo del corte, varios individuos presentaron niveles de anticuerpos por arriba del corte, principalmente de clase IgM.

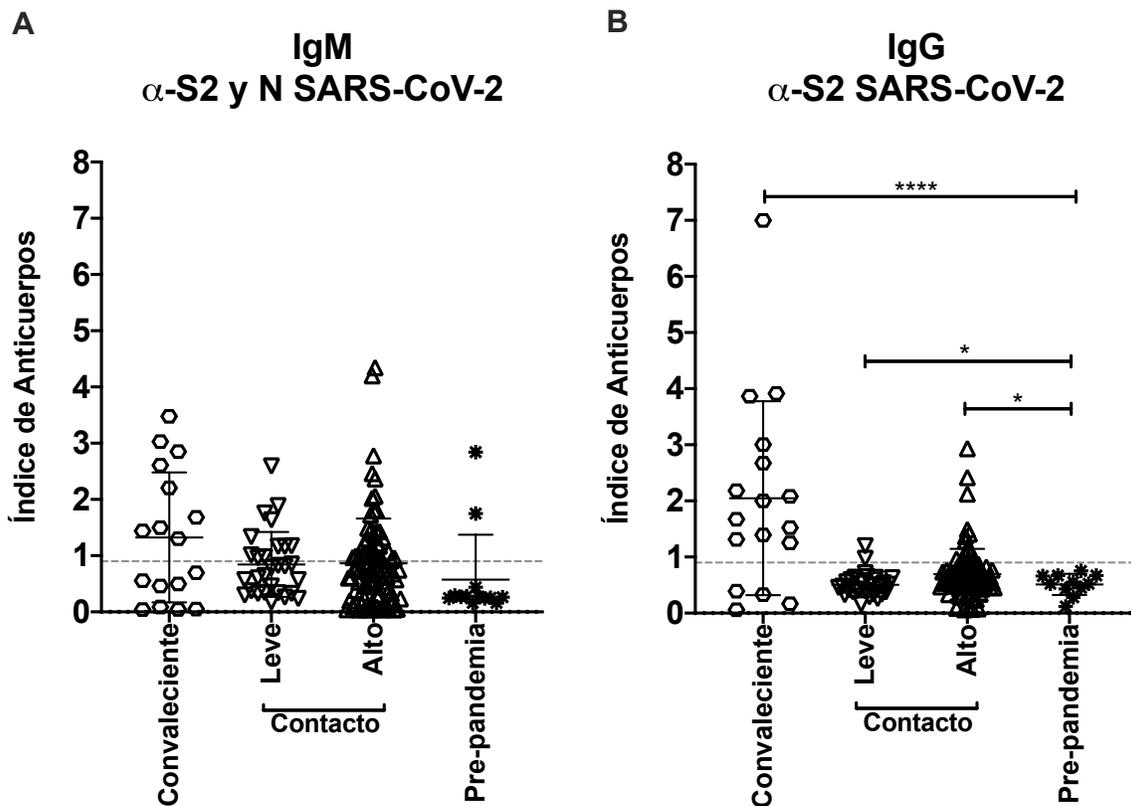
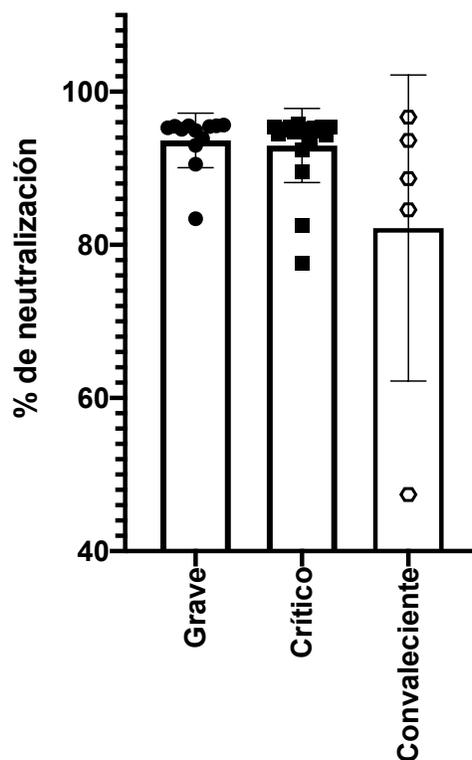


Figura 5. Seroprevalencia de anticuerpos  $\alpha$ -SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes y contactos

A) Índice de anticuerpos IgM  $\alpha$ -SARS-CoV-2 B) Índice de anticuerpos IgG  $\alpha$ -SARS-CoV-2. Se determinó por el método de ELISA, el índice de anticuerpos de contactos leves y altos; así como de pacientes convalecientes a COVID-19 3 a 4 meses post-infección (Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

**f. Capacidad de neutralización de los anticuerpos en diferentes grupos de pacientes**

Finalmente, para evaluar la capacidad de neutralización de los anticuerpos en los distintos grupos de pacientes COVID-19, se realizó un análisis comparativo de las muestras que presentaban anticuerpos de clase IgG dirigidos contra la proteína S y el dominio RBD, mediante la determinación del porcentaje de neutralización, empleando un ensayo de competencia con el virus subrogado. Como se observa en la Figura 6, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de neutralización entre las distintas cohortes de pacientes COVID-19 sin importar el grado de severidad o periodo de infección.



*Figura 6. Capacidad de neutralización de los anticuerpos de las diferentes cohortes de pacientes COVID-19*

El porcentaje de neutralización se determinó en las muestras de pacientes de las diferentes cohortes que presentaron anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S de SARS-CoV-2, determinado mediante ensayos de competencia. (Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn)

### **13. Discusión de resultados**

Durante la realización del presente trabajo, en los meses de marzo a junio de 2020, la respuesta inmunitaria contra el virus no había sido estudiada a profundidad. La mayoría estudios se enfocaban en el desarrollo de técnicas para la determinación de anticuerpos que pudieran ser empleadas para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (B et al., 2020). Hasta junio de 2020, se había reportado que la mayoría de los pacientes internados presentaban seroconversión de anticuerpos durante la fase aguda de la infección, y la mayoría de ellos desarrollaban anticuerpos neutralizantes que correlacionaban con la severidad, pero no necesariamente con la cinética de producción (Seow et al., 2020). Sin embargo, los datos publicados no eran suficientes para correlacionar la respuesta de anticuerpos con características propias del individuo, como sexo, edad o comorbilidades; adicionalmente, muchos de los estudios no podían ser comparados debido a la implementación de diferentes técnicas para la determinación de los anticuerpos (Post et al., 2020).

Por tanto, en el presente trabajo, se describe el estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes COVID-19 y contactos cercanos; así como la determinación de aspectos clínicos y capacidad de neutralización de cada una de las cohortes. Para llevar a cabo este trabajo, fue necesario contar con una amplia cohorte de pacientes COVID-19 que presentaran diferentes grados de severidad clínica; sin embargo, el acceso a las muestras de todos los grupos fue complicado debido a la peligrosidad del nuevo virus, de tal manera que las muestras analizadas correspondían a pacientes que presentaron cuadros clínicos graves o severos que acudían y eran aceptados en el triage de la UMAE. Los pacientes que ingresaban eran asignados a diferentes áreas de acuerdo al cuadro clínico que presentaban, y tomando en cuenta lo reportado por Wu y colaboradores quienes recopilaron datos clínicos del brote inicial en la provincia de Hubei, se clasificaron como pacientes críticos o graves (Wu & McGoogan, 2020).

