



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDES
RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN
LINFOCITOS TCD4+ EN EL MOMENTO AGUDO DE
ENFERMEDAD POR COVID 19.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN NEUMOLOGÍA**

**PRESENTA:
DR. DAVID AGUSTIN FERNANDEZ LOPEZ**

**ASESOR DE TESIS:
DRA. IVETTE BUENDÍA ROLDAN
DRA. LESLIE CHAVEZ GALAN**



CIUDAD DE MEXICO

AGOSTO 2023



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.



**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
“Dr. Ismael Cosío Villegas”**

DR. JUAN CARLOS VAZQUEZ GARCÍA
Director de Enseñanza

DRA. MARIA DEL CARMEN CANO SALAS
Subdirectora de Enseñanza

DRA MARIA DEL CARMEN CANO SALAS
Titular del Departamento de Formación de Posgrado

DRA. IVETTE BUENDIA ROLDAN
Titular del Laboratorio de Inv. Traslacional en Envejecimiento y Fibrosis Pulmonar

DRA. LESLIE CHAVEZ GALAN.
Titular del laboratorio de Inmunología Integrativa.

INDICE

• Agradecimientos.....	4
• Resumen.....	5
• Introducción.....	6
• Planteamiento del problema	12
• Justificación	12
• Pregunta de investigación	12
• Hipótesis.....	12
• Objetivo General.....	12
• Objetivos específicos.....	13
• Material y métodos.....	13
○ A) Lugar de estudio.....	13
○ B) Población de estudio.....	13
○ C) Diseño de estudio.....	13
○ D) Tamaño de muestra.....	13
○ E) Procedimiento de estudio.....	13
○ F) Criterios de inclusión, exclusion,	13
○ G) Grupo de estudio.....	14
○ H) Variables.....	14
○ I) Consideraciones Éticas.....	18
• Resultados.....	19
• Discusión.....	23
• Conclusión.....	25
• Referencias.....	26
• Abreviaturas.....	28

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la oportunidad de experimentar y vivir en este mundo maravilloso, por la casualidad y oportunidad que me brindo de conocer a las personas que han brindado su confianza y cuidados para ser la persona que soy y que llegare a ser.

Resumen.

Introducción: El espectro clínico de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) parece ser amplio, desde una infección asintomática o una enfermedad leve hasta una neumonía intersticial grave con síndrome de distrés respiratorio agudo (SIRA) e incluso la muerte. La activación tardía de células T CD4+ específicas de SARS-CoV-2 se asoció con COVID-19 grave o mortal, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de PD1 en linfocitos TCD 4 en pacientes con COVID-19 con y sin apoyo mecánico ventilatorio en el momento agudo de la enfermedad.

Metodología:

De Mayo 2020 a Enero del 2021, estudiamos a pacientes divididos en 3 grupos: intubados (n=20) con enfermedad de COVID-19 que requirió apoyo ventilatorio invasivo por SIRA, 10 no intubados con COVID-19 que no requirieron intubación y 10 sujetos controles, se compararon las características clínicas y se evaluaron las poblaciones celulares de linfocitos T, así como moléculas asociadas a agotamiento celular mediante citometría de flujo.

Resultados: Los tres grupos estudiados fueron similares en edad, respecto al sexo los pacientes no intubados fueron masculinos en 90%, el IMC en el grupo pacientes intubados fue superior con respecto a los no intubados ($p < 0.003$). Los leucocitos, DHL, DD, fibrinógeno, PCR fueron mayor en el grupo de intubados en comparación con el grupo de no intubados. En los tres grupos, los linfocitos T-CD4+ y CD20+ se presentan con mayor frecuencia (77% y 28% respectivamente) en el grupo de pacientes intubados. En los LT-CD4+ se encuentran incrementadas la en comparación con el grupo control (49% vs 5% $p < 0.0001$). Para la expresión de PDL-1 la diferencia significativa fue en el grupo de LTCD4+ comparando tanto el grupo de intubados y los no intubados con los controles, (50% vs 0.2% $p < 0.001$) y (85% vs 0.2% $p < 0.0001$), respectivamente.

Conclusiones:

Identificamos que los pacientes con mayor expresión de PD1 tiene mayor riesgo de presentar una forma de la enfermedad severa a nivel pulmonar, que requirió apoyo ventilatorio al momento del diagnóstico de COVID-19.

Introducción:

La enfermedad por el COVID - 19 , está causada por el virus SARS-COV2 (Severa Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Virus que tiene la capacidad de atenuar la respuesta celular inmune adaptativa, así mismo genera una tormenta de citocinas, una desregulación del sistema inmune, y como consecuencia una expresión clínica desfavorable.

Este virus se originó en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, en diciembre de 2019, se le ha atribuido una tasa de mortalidad global del 3-6% antes de la implementación de las vacunas, pero probablemente fue mayor; la extensión de la COVID-19 por todo el mundo, hizo que la OMS decretara estado de Pandemia el 11 de marzo de 2020¹.

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, perteneciente al gran grupo de los coronavirus, comparte importantes características estructurales y moleculares con otros coronavirus, incluida la presencia de proteínas estructurales S (espiga), E (envoltura), M (membrana) responsables de la formación y estabilidad de la envoltura viral y N (nucleocápside) que interactúa con el genoma de ARN, la interacción del virus con la célula huésped (vía ACE2, enzima convertidora de angiotensina 2) está mediada por la proteína S. Este virus se transmite por vía aérea o por contacto con mucosas, y su capacidad de infectar es alta, ya que los individuos portadores pueden contagiar el virus durante su estado asintomático. Su fase de incubación oscila entre 3 -10 días, inicialmente se manifiesta con síntomas respiratorios, alrededor de un 80% de los pacientes desarrollan un cuadro asintomático, un 20% restante desarrolla un cuadro de neumonía, con insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) y aumento de la respuesta inflamatoria sistémica con marcadores inflamatorios elevados y desregulación del sistema inmune. La mortalidad que desarrolla este cuadro inflamatorio oscila entre un 10% y 20%. también puede presentar otras manifestaciones clínicas menos frecuentes, pero no menos importantes, como fenómenos trombocitos e inflamación cutánea¹.