De acuerdo con los datos recopilados, no se observa una diferencia entre las características de las cohortes de los pacientes COVID-19 analizados (Tabla 2). La media de edad de las dos cohortes es similar y correlaciona con estudios realizados en países como España, Canadá y Holanda, donde el grupo más afectado es el de

50 a 60 años (Berry et al., 2020; CCAA, n.d.; RIVM, n.d.); sin embargo, otros estudios describen que la mayoría de pacientes críticos son mayores de 60 años (Y. Liu et al., 2020). A pesar que estudios recientes describen que la expresión génica de ACE2 (receptor de la proteína S de SARS-CoV-2), en epitelio nasal, aumenta con la edad (Bunyavanich et al., 2020); los resultados sugieren que hay otros aspectos en los pacientes relacionados con la susceptibilidad al virus.

Un factor importante relacionado a la susceptibilidad es el sexo, los resultados obtenidos revelan que los hombres padecen la enfermedad más que las mujeres; si bien las diferencias entre los sexos están relacionadas con roles sociales y factores conductuales, hay mecanismos relacionados a la respuesta inmunitaria que afectan la severidad (Takahashi & Iwasaki, 2021). En la COVID-19, la localización del gen que codifica la expresión de ACE2 en el cromosoma X aumenta la posibilidad que las mujeres tengan diferencias en la expresión de este receptor (Komatsu et al., 2002); sin embargo, esto parece estar más influenciado por hormonas sexuales como el estrógeno, como lo demuestran estudios *in vitro* en líneas celulares y modelos animales (J. Liu et al., 2010; Scully et al., 2020). Adicionalmente, se ha reportado que la respuesta mediada por IFN tipo I y III, que limita la replicación viral, es más robusta en mujeres; por tanto, los hombres tienen mayor susceptibilidad y vulnerabilidad a infectarse (Blanco-Melo et al., 2020; Gargaglioni & Marques, 2020). Aunque esto refleja que la población más susceptible a infectarse son los hombres mayores de 50 años, las manifestaciones clínicas difieren entre las cohortes; en general, aquellos que presentan más comorbilidades son más propensos a desarrollar síntomas que requieren hospitalización.

Al igual que lo reportado en diversos meta-análisis, las comorbilidades y síntomas son más comunes en pacientes críticos que graves. En los primeros reportes publicados, los pacientes críticos tenían mayor proporción de comorbilidades concomitantes, como enfermedades cardiovasculares, hepáticas o renales, y el desenlace de estos pacientes estaba relacionado con las comorbilidades originales (Chen et al., 2020; C. Huang et al., 2020). De acuerdo con los resultados, las principales comorbilidades son la obesidad y diabetes, lo que sugiere que las enfermedades metabólicas son un factor determinante para la severidad; algunos

estudios demuestran que pacientes con sobrepeso y obesidad tienen mayor riesgo de tener un desenlace fatal, asociado al estado pro-inflamatorio del síndrome metabólico que favorece el ambiente pro-trombótico del epitelio alveolar (Kammar-García et al., 2020; P. Zhou et al., 2020). Mientras que, los pacientes con diabetes son más susceptibles a contraer SARS-CoV-2 y desarrollar mayor número de complicaciones, debido a alteraciones inmunológicas como sobreexpresión de ACE-2 y mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$  y TNF-  $\alpha$  (Ejaz et al., 2020; J. Yang et al., 2020b).

Durante la infección, se ha reportado que los síntomas más comunes son la fiebre, fatiga y tos; mientras que los menos comunes incluyen dolor de cabeza, diarrea, náusea y vómito (Hu et al., 2020). Sin embargo, conforme a lo observado en pacientes críticos, los principales síntomas son disnea, tos y mialgia; de acuerdo a lo que plantean otros estudios, la disnea es el principal síntoma relacionado con la severidad de la enfermedad en virtud que puede ser indicativo de daño pulmonar (Chen et al., 2020; Guan et al., 2020; Jain & Yuan, 2020; D. Wang et al., 2020).

Por otro lado, los análisis de laboratorio de los pacientes al ingresar a la UMAE indican que estos presentaban linfopenia, incremento de PCR y dímero D; además, únicamente los pacientes críticos presentaban aumento de CK. Lo que sugiere que la infección por SARS-CoV-2 puede estar relacionada con deficiencias inmunitarias, inflamación, coagulación y daño muscular cardíaco.

La proteína C reactiva (PCR) producida en el hígado, sirve como marcador de infección e inflamación; durante este proceso se une a la fosfocolina expresada en la superficie de las células dañadas y activa la vía clásica del complemento, modulando la actividad fagocítica (Ali, 2020; Marnell et al., 2005; Young et al., 1991). A pesar que aún no ha sido comprobado, en la COVID-19 se ha sugerido como marcador de severidad y prognosis, debido a que se ha observado que esta estrechamente relacionada con el daño pulmonar, principalmente en pacientes críticos, al igual que lo reportado en neumonías causada por MERS-CoV (Ko et al., 2016; Yingxia Liu et al., 2020; Luo et al., 2020; Shang et al., 2020; L. Wang, 2020). Por su parte, pacientes con valores altos de dímero D tienen peor prognosis por los problemas relacionados con coagulopatías (Guo et al., 2020; Yu et al., 2020; L.

Zhang et al., 2020). La producción excesiva de trombina y activación de la vía de la coagulación, asociadas a los elevados valores de dímero D, pueden estar relacionadas con la respuesta pro-inflamatoria prolongada y control insuficiente de la respuesta anti-inflamatoria, consecuencia de la infección (Levi & van der Poll, 2017; L. Zhang et al., 2020).

Los linfocitos (B y T) constituyen la respuesta inmunitaria necesaria para controlar la infección; las células B producen anticuerpos neutralizantes que pueden unirse al virus, mientras que las células T reconocen y eliminan las células infectadas (Channappanavar et al., 2014; Jiang, Hillyer, et al., 2020).

De acuerdo a estudios previos en SARS, se especula que la linfopenia esta relacionada con la supresión de la médula ósea y destrucción de los linfocitos (Sarzi-Puttini et al., 2020; L. Tan et al., 2020; M. Yang et al., 2004; Zheng et al., 2020). En la COVID-19, la linfopenia sirve como indicador de la severidad por su relación con la respuesta antiviral y susceptibilidad a una respuesta hiperinflamatoria (Henry et al., 2020); a pesar que, al inicio de la infección por SARS-CoV-2 hay un incremento de linfocitos T, se ha reportado que pacientes críticos y fallecidos por la COVID-19 presentan valores bajos; de acuerdo a lo reportado por Vadillo y colaboradores, pacientes fallecidos por la COVID-19 favorecieron la mielopoyesis pero sufrieron de linfopenia asociada a una apoptosis exacerbada por el aumento de citocinas pro-inflamatorias (Fathi & Rezaei, 2020; Vadillo et al., 2021; Q. Zhao et al., 2020).

Finalmente, de los valores de laboratorio analizados, se observó que únicamente los pacientes críticos presentan valores altos de CK; al igual que en diversos meta-análisis, donde describen que podría considerarse como un marcador de daño muscular relacionado con la severidad y desenlace, porque los pacientes fallecidos por la COVID-19, que experimentan falla multiorgánica, incluyendo daño en riñón e hígado tienen altos valores (Akbar et al., 2021; Chen et al., 2020; Mao et al., 2020; Orsucci, 2020).