El espectro clínico de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) parece ser amplio, desde una infección asintomática o una enfermedad leve hasta una neumonía intersticial grave con síndrome de distrés respiratorio agudo (SIRA) e incluso la muerte. En los pacientes sintomáticos, la enfermedad se caracteriza por un marcado aumento de citoquinas, como la IL-6, y altos niveles de parámetros inflamatorios, incluida la proteína C reactiva.

Dado que el síntoma clínico más común del COVID-19 sigue siendo la fiebre, la implicación de las citocinas proinflamatorias es evidente, se observó un aumento de los niveles séricos de IL-6 en más del 50 % de los pacientes¹. Los estudios revelaron además que, a medida que progresa la gravedad de la enfermedad, también aumentan los niveles séricos de citocinas proinflamatorias.

Los pacientes con las presentaciones clínicas más graves son de edad avanzada y presentan comorbilidades, la linfopenia se ha descrito como un hallazgo característico en el brote de SRAS asociado a coronavirus de 2003 y es también la anomalía hematológica más frecuente en los pacientes con COVID-19.²

La tormenta de citocinas es un fenómeno de reacción inflamatoria excesiva en la que se producen rápidamente citocinas en gran cantidad en respuesta a una infección microbiana, se considera que este fenómeno contribuye de forma importante al síndrome de distrés respiratorio agudo (SIRA), también se ha implicado en el contexto de infecciones víricas respiratorias, como el SARS en 2002, la infección por el virus de la gripe aviar H5N1 en 2005 y la infección por el virus H7N9 en 2013, se ha encontrado que la secreción de citoquinas incluyendo TNF- α , IL-6, y IL-10 se incrementó en pacientes COVID-19, y distintivamente, la frecuencia de células T CD4⁺ y CD8⁺ están correlacionados negativamente con los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-10, lo que sugiere que estas citocinas pueden estar implicadas en la disminución de células T detectada en COVID-19.³

La respuesta de las células T CD4⁺ al SARS-CoV-2 es mayor que la de las células T CD8⁺, y se han asociado con el control de la infección primaria por SARS-CoV-2, las células T CD4⁺ específicas de SARS-CoV-2 pueden detectarse desde los días 2-4 posteriores al inicio de los síntomas, la activación rápida de células T CD4⁺ específicas del SARS-CoV-2 en la COVID-19 aguda se asoció con una enfermedad leve y una eliminación viral acelerada. Por el contrario, la activación tardía de células T CD4⁺ específicas de SARS-CoV-2 se asoció con COVID-19 grave o mortal.

En las células T de sangre periférica aisladas de pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI), la expresión de PD-1 fue significativamente mayor en comparación con las células T aisladas de pacientes con enfermedad leve o de donantes sanos, en conjunto, estos hallazgos ponen de relieve la fuerte capacidad inmunosupresora del SARS-CoV-2 de las respuestas inmunitarias adaptativas, de igual forma se ha informado de que el recuento de células T

CD8⁺ disminuía durante la infección por COVID-19 y, en casos graves, el recuento de células T CD4⁺ de memoria y de células T reguladoras se redujo significativamente².

Los niveles elevados tanto de PD-1 como de PD-L1 se asociaron con una marcada disminución de la respuesta inmunitaria en pacientes que se recuperaron de COVID-19 y pacientes con COVID-19 en comparación con controles sanos.

La proteína PD-1 de la muerte celular programada (PD-1; CD279) de 55 kDa, es expresado en la superficie de las células T estimuladas por antígenos, se descubrió en 1992, desde su descubrimiento, varios estudios han confirmado el papel de PD-1 en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria⁵ que se ha descrito actúa como punto de control, es una proteína de co-estimulación negativa, que por lo tanto da una señal inhibitoria, es un importante regulador negativo de la activación de las células T y en condiciones normales ayuda al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y homeostasis inmunitaria.¹³

Tras la unión de PD-1 a sus ligandos solubles PD-L1 y PD-L2 favorece la regulación a la baja de la respuesta inmunitaria excesiva, y así mantiene la auto tolerancia suprimiendo la actividad inflamatoria de las células T, este mecanismo protege al organismo contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

El receptor inhibitor de la muerte programada 1 (PD-1) junto con su ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es un biomarcador clave del agotamiento linfocitario, donde el aumento de la expresión de PD-1 bloquea vías de señalización, causando la inhibición de la proliferación y diferenciación linfocitaria, además, unos niveles elevados de PD-1/PD-L1 pueden suprimir la glucólisis y dirigir estas células hacia el uso de la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos para el metabolismo, ralentizándolo y contribuyendo potencialmente a la apoptosis. En los últimos años, se ha reportado un aumento de la expresión de PD-1 en pacientes con síntomas graves y críticos, además, se ha observado una regulación al alza de PD-1 en las células T durante la progresión de las fases sintomáticas de COVID-19, lo que contribuye a la evolución de la forma grave de la enfermedad.

El eje PD-1/PD-L1 desempeña un papel en la patogénesis de diversas enfermedades infecciosas, como el sida y la hepatitis B, aunque en el estado agudo, la interacción entre las moléculas de punto de control PD-1 y su ligando PD-L1 ayuda a reducir la inflamación asociada a la infección y el daño tisular mediado por la inflamación, la estimulación crónica conduce al agotamiento inmunitario, la reducción de las funciones efectoras de las células

inmunitarias y la progresión de la enfermedad, como se informó en el caso de la reciente COVID-19 causada por el SARS-CoV-2., por lo tanto, el bloqueo terapéutico de este eje puede ayudar a reducir la inflamación asociada a la infección.