Para evaluar la respuesta inmunitaria causada por la infección de COVID-19 y determinar si la severidad está relacionada, se estudió la respuesta de anticuerpos inducida tras la infección por SARS-CoV-2 en las diferentes cohortes.

La determinación sérica de anticuerpos provee información crucial para entender la infección y dinámica de transmisión en la población (Weiss & Murdoch, 2020); la aplicación de los datos obtenidos depende de factores como el tiempo de detección de los anticuerpos contra el patógeno (tiempo de seroconversión), concentración a diferentes tiempos (cinética de anticuerpos) y tiempo de duración (Lipsitch et al., 2020). Hasta la fecha, si bien no se conoce completamente la respuesta inmunitaria en contra de SARS-CoV-2, un gran número de estudios han sido publicados; sin embargo, los métodos utilizados y cohortes de pacientes analizadas son distintas entre cada uno de ellos, lo que genera un desafío en la integración de los datos generados (Kontou et al., 2020; Lassaunière et al., 2020; Whitman et al., 2020).

Al igual que en SARS-CoV, el genoma de SARS-CoV-2 codifica principalmente para cuatro proteínas estructurales [spike (S), de envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N)]; de ellas, la proteína S juega un papel esencial en la fusión, entrada y transmisión viral, está compuesta por la subunidad S1 responsable de la unión entre el virus-receptor y la subunidad S2 responsable de la fusión del virus con la membrana celular (Jiang, Zhang, et al., 2020).

Como se observa en los resultados obtenidos (Figura 3), al ingreso al hospital, los pacientes graves y críticos presentan anticuerpos de clase IgM e IgG dirigidos contra la proteína N y S2; de acuerdo a estudios reportados, pacientes de cohortes similares presentan anticuerpos de clase IgM e IgG dirigidos contra el virus SARS-CoV-2 que comienzan a ser detectados a partir del día 3 y 4 después del inicio de síntomas (Z. Zhang et al., 2020), esto sugiere que la presencia de la primera línea de defensa de la inmunidad humoral (IgM) y la respuesta de alta afinidad, juegan un papel importante en la inmunidad de memoria de larga duración (IgG). De acuerdo con lo reportado en otros estudios, que determinaron la dinámica de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2 por el ensayo de quimioluminiscencia (CLIA), los picos máximos de anticuerpos tanto de IgM como de IgG en ambas cohortes se encuentran entre el día 25 al 27 después del inicio de síntomas, y en el caso de las IgM, sus valores comienzan a disminuir a partir de esta fecha; sin embargo, es difícil comparar el tiempo de seroconversión y niveles de anticuerpos observados entre

los estudios debido a la diferencia con el tipo de anticuerpos y antígenos empleados (Borremans et al., 2020).

Aunque, se ha postulado que la severidad e inmunidad humoral están correlacionadas (Haveri et al., 2021; A. T. Huang et al., 2020; J. Zhao et al., 2020), no se ha detectado que la severidad de los pacientes afecte el pico máximo de anticuerpos que se alcanza; sin embargo, hay efectos significativos cuando se considera el tiempo de seroconversión de anticuerpos a partir del periodo del inicio de síntomas, donde los pacientes críticos presentan una diferencia significativa en el título de anticuerpos para ambas clases entre el día 10 y 20 desde el inicio de síntomas (Borremans et al., 2020; Lynch et al., 2021). No obstante, existen estudios que contradicen los resultados obtenidos y reportan que no se observa una diferencia entre los anticuerpos de las dos cohortes (Laing et al., 2020). De acuerdo a evidencia consistente reportada para SARS y MERS, la mayoría sugiere que los pacientes infectados desarrollan anticuerpos neutralizantes (nAb) los cuales están relacionados específicamente con la severidad aunque no necesariamente con la cinética de anticuerpos (A. T. Huang et al., 2020).

Para determinar la seroprevalencia de los anticuerpos producidos tras la infección así como la dinámica del virus en la población; se evaluaron los niveles de anticuerpos en pacientes convalecientes así como sus contactos de 3 a 4 meses después del inicio de síntomas; y se determinó que los pacientes convalecientes presentaban anticuerpos de clase IgG pero no de clase IgM, lo cual es consistente con estudios que reportan la presencia de anticuerpos de clase IgG a los 3 meses (B et al., 2020; Iyer et al., 2020; Ripperger et al., 2020; Wajnberg et al., 2020). Adicionalmente, a pesar que se observa una diferencia significativa de anticuerpos de clase IgG en los contactos leves y altos comparados con las muestras pre-pandemia de influenza, los niveles de anticuerpos son menores a los que presentan los pacientes convalecientes y algunos de ellos no entran en el límite de detección; sin embargo, la frecuencia de muestras que se encuentran por arriba de los límites de detección es principalmente en contactos altos, es decir aquellos que tienen contacto directo con pacientes COVID-19 o muestras de ellos, lo cual está relacionado con el riesgo de exposición ocupacional al que se encuentran, así como

el potencial desarrollo asintomático de la infección (Shields et al., 2020). Cabe resaltar que al momento de la toma de muestra se desconocía si, tanto contactos leves como altos, habían contraído el virus en algún momento durante la emergencia sanitaria.

Finalmente, se determinó la capacidad neutralizante de los anticuerpos para relacionarla con la severidad y seroprevalencia en las diferentes cohortes. Puesto que la manipulación del virus de SARS-CoV-2 requiere de instalaciones especiales, las cuales se encuentran limitadas en el país y requieren entrenamiento especial, la capacidad neutralizante se determinó con un kit de virus subrogado de SARS-CoV-2 el cual se basa en la inhibición de la unión entre ACE-2 y RBD por parte de anticuerpos neutralizantes. Cabe mencionar, que la implementación y estandarización del kit para la determinación de los anticuerpos neutralizantes, realizada durante este trabajo, permitió realizar un estudio de seroprevalencia y actividad neutralizante de anticuerpos IgG a nivel nacional durante el 2020 (Muñoz-Medina et al., 2021).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la capacidad neutralizante no tiene diferencia estadística significativa entre los grupos, lo cual sugiere que los niveles de anticuerpos neutralizantes no son un aspecto determinante en el desarrollo y desenlace de los pacientes. Estos resultados contrastan con lo reportado por García-Beltrán y colaboradores, quienes observaron menor porcentaje de neutralización en pacientes críticos, los cuales resultaban tener mayor desenlace (García-Beltrán et al., 2021); sin embargo, la presencia de marcadores de inflamación elevados en los pacientes sugiere que estos también juegan un papel importante en el desarrollo y severidad de la infección. Estos hallazgos se ven sustentados con observaciones previas de Woodruff y colaboradores, quien reportó que los pacientes más afectados, que presentaban anticuerpos anti-RBD y la proteína S, también presentaban altos niveles en sus marcadores de inflamación y citocinas pro-inflamatorias (Woodruff et al., 2020). Por tanto, es el conjunto de factores (marcadores bioquímicos y anticuerpos) los que determinan la severidad y el desenlace de los pacientes infectados. Por otro lado, cabe resaltar que el ensayo subrogado de neutralización se limita a detectar anticuerpos que bloquean la unión

entre ACE-2 y RBD, sin embargo hay reportes de la existencia de anticuerpos neutralizantes que se unen a otras regiones de la proteína S, como el dominio terminal (Cerutti et al., 2021; Chi et al., 2020), los cuales no pueden ser detectados con el ensayo utilizado en el presente trabajo.

## **14. Conclusiones**

Se determinó que pacientes COVID-19 admitidos en la UMAE del Hospital de Especialidades del CMN SXXI y que presentaban cuadros clínicos graves o severos tenían marcadores bioquímicos fuera de los rangos normales y relacionados con aspectos inflamatorios, como el aumento de PCR, dímero D y CK y disminución de linfocitos.

Así mismo, aunque durante la permanencia en el hospital no se encontraron diferencia en los valores de anticuerpos de clase IgM e IgG dirigidos contra las proteínas N y S de SARS-CoV-2; los pacientes críticos presentan mayores valores de anticuerpos. Los cuales pueden ser detectados hasta 4 meses después del inicio de síntomas en pacientes convalecientes a la infección, así como en algunos de sus contactos cercanos o personal de salud. Adicionalmente, en todos los pacientes COVID-19 se observan valores similares de anticuerpos neutralizantes.

## 15. Referencias

- Addi, A. Ben, Lefort, A., Hua, X., Libert, F., Communi, D., Ledent, C., Macours, P., Tilley, S. L., Boeynaems, J. M., & Robaye, B. (2008). Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: Involvement of the A2B receptor. *European Journal of Immunology*, 38(6), 1610–1620. <https://doi.org/10.1002/eji.200737781>
- Akbar, M. R., Pranata, R., Wibowo, A., Lim, M. A., Sihite, T. A., & Martha, J. W. (2021). The prognostic value of elevated creatine kinase to predict poor outcome in patients with COVID-19 - A systematic review and meta-analysis: Creatinine Kinase in COVID-19. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 15, Issue 2, pp. 529–534). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.02.012>
- Ali, N. (2020). Elevated level of C-reactive protein may be an early marker to predict risk for severity of COVID-19. In *Journal of Medical Virology* (Vol. 92, Issue 11, pp. 2409–2411). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jmv.26097>
- Amir, E., Fatemeh, J., Neda, P., & Ali, A. (2020). Prevalence of Underlying Diseases in Hospitalized Patients with COVID-19: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Archives of Academic Emergency Medicine*, 8(1), e35–e35. <http://europepmc.org/article/MED/32232218><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32232218>
- B, I., KT, A., M, Z., AJ, J., B, R., JH, W., Z, L., G, C., OL, R., YM, B., A, P., N, C.-H., C, G., D, C., P, S.-T., F, G., P, B., A, L., A, P., ... AC, G. (2020). Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Science Immunology*, 5(52). <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABE5511>
- Berry, I., Soucy, J. P. R., Tuite, A., & Fisman, D. (2020). Open access epidemiologic data and an interactive dashboard to monitor the COVID-19 outbreak in Canada. In *CMAJ* (Vol. 192, Issue 15, p. E420). Canadian Medical Association. <https://doi.org/10.1503/cmaj.75262>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Boopathi, S., Poma, A. B., & Kolandaivel, P. (2020). Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1758788>
- Borremans, B., Gamble, A., Prager, K. C., Helman, S. K., McClain, A. M., Cox, C., Savage, V., & Lloyd-Smith, J. O. (2020). Quantifying antibody kinetics and RNA detection during early-phase SARS-CoV-2 infection by time since symptom onset. *ELife*, 9, 1–27. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.60122>
- Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C., & Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2088–2094. <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>
- 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., Schmitz, J., Miltenyi, S., ... Thiel, A. (2020). Presence of SARS-CoV-2-reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440>
- Bulut, C., & Kato, Y. (2020). Epidemiology of covid-19. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(SI-1), 563–570. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-172>
- Bunyavanich, S., Do, A., & Vicencio, A. (2020). Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *JAMA*, 323(23), 2427. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8707>
- CCAA. (n.d.). *Enfermedad por el coronavirus (COVID-19)*. Retrieved January 26, 2021, from [https://www.msccbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion\\_67\\_COVID-19.pdf](https://www.msccbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_67_COVID-19.pdf)
- Cerutti, H., Ricci, V., Tesi, G., Soldatini, C., Castria, M., Vaccaro, M. N., Tornesi, S., Toppi, S., Verdiani, S., & Brogi, A. (2021). Large scale production and characterization of SARS-CoV-2 whole antigen for serological test development. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(4), e23735. <https://doi.org/10.1002/JCLA.23735>
- Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
- Channappanavar, R., Zhao, J., & Perlman, S. (2014). T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. In *Immunologic Research* (Vol. 59, Issues 1–3, pp. 118–128). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8534-z>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395(10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., Hao, M., Zhang, Z., Fan, P., Dong, Y., Yang, Y., Chen, Z., Guo, Y., Zhang, J., Li, Y., Song, X., Chen, Y., Xia, L., Fu, L., Hou, L., ... Chen, W. (2020). A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 650–655. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC6952>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., Van Der Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 1–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Coronavirus en México: confirman los primeros casos de covid-19 en el país - BBC News Mundo*. (n.d.). Retrieved June 7, 2020, from <https://www.bbc.com/mundo/noticias-america-latina-51677751>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0050-7>

018-0118-9

- Du Toit, A. (2020). Outbreak of a novel coronavirus. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 123–123. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0332-0>
- Du, Y., Tu, L., Zhu, P., Mu, M., Wang, R., Yang, P., Wang, X., Hu, C., Ping, R., Hu, P., Li, T., Cao, F., Chang, C., Hu, Q., Jin, Y., & Xu, G. (2020). Clinical features of 85 fatal cases of COVID-19 from Wuhan: A retrospective observational study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(11), 1372–1379. <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0543OC>
- Dudley, J. P., & Lee, N. T. (2020). Disparities in age-specific morbidity and mortality from sars-cov-2 in China and the republic of Korea. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 863–865. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa354>
- Ejaz, H., Alsrhani, A., Zafar, A., Javed, H., Junaid, K., Abdalla, A. E., Abosalif, K. O. A., Ahmed, Z., & Younas, S. (2020). COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1833–1839). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.014>
- Fafi-Kremer, S., Bruel, T., Madec, Y., Grant, R., Tondeur, L., Grzelak, L., Staropoli, I., Anna, F., Souque, P., Fernandes-Pellerin, S., Jolly, N., Renaudat, C., Ungeheuer, M.-N., Schmidt-Mutter, C., Collongues, N., Bolle, A., Velay, A., Lefebvre, N., Mielcarek, M., ... Fontanet, A. (2020). Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine*, 59, 102915. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102915>
- Fathi, N., & Rezaei, N. (2020). Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. In *Cell Biology International* (Vol. 44, Issue 9, pp. 1792–1797). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/cbin.11403>
- Fung, T. S., & Liu, D. X. (2019). *Human Coronavirus : Host-Pathogen Interaction*. 529–560.
- Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., Astudillo, M. G., Yang, D., Miller, T. E., Feldman, J., Hauser, B. M., Caradonna, T. M., Clayton, K. L., Nitido, A. D., Murali, M. R., Alter, G., Charles, R. C., Dighe, A., Branda, J. A., Lennerz, J. K., Lingwood, D., Schmidt, A. G., Iafate, A. J., & Balazs, A. B. (2021). COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*, 184(2), 476-488.e11. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.12.015>
- Gargaglioni, L. H., & Marques, D. A. (2020). Let's talk about sex in the context of COVID-19. *Journal of Applied Physiology*, 128(6), 1533–1538. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00335.2020>
- GeurtsvanKessel, C., Okba, N., Igloi, Z., Embregts, C., Laksono, B., Leijten, L., Rahamat-Langendoen, J., van den Akker, J., van Kampen, J., van der Eijk, A., van Binnendijk, R., Haagmans, B., & Koopmans, M. (2020). *Towards the next phase: evaluation of serological assays for diagnostics and exposure assessment*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20077156>
- Golsorkhi, M., & Ravanshad, Y. (2020). A Review on New Coronavirus Mechanism of Action. *Journal of Pediatric Nephrology*, 8(2), 2–5. <https://doi.org/10.22037/JPN.V8I2.30702>
- Graham, R. L., Donaldson, E. F., & Baric, R. S. (2013). A decade after SARS: Strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), 836–848. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3143>