Otras moléculas asociadas al agotamiento celular

PD-L2: es una molécula (ligando) que se expresa en monocitos y células dendríticas, este ligando se expresa sobre todo en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y otras), los anticuerpos que se unen al receptor PD-2 inhiben la interacción agonista entre PD-1 y su ligando (PDL-2) de las células T, que se conocen como “checkpoints” inmunitarios

TIM-3: es un regulador negativo de la respuesta inmunitaria y, junto con PD-1 y la proteína del gen 3 de activación linfocitaria (LAG-3), se expresa en gran medida en células LTCD8+ y L TCD4+ disfuncionales o agotadas, una de las tareas clave de TIM-3 son la inhibición de las respuestas Th1 y la expresión de citocinas como INF y TNF, el papel de TIM-3 en el agotamiento de las células T se identificó por primera vez en pacientes con infección por VIH, como receptor de punto de control, TIM-3 controla la respuesta de las células T frente a diferentes infecciones víricas crónicas como el VHB, el VHC, se ha demostrado que el SARS-CoV-2 activa una elevada actividad citotóxica de los linfocitos T en la fase inicial de la infección, que continúa en su agotamiento, probablemente el agotamiento excesivo de linfocitos LTCD8+ y LTCD4+ en pacientes críticos atenúa la respuesta celular al SARS- CoV-2, además la disregulación de TIM-3 se ha asociado a enfermedades autoinmunes.

LAG-3: regula negativamente la proliferación celular, la activación y la homeostasis de las células T, se observó un aumento de la expresión de LAG-3 y TIM-3 en las células T CD4+ y CD8+ en todos los grupos de gravedad de los pacientes con COVID-19, dependiendo el nivel de su expresión de la gravedad de la enfermedad; se describió una mayor expresión en los casos graves que en los casos con formas más leves.¹⁴

CTLA-4: se expresan a partir de la activación de los linfocitos, frena la actividad de los linfocitos T, actúa como punto de control en los linfocitos, atenúa la activación temprana de células vírgenes y de memoria.

Con respecto a la molécula KLRG-1+ que se expresa en células T, principalmente en LTCD8+, es una molécula de senescencia, además de su papel como marcador de

diferenciación celular, lo que se pudo encontrar en diferentes literaturas es que la mayoría de estos marcadores están aumentados en la expresión más grave de COVID19.

Fisiopatología del SIRA

El endotelio pulmonar sano inhibe en gran medida la inflamación y la coagulación, mientras que el endotelio activado hace lo contrario, estímulos tan variados como la hipoxia, las citocinas, las quimiocinas, la trombina, los leucocitos cebados, el lipopolisacárido y los patrones moleculares asociados a daños (DAMP) pueden desplazar el endotelio hacia un estado disregulado y permeable que atrae a las células inflamatorias. La ruptura de las uniones entre células endoteliales adyacentes y los cambios en el citoesqueleto hacen que las células se separen unas de otras y permiten la formación de brechas endoteliales, la apoptosis también contribuye a una barrera vascular disfuncional. En el SIRA, tanto la función de barrera epitelial como la eliminación de líquidos están debilitadas o inactivas, por lo tanto, cuando la barrera vascular del endotelio pulmonar se vuelve muy permeable a las proteínas y los solutos, el gradiente osmótico proteico se pierde, existe extravasación hacia el intersticio; la lesión epitelial puede ser provocada directamente por patógenos microbianos, lesión ácida (p. ej., aspiración del contenido gástrico), hiperoxia o estiramiento mecánico (p. ej., por la ventilación mecánica). Algunas de estas lesiones causan apoptosis o necrosis epitelial, mientras que otras alteran las uniones intercelulares, lo que aumenta la permeabilidad epitelial¹⁰.

Los neutrófilos de las personas con SIRA están activados y son funcionalmente distintos: tienen mayor quimiotaxis, mayor actividad metabólica, apoptosis retardada y una nueva firma transcripcional, los neutrófilos activados y las plaquetas interactúan en el pulmón lesionado para formar trampas extracelulares de neutrófilos, complejos de fibras de cromatina filamentosa y proteínas derivadas de neutrófilos, que podrían ayudar a secuestrar patógenos, pero también confieren lesión pulmonar. Los macrófagos alveolares ejercen respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, además de la inmunidad innata desregulada, la inmunidad adaptativa también parece desempeñar un papel importante en la defensa del huésped y en la resolución de lesiones, se ha demostrado que las células T reguladoras y cooperadoras desempeñan un papel crucial en la resolución de la lesión pulmonar.

Las fases del SIRA pasan de manera conjunta y global, sin embargo, se separan de acuerdo a sus características en:

Fase exudativa: primeros 7 días, en la cual se presenta edema, y hay formación de membranas hialinas que están compuestas por proteínas y fibrina, además hay congestión capilar, pulmonar más edema intersticial, todo esto ocurre por permeabilidad capilar, el daño se produce en el endotelio capilar y epitelio respiratorio.

Fase proliferativa: esta se empieza desarrollar desde la fase exudativa, tiene su pico después de los 7 primeros días de acción, (inflamación intersticial). En esta fase el objetivo es restaurar la homeostasis del tejido, se caracteriza por una proliferación masiva de fibroblastos que forman una matriz, su función es estabilizar y proveer los medios para que haya una proliferación de células endoteliales tipo 2 para que estas se diferencias en tipo 1.

Fase fibrótica: no se da en todos los pacientes, se presenta después de los 21 días, dura varias semanas, se asocia con ventilación mecánica prolongada. Hay daño de la membrana basal, no hay una adecuada reepitelizacion, hay depósito de matriz extracelular, que se extiende hacia el alveolo.

En resumen, en la infección por SARS-CoV2 que en ciertos pacientes puede desarrollar SIRA, el papel que tienen las moléculas asociadas al agotamiento celular es aún poco reportado.