- Gray, J. I., Westerhof, L. M., & MacLeod, M. K. L. (2018). The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. *Immunology*, *154*(4), 574–581. <https://doi.org/10.1111/imm.12929>
- 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>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, *382*(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., Dela Cruz, C. S., Wang, Y., Wu, C., Xiao, Y., Zhang, L., Han, L., Dang, S., Xu, Y., Yang, Q. W., Xu, S. Y., Zhu, H. D., Xu, Y. C., Jin, Q., ... Wang, J. (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *71*(15), 778–785. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>
- Gupta, M. K., Vemula, S., Donde, R., Gouda, G., Behera, L., & Vadde, R. (2020). In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *0*(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1751300>
- Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(37), 12910–12934. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.013930>
- Haveri, A., Ekström, N., Solastie, A., Virta, C., Österlund, P., Isosaari, E., Nohynek, H., Palmu, A. A., & Melin, M. (2021). Persistence of neutralizing antibodies a year after SARS-CoV-2 infection in humans. *European Journal of Immunology*, *51*(12), 3202–3213. <https://doi.org/10.1002/EJI.202149535>
- He, F., Deng, Y., & Li, W. (2020). Coronavirus disease 2019: What we know? *Journal of Medical Virology*, *92*(7), 719–725. <https://doi.org/10.1002/jmv.25766>
- Henry, B. M., Cheruiyot, I., Vikse, J., Mutua, V., Kipkorir, V., Benoit, J., Plebani, M., Bragazzi, N., & Lippi, G. (2020). Lymphopenia and neutrophilia at admission predicts severity and mortality in patients with COVID-19: A meta-analysis. *Acta Biomedica*, *91*(3), 1–16. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i3.10217>
- 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>
- Hokello, J., Sharma, A. L., Shukla, G. C., & Tyagi, M. (2020). A narrative review on

- the basic and clinical aspects of the novel SARS-CoV-2, the etiologic agent of COVID-19. *Ann Transl Med*, 8(24), 1686. <https://doi.org/10.21037/atm-20-5272>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. In *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, A. T., Garcia-Carreras, B., Hitchings, M. D. T., Yang, B., Katzelnick, L. C., Rattigan, S. M., Borgert, B. A., Moreno, C. A., Solomon, B. D., Trimmer-Smith, L., Etienne, V., Rodriguez-Barraquer, I., Lessler, J., Salje, H., Burke, D. S., Wesolowski, A., & Cummings, D. A. T. (2020). A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18450-4>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Iyer, A. S., Jones, F. K., Nodoushania, A., Kelly, M., Becker, M., Slater, D., Mills, R., Teng, E., Kamruzzaman, M., Garcia-Beltran, W. F., Astudillo, M., Yang, D., Miller, T. E., Oiver, E., Fischinger, S., Atyeo, C., Iafrate, A. J., Calderwood, S. B., Lauer, S. A., ... Charles, R. C. (2020). Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *MedRxiv*, 2020.07.18.20155374. <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.20155374>
- Jain, V., & Yuan, J. M. (2020). Predictive symptoms and comorbidities for severe COVID-19 and intensive care unit admission: a systematic review and meta-analysis. In *International Journal of Public Health* (Vol. 65, Issue 5, pp. 533–546). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00038-020-01390-7>
- Jiang, S., Hillyer, C., & Du, L. (2020). Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. In *Trends in Immunology* (Vol. 41, Issue 5, pp. 355–359). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.007>
- Jiang, S., Zhang, X., Yang, Y., Hotez, P. J., & Du, L. (2020). Neutralizing antibodies for the treatment of COVID-19. *Nature Biomedical Engineering* 2020 4:12, 4(12), 1134–1139. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00660-2>
- Kammar-García, A., de Vidal-Mayo, J. J., Vera-Zertuche, J. M., Lazcano-Hernández, M., Vera-López, O., Segura-Badilla, O., Aguilar-Alonso, P., & Navarro-Cruz, A. R. (2020). Impact of comorbidities in Mexican SARS-CoV-2-positive patients: A retrospective analysis in a national cohort. *Revista de Investigacion Clinica*, 72(3), 151–158. <https://doi.org/10.24875/RIC.20000207>
- Kirchdoerfer, R. N., Cottrell, C. A., Wang, N., Pallesen, J., Yassine, H. M., Turner, H. L., Corbett, K. S., Graham, B. S., McLellan, J. S., & Ward, A. B. (2016). Prefusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*, 531(7592), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature17200>
- Ko, J. H., Park, G. E., Lee, J. Y., Lee, J. Y., Cho, S. Y., Ha, Y. E., Kang, C. I., Kang, J. M., Kim, Y. J., Huh, H. J., Ki, C. S., Jeong, B. H., Park, J., Chung, C. R., Chung, D. R., Song, J. H., & Peck, K. R. (2016). Predictive factors for pneumonia development and progression to respiratory failure in MERS-CoV infected patients. *Journal of Infection*, 73(5), 468–475.

- <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.08.005>
- Komatsu, T., Suzuki, Y., Imai, J., Sugano, S., Hida, M., Tanigami, A., Muroi, S., Yamada, Y., & Hanaoka, K. (2002). Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2). *Mitochondrial DNA*, 13(4), 217–220. <https://doi.org/10.1080/1042517021000021608>
- Kontou, P. I., Braliou, G. G., Dimou, N. L., Nikolopoulos, G., Bagos, P. G., & Bagos, P. (2020). Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: a meta-analysis. *MedRxiv*, 10(5), 2020.04.22.20074914. <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20074914>
- Laing, A. G., Lorenc, A., del Molino del Barrio, I., Das, A., Fish, M., Monin, L., Muñoz-Ruiz, M., McKenzie, D. R., Hayday, T. S., Francos-Quijorna, I., Kamdar, S., Joseph, M., Davies, D., Davis, R., Jennings, A., Zlatareva, I., Vantourout, P., Wu, Y., Sofra, V., ... Hayday, A. C. (2020). A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nature Medicine* 2020 26:10, 26(10), 1623–1635. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6>
- Lassaunière, R., Frische, A., Harboe, Z. B., Nielsen, A. C. Y., Fomsgaard, A., Krogfelt, K. A., & Jørgensen, C. S. (2020). Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. *MedRxiv*, 2020.04.09.20056325. <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.20056325>
- Lee, K.-Y., Rhim, J.-W., & Kang, J.-H. (2020). Immunopathogenesis of COVID-19 and early immunomodulators. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 63(7), 239. <https://doi.org/10.3345/CEP.2020.00759>
- Levi, M., & van der Poll, T. (2017). Coagulation and sepsis. In *Thrombosis Research* (Vol. 149, pp. 38–44). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007>
- Li, M. Y., Li, L., Zhang, Y., & Wang, X. S. (2020). Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x>
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K. S. M., Lau, E. H. Y., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., ... Feng, Z. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
- Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., Liu, L., Amit, I., Zhang, S., & Zhang, Z. (2020). Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine* 2020 26:6, 26(6), 842–844. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>
- Liblau, R. S., Wong, F. S., Mars, L. T., & Santamaria, P. (2002). Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: Emerging targets for therapeutic intervention. *Immunity*, 17(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00338-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00338-2)
- Lipsitch, M., Kahn, R., & Mina, M. J. (2020). Antibody testing will enhance the power and accuracy of COVID-19-prevention trials. *Nature Medicine*, 26(6), 818–819. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0887-3>
- Liu, F., Xu, A., Zhang, Y., Xuan, W., Yan, T., Pan, K., Yu, W., & Zhang, J. (2020).

- Patients of COVID-19 may benefit from sustained Lopinavir-combined regimen and the increase of Eosinophil may predict the outcome of COVID-19 progression. *International Journal of Infectious Diseases*, 95, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.013>
- Liu, J., Ji, H., Zheng, W., Wu, X., Zhu, J. J., Arnold, A. P., & Sandberg, K. (2010). Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17 $\beta$ -oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biology of Sex Differences*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/2042-6410-1-6>
- Liu, Yang, Mao, B., Liang, S., Yang, J. W., Lu, H. W., Chai, Y. H., Wang, L., Zhang, L., Li, Q. H., Zhao, L., He, Y., Gu, X. L., Ji, X. Bin, Li, L., Jie, Z. J., Li, Q., Li, X. Y., Lu, H. Z., Zhang, W. H., ... Xu, J. F. (2020). Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. In *European Respiratory Journal* (Vol. 318, Issue 6, p. 2001112). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.01112-2020>
- Liu, Yingxia, Yang, Y., Zhang, C., Huang, F., Wang, F., Yuan, J., Wang, Z., Li, J., Li, J., Feng, C., Zhang, Z., Wang, L., Peng, L., Chen, L., Qin, Y., Zhao, D., Tan, S., Yin, L., Xu, J., ... Liu, L. (2020). Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Science China Life Sciences*, 63(3), 364–374. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1643-8>
- 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>
- López-Ortiz, E., López-Ortiz, G., Mendiola-Pastrana, I. R., Mazón-Ramírez, J. J., & Díaz-Quiñonez, J. A. (2020). De la atención de un brote por un patógeno desconocido en Wuhan hasta la preparación y respuesta ante la emergencia de Covid-19 en México. *Gaceta de México*, 156(2), 133–138. <https://doi.org/10.24875/gmm.20000046>
- Lu, H., Stratton, C. W., & Tang, Y. W. (2020). Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 401–402. <https://doi.org/10.1002/jmv.25678>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Luo, X., Zhou, W., Yan, X., Guo, T., Wang, B., Xia, H., Ye, L., Xiong, J., Jiang, Z., Liu, Y., Zhang, B., & Yang, W. (2020). Prognostic value of C-reactive protein in patients with COVID-19. In *medRxiv*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.03.21.20040360>
- Lynch, K. L., Whitman, J. D., Lacanienta, N. P., Beckerdite, E. W., Kastner, S. A., Shy, B. R., Goldgof, G. M., Levine, A. G., Bapat, S. P., Stramer, S. L., Esensten, J. H., Hightower, A. W., Bern, C., & Wu, A. H. B. (2021). Magnitude and Kinetics of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Responses and Their Relationship to Disease Severity. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(2), 301–

308. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA979>
- Mao, L., Jin, H., Wang, M., Hu, Y., Chen, S., He, Q., Chang, J., Hong, C., Zhou, Y., Wang, D., Miao, X., Li, Y., & Hu, B. (2020). Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurology*, 77(6), 683–690. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
- Marnell, L., Mold, C., & Du Clos, T. W. (2005). C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. In *Clinical Immunology* (Vol. 117, Issue 2, pp. 104–111). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.08.004>
- McKechnie, J. L., & Blish, C. A. (2020). The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19? *Cell Host and Microbe*, 27(6), 863–869. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.009>
- Meyer, B., Drosten, C., & Müller, M. A. (2014). Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls. *Virus Research*, 194, 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2014.03.018>
- Moreno-Eutimio, M. A., López-Macías, C., & Pastelin-Palacios, R. (2020). Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes. *Microbes and Infection*, 22(4–5), 226–229. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2020.04.009>
- Muñoz-Medina, J. E., Grajales-Muñiz, C., Salas-Lais, A. G., Fernandes-Matano, L., López-Macías, C., Monroy-Muñoz, I. E., Coy-Arechavaleta, A. S., Palomec-Nava, I. D., Duque-Molina, C., Madera-Sandoval, R. L., Rivero-Arredondo, V., González-Ibarra, J., Alvarado-Yaah, J. E., Rojas-Mendoza, T., Santacruz-Tinoco, C. E., González-Bonilla, C. R., & Borja-Aburto, V. H. (2021). SARS-CoV-2 IgG Antibodies Seroprevalence and Sera Neutralizing Activity in MEXICO: A National Cross-Sectional Study during 2020. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 850, 9(4), 850. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040850>
- Nuevo Coronavirus en el mundo COVID-19. Comunicado Técnico Diario | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx.* (n.d.). Retrieved June 7, 2020, from <https://www.gob.mx/salud/prensa/nuevo-coronavirus-en-el-mundo-covid-19-comunicado-tecnico-diario-244449>
- Ong, E. Z., Chan, Y. F. Z., Leong, W. Y., Lee, N. M. Y., Kalimuddin, S., Haja Mohideen, S. M., Chan, K. S., Tan, A. T., Bertolotti, A., Ooi, E. E., & Low, J. G. H. (2020). A Dynamic Immune Response Shapes COVID-19 Progression. *Cell Host and Microbe*, 27(6), 879–882.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.021>
- Orsucci, D. (2020). Is creatine kinase associated with outcome in COVID-19? *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 2020. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2020.53>
- Phan, L. T., Nguyen, T. V., Luong, Q. C., Nguyen, T. V., Nguyen, H. T., Le, H. Q., Nguyen, T. T., Cao, T. M., & Pham, Q. D. (2020). Importation and Human-to-Human Transmission of a Novel Coronavirus in Vietnam. *New England Journal of Medicine*, 382(9), 872–874. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001272>
- Post, N., Eddy, D., Huntley, C., van Schalkwyk, M. C. I., Shrotri, M., Leeman, D., Rigby, S., Williams, S. V., Bermingham, W. H., Kellam, P., Maher, J., Shields, A. M., Amirthalingam, G., Peacock, S. J., & Ismail, S. A. (2020). Antibody