Planteamiento del problema

Las enfermedad por COVID-19 presenta un grupo heterogéneo de manifestaciones clínicas requiriendo algunos pacientes ventilación mecánica invasiva por SDRA y otros no. Se ha reportado la expresión de moléculas como PD1 en estos grupos de pacientes, pero falta determinar su relación con hallazgos clínicos, de laboratorio y tomográficos de acuerdo a la gravedad, así como la expresión de otras moléculas asociadas al agotamiento celular como KLRG-1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4.

Justificación

El Instituto Nacional de enfermedades respiratoria es un centro de referencia de tercer nivel que durante la pandemia en 2020, atendió a pacientes con cuadros graves-críticos del COVID-19 que ameritaban apoyo con ventilación mecánica invasiva por SDRA, por lo que al contar con laboratorio de inmunología integrativa, se propuso la realización de este proyecto, para determinar la expresión de PD-1, KLRG-1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4 en linfocitos TCD4+ y su relación con la gravedad de la enfermedad.

Pregunta de investigación

¿Como se encuentra la concentración de PD-1 en linfocitos TCD4, al momento agudo de la enfermedad por COVID-19 dependiendo de la gravedad del paciente?

Hipótesis

PD1 se encuentra incrementado en linfocitos TCD4 en el momento agudo del COVID 19 en pacientes que requirieron apoyo mecánico ventilatorio por SIRA.

Objetivo general

Evaluar la expresión de PD1 en linfocitos TCD 4 en pacientes con COVID-19 con y sin apoyo mecánico ventilatorio en el momento agudo de la enfermedad.

Objetivos específicos

Evaluar la expresión de los ligandos de PD1 en linfocitos T.

Evaluar la expresión de otras moléculas (KLRG-1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4) asociadas al agotamiento celular.

Material y métodos

A) Lugar de estudio:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
Laboratorio de inmunología integrativa y LITEEF.

B) Población de estudio:

Pacientes con diagnóstico de COVID 19 mediante prueba de PCR, y que estuvieron hospitalizados por SDRA, durante el periodo de Mayo del 2020 a Enero del 2021 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

C) Diseño del estudio

Investigación traslacional, descriptivo y transversal.

D) Tamaño de muestra:

A conveniencia, se analizaron todos los expedientes que cumplieron los criterios de inclusión durante el periodo del estudio.

E) Procedimientos del estudio:

Se realizó la revisión de expedientes clínicos de pacientes con COVID-19 que cumplieran los siguientes criterios:

F) Criterios de inclusión:

Pacientes mayores de 18 años con enfermedad por COVID 19 diagnosticada por medio de PCR tomada al momento de ingreso a urgencias.

Paciente que cuenten con expediente clínico y laboratorios en el Instituto nacional de enfermedades respiratorias

Paciente que cuente con muestra de sangre en el biobanco de COVID-19 en la unidad de investigación.

Criterios de Exclusión:

Pacientes que no cuenten con PCR positiva para COVID 19.

Paciente que no cuenten con expediente clínico en el Instituto nacional de enfermedades respiratorias

Que no contaran con muestra de sangre en el biobanco de investigación.

G) Grupos de estudio

Se estudiaron un total de 40 pacientes, se dividieron en tres grupos, un grupo de pacientes intubados con SDRA, otro de pacientes no intubados, estos dos grupos con enfermedad de COVID-19, y un tercer grupo de sujetos control (pertenecientes a la cohorte de envejecimiento de LITEEF).

El primer grupo de pacientes intubados (n=20), con enfermedad de COVID-19 que requirió apoyo ventilatorio, por tener PAFI (**PaO₂/Fio₂**) . Ya que este es uno de los índices de oxigenación más empleados y hace referencia a la relación entre la presión arterial de oxígeno y la fracción inspirada de oxígeno, cuanto menor es el PAFI, hay un peor intercambio gaseoso y en el caso de los pacientes se corroboró SDRA.

El segundo grupo de pacientes no intubados (n=10), con enfermedad de COVID-19, que no requirieron de ventilación mecánica invasiva, pero si requirieron algún apoyo de oxígeno suplementario por medio de diferentes dispositivos (puntas nasales, mascarilla).

Además, en los grupos de pacientes, se evaluaron síntomas como mialgias, artralgias, ageusia, rinorrea, anosmia, cefalea, estos síntomas se obtuvieron de la historia clínica, al interrogatorio que se realizó en triage en el servicio de urgencias al momento del ingreso del paciente.

G) Variables

Género: cualitativa nominal

Edad: cuantitativa discreta

Diagnóstico laboratorio COVID : cualitativa nominal

Grado de PAFI : cuantitativa discreta

Diagnóstico clínico: cualitativa nominal

Hipertensión, Diabetes, Tabaquismo: cualitativas dicotómicas

Artralgias, Mialgias, Artralgias, Anosmia, Cefalea, Ageusia: cualitativa dicotómicas.

Leucocitos, Linfocitos, Plaquetas, : cuantitativa discretas

Fibrinógeno, DHL PCR, DD, VSG: cuantitativa continua
pO₂, cuantitativa continua.

Las muestras de sangre y la evaluación de las poblaciones celulares por medio de citometría de flujo, se realizaron en el laboratorio de inmunología integrativa.

El proceso fue el siguiente.

Estas muestras de sangre se incorporaron al bio banco de COVID-19 de la unidad de investigación. Se dividían en dos partes:

1.-) Se centrifuga la sangre y se obtiene plasma, que se congela. Y la otra fracción que se obtiene son células, a estas células se les realiza una técnica llamada (Gradiente de Ficoll), es el método más común para separar (células mononucleares de sangre).

No se toman en cuenta células como los neutrófilos ya que son células que cuentan con un periodo de vida muy corto y al contar con demasiados gránulos, puede ser dañino para las demás poblaciones de células.

Células mononucleadas (CMN) : como linfocitos B, T, Monocitos, NK

Al quedar estas células en el tubo, se lavan y se colocan en otro tubo, con una solución específica que consta de 90% suero fetal bovino y 10% DMCO (dimetilsulfóxido), líquido orgánico incoloro, y posteriormente se congelan en nitrógeno líquido y se mantiene ahí hasta el momento que se ocuparan las células.

Proceso de descongelamiento:

Etapas 1: Se llama de almacenamiento, almacenan las muestras congeladas en el laboratorio.

Etapas 2: Se llama etapa de adquisición, estas células se colocan en un vial donde un tubo grande RPMI (medio de cultivo) se colocan a 37 grados (temperatura ambiente), para el descongelamiento.

Posteriormente esas células se centrifugan y se revisan cuantas células quedan viables. Una vez teniendo en cuenta cuantas células quedan viables, se preparan para la citometría de flujo. Antes de pasar por el citómetro de flujo, se marcan las células con los anticuerpos.

Etapas 3: Se llama de análisis: se realiza con el softwer. FlowJo y el citómetro Symphony. Citómetro analizador FACS SYMPHONY A5 SORP. (Figura 1)

El citómetro de flujo se encuentra en el CIENI. Mide aproximadamente 30 colores es decir anticuerpos.

Figura 1



Software FlowJo: El software FlowJo™, es la plataforma líder para el análisis de citometría de flujo de una sola célula que lo ayuda a interpretar sus datos de manera rápida y efectiva con funciones accesibles para inmunofenotipado, análisis del ciclo celular, proliferación, estudios cinéticos, comparación cuantitativa de poblaciones, análisis de alta dimensión y más.

Citometría de flujo: La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.

En el momento de realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijadas pero, siempre en **suspensión celular** y en forma de **célula única**. Al obligarlas a pasar alineadas una a una frente a un haz láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez que dispersa la luz, si esa célula tiene alguna sonda fluorescente o fluorocromo, emitirá fluorescencia al ser excitada por el láser. Los parámetros que se miden de forma simultánea por cada célula son:

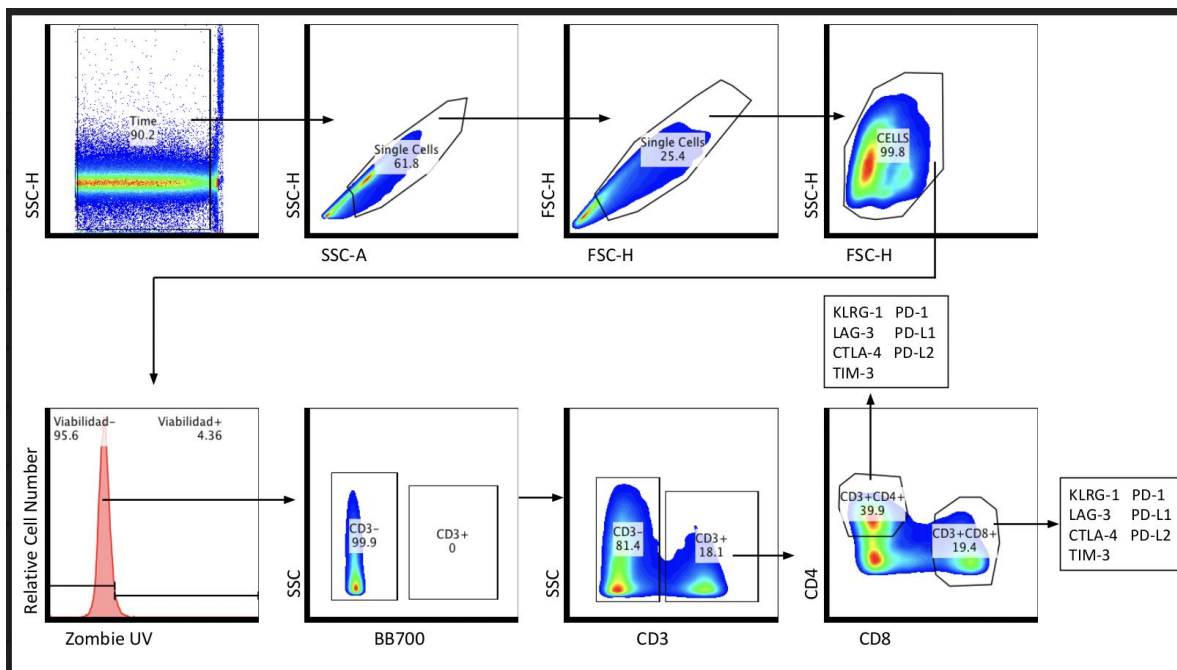
1. Dispersión frontal de la luz, valor proporcional al tamaño celular .
2. Dispersión de la luz ortogonal, proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula.
3. Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

El ordenador permite almacenar datos de **miles de células por cada muestra** y **representar los resultados gráficamente**. Además de la representación gráfica, el software aporta varios datos estadísticos de las muestras analizadas entre ellos: media, mediana y coeficiente de variación.

Una de las aplicaciones, en inmunología, es la determinación de subpoblaciones linfocitarias, inmunofenotipificación de leucemias y linfomas. Aplicadas en la inmunología se separa por células y se cuantifica el porcentaje de cada una de ellas.

En la imagen a continuación presentada (Figura2) se puede ver la estrategia de análisis poblacional, donde se dividieron las células en linfocitos TCD4+ y TCD8+, al final quedando para la evaluación del estudio la subpoblación de linfocitos TCD4+ y sus respectivos marcadores a estudiar.

Figura 2



Captura de información y análisis estadístico

La información se almacenó en una base de datos de Excel manteniendo la confidencialidad de los datos (uso solo de ID número de expediente) estratificando en función de la definición de las variables.

- Variables cuantitativas se evaluaron con promedio y desviación estándar
- Variables cualitativas con frecuencia y porcentaje
- La comparación entre los 3 grupos con ANOVA (no paramétrica Kruskal – Wallis)
- La comparación entre 2 grupos con estadística no paramétrica U-Mann Whitney y cualitativas con exacta de Fisher.