- response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*, 15(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0244126>
- Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., Xie, C., Ma, K., Shang, K., Wang, W., & Tian, D. S. (2020). Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 762–768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
- Ripperger, T. J., Uhrlaub, J. L., Watanabe, M., Wong, R., Castaneda, Y., Pizzato, H. A., Thompson, M. R., Bradshaw, C., Weinkauff, C. C., Bime, C., Erickson, H. L., Knox, K., Bixby, B., Parthasarathy, S., Chaudhary, S., Natt, B., Cristan, E., El Aini, T., Rischard, F., ... Bhattacharya, D. (2020). Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity*, 53(5), 925-933.e4. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.10.004>
- RIVM. (n.d.). *Epidemiologische situatie COVID-19 op de CAS- en BES-eilanden (29 december 2020) | RIVM*. Retrieved January 26, 2021, from <https://www.rivm.nl/documenten/epidemiologische-situatie-covid-19-op-cas-en-bes-eilanden-29-december-2020>
- Rizzo, P., Vieceli Dalla Sega, F., Fortini, F., Marracino, L., Rapezzi, C., & Ferrari, R. (2020). COVID-19 in the heart and the lungs: could we “Notch” the inflammatory storm? *Basic Research in Cardiology* 2020 115:3, 115(3), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S00395-020-0791-5>
- Robbiani, D. F., Gaebler, C., Muecksch, F., Lorenzi, J. C. C., Wang, Z., Cho, A., Agudelo, M., Barnes, C. O., Gazumyan, A., Finkin, S., Hägglöf, T., Oliveira, T. Y., Viant, C., Hurley, A., Hoffmann, H. H., Millard, K. G., Kost, R. G., Cipolla, M., Gordon, K., ... Nussenzweig, M. C. (2020). Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*, 584(7821), 437–442. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
- Rodrigue-Gervais, I. G., Labbé, K., Dagenais, M., Dupaul-Chicoine, J., Champagne, C., Morizot, A., Skeldon, A., Brincks, E. L., Vidal, S. M., Griffith, T. S., & Saleh, M. (2014). Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival. *Cell Host and Microbe*, 15(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.003>
- Rodríguez, Y., Novelli, L., Rojas, M., De Santis, M., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Ramírez-Santana, C., Costanzo, A., Ridgway, W. M., Ansari, A. A., Gershwin, M. E., Selmi, C., & Anaya, J. M. (2020). Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19. *Journal of Autoimmunity*, 114(May), 102506. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102506>
- Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L., & Song, J. (2020). Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Medicine*, 46(5), 846–848. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05991-x>
- Rubin, R. (2020). Testing an Old Therapy Against a New Disease: Convalescent Plasma for COVID-19. *JAMA*, 323(21), 2114–2117. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.7456>
- Sarma, P., Shekhar, N., Prajapat, M., Avti, P., Kaur, H., Kumar, S., Singh, S., Kumar, H., Prakash, A., Dhibar, D. P., & Medhi, B. (2020). In-silico homology assisted

- identification of inhibitor of RNA binding against 2019-nCoV N-protein (N terminal domain). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1753580>
- Sarzi-Puttini, P., Giorgi, V., Sirotti, S., Marotto, D., Ardizzone, S., Rizzardini, G., Antinori, S., & Galli, M. (2020). COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? In *Clinical and experimental rheumatology* (Vol. 38, Issue 2, pp. 337–342). NLM (Medline). <https://europepmc.org/article/med/32202240>
- Scully, E. P., Haverfield, J., Ursin, R. L., Tannenbaum, C., & Klein, S. L. (2020). Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nature Reviews Immunology*, 20(7), 442–447. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0348-8>
- 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>
- Seow, J., Graham, C., Merrick, B., Acors, S., Pickering, S., Steel, K. J. A., Hemmings, O., O’Byrne, A., Kouphou, N., Galao, R. P., Betancor, G., Wilson, H. D., Signell, A. W., Winstone, H., Kerridge, C., Huettner, I., Jimenez-Guardeño, J. M., Lista, M. J., Temperton, N., ... Doores, K. J. (2020). Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature Microbiology* 2020 5:12, 5(12), 1598–1607. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00813-8>
- Shah, V. K., Firmal, P., Alam, A., Ganguly, D., & Chattopadhyay, S. (2020). Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Frontiers in Immunology*, 0, 1949. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01949>
- Shang, W., Dong, J., Ren, Y., Tian, M., Li, W., Hu, J., & Li, Y. (2020). The value of clinical parameters in predicting the severity of COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 2188–2192. <https://doi.org/10.1002/jmv.26031>
- Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X., Bucci, E., Piacentini, M., Ippolito, G., & Melino, G. (2020). COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death & Differentiation* 2020 27:5, 27(5), 1451–1454. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>
- Shields, A., Faustini, S. E., Perez-Toledo, M., Jossi, S., Aldera, E., Allen, J. D., Al-Taei, S., Backhouse, C., Bosworth, A., Dunbar, L. A., Ebanks, D., Emmanuel, B., Garvey, M., Gray, J., Kidd, I. M., McGinnell, G., McLoughlin, D. E., Morley, G., O’Neill, J., ... Richter, A. G. (2020). SARS-CoV-2 seroprevalence and asymptomatic viral carriage in healthcare workers: a cross-sectional study. *Thorax*, 75(12), 1089–1094. <https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2020-215414>
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E. A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S. L. H. V., Degli-Esposti, M. A., & Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 42(4), 501–510. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2004.07.034>
- Soresina, A., Moratto, D., Chiarini, M., Paolillo, C., Baresi, G., Focà, E., Bezzi, M.,

- Baronio, B., Giacomelli, M., & Badolato, R. (2020). Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatric Allergy and Immunology*, 31(5), 565–569. <https://doi.org/10.1111/PAI.13263>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Suthar, M. S., Zimmerman, M. G., Kauffman, R. C., Mantus, G., Linderman, S. L., Hudson, W. H., Vanderheiden, A., Nyhoff, L., Davis, C. W., Adekunle, O., Affer, M., Sherman, M., Reynolds, S., Verkerke, H. P., Alter, D. N., Guarner, J., Bryksin, J., Horwath, M. C., Arthur, C. M., ... Wrammert, J. (2020). Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Reports Medicine*, 1(3), 100040. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100040>
- Takahashi, T., & Iwasaki, A. (2021). Sex differences in immune responses: Biological sex differences in immunity potentially underlie male bias for severe COVID-19. In *Science* (Vol. 371, Issue 6527, pp. 347–348). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.abe7199>
- Tan, L., Wang, Q., Zhang, D., Ding, J., Huang, Q., Tang, Y. Q., Wang, Q., & Miao, H. (2020). Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>
- Tan, Y. J., Goh, P. Y., Fielding, B. C., Shen, S., Chou, C. F., Fu, J. L., Leong, H. N., Leo, Y. S., Ooi, E. E., Ling, A. E., Lim, S. G., & Hong, W. (2004). Profiles of Antibody Responses against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Recombinant Proteins and Their Potential Use as Diagnostic Markers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(2), 362–371. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.2.362-371.2004>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2016). Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*, 8(8), 959–970. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0020>
- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology* 20:6, 20(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Teuwen, L. A., Geldhof, V., Pasut, A., & Carmeliet, P. (2020). COVID-19: the vasculature unleashed. *Nature Reviews Immunology*, 20(7), 389–391. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0343-0>
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). TYPE I INTERFERONS ( $\alpha/\beta$ ) IN IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 307–335. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843>
- Thevarajan, I., Nguyen, T. H. O., Koutsakos, M., Druce, J., Caly, L., van de Sandt, C. E., Jia, X., Nicholson, S., Catton, M., Cowie, B., Tong, S. Y. C., Lewin, S. R., & Kedzierska, K. (2020). Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nature Medicine*,