D) Consideraciones éticas

El protocolo se presentó al comité de ética e investigación del INER y fue aceptado con el código: B04-22. Solicitando dispensa de consentimiento ya que se mantiene en anonimato los datos personales y se presentan los resultados en grupo, así como se contaba con consentimiento para la toma de muestras previamente.

Resultados

Se evaluaron un total de 30 pacientes con diagnóstico de COVID 19 y 10 controles. Los tres grupos estudiados fueron similares en edad, respecto al sexo los pacientes no intubados fueron masculinos (90%), el IMC en el grupo pacientes intubados fue superior con respecto a los no intubados ($p < 0.003$), así mismo comorbilidades como, diabetes, hipertensión, tabaquismo fue mayor en este grupo, mientras que la frecuencia de síntomas fue mayor en el grupo de intubados (**Tabla 1**).

Tabla 1 Características clínicas de los pacientes.

Variables	No intubados n = 10	Intubados n = 20	Controles n= 10	p=
Edad (DE+/-)	53(21)	57(12)	65(5)	0.63
Sexo (%)	9(90)	9(45)	3(30)	0.2
Masculino				
IMC DE +/-)	28(2)	35(4)	26(3)	<0.0003
Tabaquismo (%)	3(30)	13(65)	3(30)	0.1
Hipertension(%)	3(30)	16(80)	4(40)	0.04
Diabetes (%)	4(40)	15(75)	2(20)	0.1
Tos(%)	4(40)	14(70)		0.1
Disnea(%)	5(50)	18(90)		0.02
Mialgias(%)	5(50)	13(65)		0.4
Artralgias(%)	4(40)	12(60)		0.4
Dolor de cabeza(%)	4(40)	13(65)		0.2
Rinorrea(%)	2(20)	10(50)		0.2
Diarrea(%)	3(30)	10(50)		0.4
Anosmia(%)	1(10)	11(55)		0.02
Ageusia(%)	2(20)	14(70)		0.018
PAFI (+/-DE)	213(37)	130(28)		<0.0001
IMC: indice de masa corporal, PAFI: presión arterial de oxígeno/fracción inspirada de oxígeno, DE: desviación estándar.				

Las pruebas de laboratorio fueron tomadas al momento del ingreso al servicio de urgencias (basales), los leucocitos, DHL, DD, fibrinógeno, PCR fueron mayor en el grupo de intubados en comparación con el grupo de no intubados, siendo significativo la DHL con una ($p < 0.006$), fibrinógeno ($p < 0.007$) y PCR ($p < 0.003$) (**Tabla 2**).

Table 2 Datos de laboratorio de los pacientes.

VARIABLES	No Intubados n= 10	Intubados n= 20	Controles n= 10	p=
Leucocitosis (DE +/-)	10(3)	13(7)	6.13(5)	0.13
Linfocitosis (DE +/-)	0.99(0.4)	0.8(0.6)	0.96(0.8)	0.37
Plaquetas(DE +/-)	247(68)	237(88)	226(50)	0.72
DHL(DS +/-)	288(67)	559(222)	178(30)	<0.006
DD (DE +/-)	1(0.8)	5(8)		0.06
Procalcitonina(DE +/-)	0.4(0.3)	1 (1)		0.02
VSG (DE +/-)	22.1(8)	33 (16)	15(8)	0.05
Fibrinógeno (DE +/-)	565.3(150)	866 (169)		0.007
PCR(DE +/-)	14.0(4)	22.0(9)	0.18(0.12)	<0.0003

DHL: Deshidrogenasa lactica, DD: Dimero D, VSG: Velocidad de sedimentacion globular, PCR: Reaccion de cadena de polimerasa, DE: Desviacion estandar.

En la **Figura 3** se puede observar el porcentaje de linfocitos (CD4+, CD8+,CD20+) en los tres grupos, los linfocitos T-CD4+ y CD20+ se presentan con mayor frecuencia (77% y 28%) respectivamente en el grupo de pacientes intubados.

De los linfocitos T-CD4+ en sus diferentes etapas (TEMRA, Naive,MC,ME), los T-CD4+ se encuentran incrementadas en las células Naive (células que aún no se ha unido a un antígeno) en el grupo de pacientes intubados en comparación con el grupo control (49% vs 5% $p < 0.0001$). En cuanto a las de memoria central (MC) se encuentran aumentadas en el grupo control, en comparación con el grupo de pacientes intubados, (41% vs 15% $p < 0.01$) y el mismo caso es para las células de memoria efectora (ME) 54% vs 25. %

El porcentaje de linfocitos TCD8+ en células Naive también se encuentra incrementado en el grupo de pacientes intubados en comparación con el grupo control, (43% vs 7% $p < 0.0001$), y las células TEMRA (son células de memoria terminales) se encuentran con mayor incremento en el grupo control comparándolas con el grupo de pacientes intubados ,(62% vs 29% $p < 0.0001$).

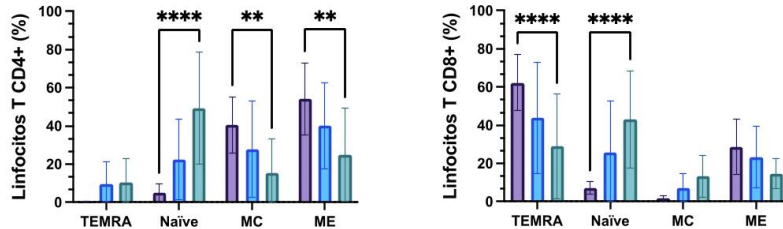
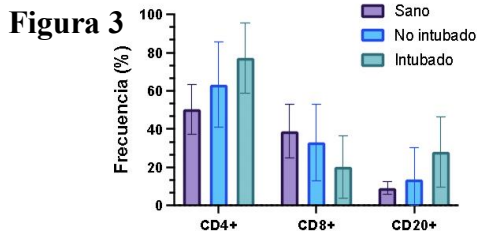


Figura3: Frecuencia, expresada en porcentaje de LTCD4+, LTCD8+, LTCD20+. Porcentaje de linfocitos TCD4+, TCD8+, en las etapas celulares. (TEMRA: células terminales, Naive: células vírgenes sin unirse a antígeno, MC : memoria central, ME: memoria efectora).

En la **Figura 4**, se observa el porcentaje de PD-1, en LTCD4+ y LTCD 8+, en donde hubo una diferencia entre el grupo de intubados en comparación con el grupo de no intubados en los LTCD8+ de 49% vs 31% $p < 0.05$. Para la expresión de PDL-1 la diferencia significativa en el porcentaje fue en el grupo de LTCD4+ comparando tanto el grupo de intubados y los no intubados con los controles, (50% vs 0.2% $p < 0.001$) y (85% vs 0.2% $p < 0.0001$), respectivamente. Y para los LTCD8+ solo se encontró una diferencia significativa en el porcentaje, comparando grupos de no intubados con el grupo control, (63% vs 0.2% $p < 0.0001$).

Figura 4

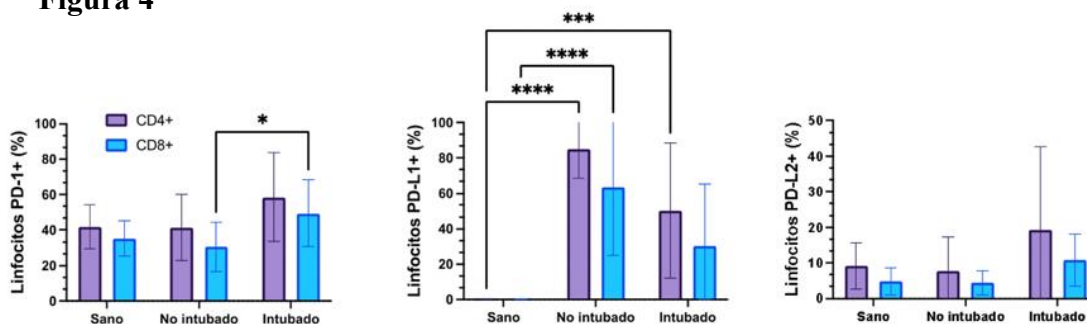


Figura4: Frecuencia, expresada en porcentaje de PD-1+ , PDL-1 ,PDL-2, en los tres grupos de pacientes (sanos, no intubado, intubado) donde se encontro diferencia significativa en PDL-1, comparando el gurpo de intubados y no intubados con los controles.

En la **Figura 5**, se observa el porcentaje de expresión de las diferentes moléculas asociadas al agotamiento celular, en KLRG-1+ hubo una diferencia entre el grupo control en comparación con el grupo de no intubados en los LTC8+ de 48% vs 29%) $p < 0.05$, el resto de moléculas no mostraron diferencia entre los grupos.

Figura 5

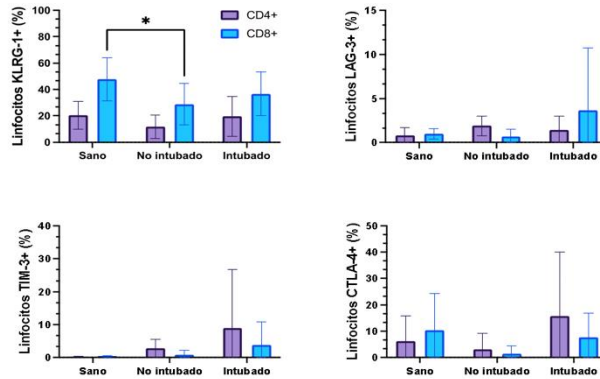


Figura5: Frecuencia, expresada en porcentaje de KLRG-1+, LAF-3+,TIM-3+, CTLA-4+, en los tres grupos respectivamente. solo se observa incremento de KLRG-1 con el grupo de no intubados con el grupo control.

Discusión.

Los linfocitos T desempeñan un papel fundamental en la eliminación de virus, por ejemplo los linfocitos T CD8⁺ son capaces de secretar una serie de moléculas como perforinas e interferones para erradicar los virus del huésped, al mismo tiempo, los linfocitos T CD4⁺ pueden ayudar a los linfocitos T CD8⁺ a aumentar su capacidad para eliminar patógenos, sin embargo, la estimulación persistente por parte del virus puede inducir el agotamiento de las células T, lo que conlleva a la pérdida de producción de citocinas y la reducción de su función es decir a la pérdida de la tolerancia inmunológica.

En un estudio que se realizó en pacientes con COVID-19, en un total de 42 pacientes, se confirmó linfopenia significativa y una reducción de las células T CD4⁺ y CD8⁺ en el momento del ingreso hospitalario, tanto en pacientes jóvenes como de edad avanzada, la reducción de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se ha descrito como un factor pronóstico desfavorable, independientemente de la edad; en nuestro estudio en los pacientes no intubados, se observó un incremento de las células T CD4⁺ en comparación con los controles y una disminución de CD8⁺, sin embargo, en el grupo que requirió intubación el incremento de los CD4⁺ y la disminución de CD8⁺ fue mas marcada.¹²

De este incremento que observamos en los LT CD4⁺ de los pacientes intubados, las subpoblaciones que muestran el incremento son las Naive, es decir que no han estado expuestos a antígeno, mientras que las de memoria central y efectora muestran una disminución en su frecuencia al compararse con los sujetos control, esta conducta se repite en los LT CD8⁺ en la subpoblación Naive , mientras que en este grupo la subpoblación TEMRA que se encuentran en su última etapa presenta una disminución significativa.

Además, observamos un aumento de la expresión de PD-1 en LT CD8⁺ circulantes de los pacientes intubados en comparación con los no intubados, como se había descrito previamente se sabe que esta molécula se regula a la alza durante la activación de las células T y puede indicar una propensión a la apoptosis o al agotamiento de las células T y por consiguiente no montar una respuesta inmune adecuada frente al virus.

Además, nuestros resultados mostraron que PD-L1 solo mostró diferencias al compararse con los sujetos sanos, mientras que PDL-2 no mostró ninguna diferencia entre los grupos. De igual manera al evaluar la expresión de KLRG-1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4 solamente encontramos diferencia en LT CD8⁺ entre el grupo no intubado y sanos, sin embargo, aunque

no hubo diferencia en el grupo intubado se encuentra mayor que en el no intubado, por lo que al estar aumentada KLRG-1 inhibe a los LT CD8+, lo que podría aumentar la proliferación vírica o disminuir los efectos antivirales de la inmunidad.

Varios autores han confirmado que determinadas moléculas inhibidoras de los puntos de control inmunitarios están significativamente reguladas al alza en pacientes con una evolución grave de la enfermedad, en nuestro caso, aunque se muestra un incremento al comparar intubados contra no intubados, no alcanzamos a determinar una diferencia significativa, probablemente por el tamaño de la muestra.

Se necesitan más estudios para evaluar el impacto clínico de nuestros hallazgos y comprender mejor el papel funcional y pronóstico de estas moléculas de agotamiento celular en COVID-19.

Aunque la mayoría de las opciones terapéuticas actuales para tratar a los pacientes con COVID-19 están dirigidas a contener la replicación del SARS-CoV-2, o a controlar la inflamación, un tratamiento satisfactorio puede requerir un sistema inmunitario que funcione correctamente con una función de células T competentes.

Conclusiones

Identificamos que los pacientes con mayor expresión de PD1 tiene mayor riesgo de presentar una forma de la enfermedad severa a nivel pulmonar, que requirió apoyo ventilatorio al momento del diagnóstico de COVID-19.

Referencias:

- 1.- J. Hernández-Rodríguez, S. Prieto-González, R. Ríos-Garcés, G. Lledó, O. Araujo, G. Espígol-Frigolé, G. Espinosa, Respuesta inmunoinflamatoria en la COVID-19. Sexta edición, publicado España Barcelona. Editorial: Panamericana. Año:2020.Numero de paginas: 17.
- 2.- Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, Yuen KY. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 28;9(1):221-236. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902. Erratum in: *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):540. PMID: 31987001; PMCID: PMC7067204.
- 3.- Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z, Wang J, Qin Y, Zhang X, Yan X, Zeng X, Zhang S. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. *Clin Immunol.* 2020 May;214:108393. doi: 10.1016/j.clim.2020.108393. Epub 2020 Mar 25. PMID: 3222466; PMCID: PMC7102614.
- 4.- Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020 Mar;38(1):1-9. doi: 10.12932/AP-200220-0772. PMID: 32105090.
- 5.- Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021 Feb 18;184(4):861-880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33497610; PMCID: PMC7803150.
- 6.- R Bonam S, Hu H, Bayry J. Role of the PD-1 and PD-L1 axis in COVID-19. *Future Microbiol.* 2022 Sep;17:985-988. doi: 10.2217/fmb-2022-0103. Epub 2022 Jul 28. PMID: 35899493; PMCID: PMC9332906.
- 7.- Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, Jordan TX, Oishi K, Panis M, Sachs D, Wang TT, Schwartz RE, Lim JK, Albrecht RA, tenOever BR. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026. Epub 2020 May 15. PMID: 32416070; PMCID: PMC7227586.
- 8.- Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, Rawlings SA, Sutherland A, Premkumar L, Jadi RS, Marrama D, de Silva AM, Frazier A, Carlin AF, Greenbaum JA, Peters B, Krammer F, Smith DM, Crotty S, Sette A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell.* 2020 Jun 25;181(7):1489-1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015. Epub 2020 May 20. PMID: 32473127; PMCID: PMC7237901.

9.- Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med.* 2019 Feb;40(1):31-39. doi: 10.1055/s-0039-1683996. Epub 2019 May 6. PMID: 31060086; PMCID: PMC7060969.

10.- Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021 Feb 18;184(4):861-880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33497610; PMCID: PMC7803150.

11.- Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, Chen L, Li M, Liu Y, Wang G, Yuan Z, Feng Z, Zhang Y, Wu Y, Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020 May 1;11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827. PMID: 32425950; PMCID: PMC7205903.

12.- Bellesi S, Metafuni E, Hohaus S, Maiolo E, Marchionni F, D'Innocenzo S, La Sorda M, Ferraironi M, Ramundo F, Fantoni M, Murri R, Cingolani A, Sica S, Gasbarrini A, Sanguinetti M, Chiusolo P, De Stefano V. Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients. *Br J Haematol.* 2020 Oct;191(2):207-211. doi: 10.1111/bjh.17034. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32679621; PMCID: PMC7405050.

13.- Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, Dong XQ, Zheng YT. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020 May;17(5):541-543. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32203186; PMCID: PMC7091621.

Abreviaturas.

PAFI: Presion arterial de oxigeno/ Fraccion Inspirada de Oxigeno.

IMC: Indice de Masa Corporal.

SIRA: Sindrome de Insuficiencia respiratoira Aguda.

PD-1: (Programed death-1, CD279)

PDL-1: El ligando 1 de muerte programada

PDL-2: El ligando 2 de muerte progrmada

CD4: Cumulo de diferenciacion 4

CD8: Cumulo de diferenciacion 8

DHL Deshidrogenasa lactica.

PCR: Reaccion en cadena de polimerasa

DD: Dimero D.

VSG: Velocidad de sedimentacion Globular.

CMN: Células mononucleadas.

KLRG-1: Receptor G1 similar a la lectina de las células asesinas

LAG-3: Gen de activación linfocitaria 3

TIM-3: Células T que contiene dominio de mucina-3

CTLA-4: Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos.

DMP: Patrones moleculares asociados a daños

SARS: Síndrome respiratorio agudo grave

DMCO: Dimetilsulfóxid

LT: Linfocitos T.