- 26(4), 453–455. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2>
- Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R., & Lanzavecchia, A. (2004). An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: Potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature Medicine*, *10*(8), 871–875. <https://doi.org/10.1038/nm1080>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Vadillo, E., Taniguchi-Ponciano, K., Lopez-Macias, C., Carvente-Garcia, R., Mayani, H., Ferat-Osorio, E., Flores-Padilla, G., Torres, J., Gonzalez-Bonilla, C. R., Majluf, A., Albarran-Sanchez, A., Galan, J. C., Peña-Martínez, E., Silva-Román, G., Vela-Patiño, S., Ferreira-Hermosillo, A., Ramirez-Renteria, C., Espinoza-Sanchez, N. A., Pelayo-Camacho, R., ... Mercado, M. (2021). A Shift Towards an Immature Myeloid Profile in Peripheral Blood of Critically Ill COVID-19 Patients. *Archives of Medical Research*, *52*(3), 311–323. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2020.11.005>
- Verhelst, J., Hulpiau, P., & Saelens, X. (2013). Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *77*(4), 551–566. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-13>
- 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 (New York, N.Y.)*, *370*(6521), 1227–1230. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD7728>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *323*(11), 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, L. (2020). C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. *Medecine et Maladies Infectieuses*, *50*(4), 332–334. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.03.007>
- Weiss, P., & Murdoch, D. R. (2020). Clinical course and mortality risk of severe COVID-19. *Lancet (London, England)*, *395*(10229), 1014–1015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30633-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30633-4)
- Whitman, J. D., Hiatt, J., Mowery, C. T., Shy, B. R., Yu, R., Yamamoto, T. N., Rathore, U., Goldgof, G. M., Whitty, C., Woo, J. M., Gallman, A. E., Miller, T. E., Levine, A. G., Nguyen, D. N., Bapat, S. P., Balcersek, J., Bylsma, S. A., Lyons, A. M., Li, S., ... Marson, A. (2020). Test performance evaluation of SARS-CoV-2 serological assays. *MedRxiv*, *38*(10), 2020.04.25.20074856. <https://doi.org/10.1101/2020.04.25.20074856>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as

- the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/jvi.06540-11>
- 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* 2020 21:12, 21(12), 1506–1516. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.aax0902>
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(13), 1239–1242. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Xiang, F., Wang, X., He, X., Peng, Z., Yang, B., Zhang, J., Zhou, Q., Ye, H., Ma, Y., Li, H., Wei, X., Cai, P., & Ma, W. L. (2020). Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 71(8), 1930–1934. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>
- Xiong, Y., Liu, Y., Cao, L., Wang, D., Guo, M., Jiang, A., Guo, D., Hu, W., Yang, J., Tang, Z., Wu, H., Lin, Y., Zhang, M., Zhang, Q., Shi, M., Liu, Y., Zhou, Y., Lan, K., & Chen, Y. (2020). Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 761–770. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1747363>
- Xu, X., Sun, J., Nie, S., Li, H., Kong, Y., Liang, M., Hou, J., Huang, X., Li, D., Ma, T., Peng, J., Gao, S., Shao, Y., Zhu, H., Lau, J. Y. N., Wang, G., Xie, C., Jiang, L., Huang, A., ... Hou, F. F. (2020). Seroprevalence of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in China. *Nature Medicine*, 26(8), 1193–1195. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0949-6>
- Xu, X. W., Wu, X. X., Jiang, X. G., Xu, K. J., Ying, L. J., Ma, C. L., Li, S. B., Wang, H. Y., Zhang, S., Gao, H. N., Sheng, J. F., Cai, H. L., Qiu, Y. Q., & Li, L. J. (2020). Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: Retrospective case series. *The BMJ*, 368(January), 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.m606>
- Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q., Ji, R., Wang, H., Wang, Y., & Zhou, Y. (2020a). Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 94, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.017>
- Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q., Ji, R., Wang, H., Wang, Y., & Zhou, Y. (2020b). Prevalence of comorbidities and its effects in coronavirus disease 2019 patients: A systematic review and meta-analysis. *International*

- Journal of Infectious Diseases*, 94, 91–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.017>
- Yang, M., Li, C. K., Li, K., Hon, K. L., Ng, M. H., Chan, P. K. S., & Fok, T. F. (2004). Hematological findings in SARS patients and possible mechanisms (review). In *International journal of molecular medicine* (Vol. 14, Issue 2, pp. 311–315). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ijmm.14.2.311>
- Young, B., Gleeson, M., & Cripps, A. W. (1991). C-reactive protein: A critical review. *Pathology*, 23(2), 118–124. <https://doi.org/10.3109/00313029109060809>
- Yu, H. H., Qin, C., Chen, M., Wang, W., & Tian, D. S. (2020). D-dimer level is associated with the severity of COVID-19. *Thrombosis Research*, 195, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.07.047>
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1211721>
- Zhang, L., Yan, X., Fan, Q., Liu, H., Liu, X., Liu, Z., & Zhang, Z. (2020). D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(6), 1324–1329. <https://doi.org/10.1111/jth.14859>
- Zhang, Z., Xiao, T., Wang, Y., Yuan, J., Ye, H., Wei, L., Wang, H., Liao, X., Qian, S., Wang, Z., & Liu, L. (2020). Early viral clearance and antibody kinetics of COVID-19 among asymptomatic carriers. In *medRxiv*. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.28.20083139v1.full.pdf+html>
- Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., He, Q., Li, Z., He, B., Zhang, T., ... Zhang, Z. (2020). Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(16), 2027–2034. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA344>
- Zhao, Q., Meng, M., Kumar, R., Wu, Y., Huang, J., Deng, Y., Weng, Z., & Yang, L. (2020). Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 96, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.086>
- Zheng, M., Gao, Y., Wang, G., Song, G., Liu, S., Sun, D., Xu, Y., & Tian, Z. (2020). Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(5), 533–535. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, L. L. M., Xie, Z. H., Chan, K. H., Li, P. H., Tan, S. Y., Chang, Q., Xie, J. P., Liu, X. Q., Xu, J., Li, D. X., Yuen, K. Y., Peiris, J. S. M., & Guan, Y. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*, 362(9393), 1353–1358. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14630-2)
- Zhou, M., Zhang, X., & Qu, J. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Frontiers of Medicine*, 14(2), 126–135.

<https://doi.org/10.1007/s11684-020-0767-8>

- Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, Y., Fu, B., Zheng, X., Wang, D., Zhao, C., Qi, Y., Sun, R., Tian, Z., Xu, X., & Wei, H. (2020). Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review*, 7(6), 998–1002. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041>
- Zhou, Z., Ren, L., Zhang, L., Zhong, J., Xiao, Y., Jia, Z., Guo, L., Yang, J., Wang, C., Jiang, S., Yang, D., Zhang, G., Li, H., Chen, F., Xu, Y., Chen, M., Gao, Z., Yang, J., Dong, J., ... Wang, J. (2020). Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host and Microbe*, 27(6), 883-890.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.017>
- Zhu, Y., Zhu, G., Luo, L., Flies, A. S., & Chen, L. (2007). CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood*, 109(11), 4882–4889. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-043463>

## 16. Anexo 1. Carta de aprobación del proyecto



### Dictamen de Aprobación

Miércoles, 01 de julio de 2020.

Ref. 09-B5-61-2800/2020/

Dr. Constantino III Roberto López Macías  
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica Siglo XXI  
Nivel Central

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Estudio de la respuesta inmunitaria protectora mediada por anticuerpos en los pacientes infectados con SARS-CoV-2 y sus contactos cercanos, para el desarrollo inmunoterapias**, fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: **R-2020-785-095**.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente

Dr. José Ramón Paniagua Sierra  
Presidente  
Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:  
Se anexa dictamen F-CNIC-2020-129

JRPS/SNN/iah

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL