

PERFIL INMUNOLÓGICO EN INDIVIDUOS ADULTOS VENEZOLANOS CON INFECCIÓN AGUDA POR SARS-CoV-2

Estefania Guanique¹ , Luisa Freites¹ , Soriuska Mayora Hernandez¹ , Wendy Martínez Vazquez¹ ,
Inirida Belisario Gomez¹ , Francis Crespo Serrano¹ , Christian Medina García¹ ,
Juan Bautista De Sanctis^{1,2} , Alexis García Piñero¹ .

¹Instituto de Inmunología Dr. Nicolás Enrique Bianco Colmenares, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Caracas-Venezuela. ²Instituto de Medicina Molecular y Translacional, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Palacky, 779 00 Olomouc, República Checa.

Recibido para publicación 15 mayo 2024. Aceptado: 15 junio 2024

RESUMEN:

La COVID-19, es una enfermedad producida por el virus SARS-CoV-2, descubierta por primera vez en diciembre de 2019, en la ciudad de Wuhan, China. Durante la infección se produce una alteración en la respuesta del sistema inmune, lo que conduce a un estado de hiperinflamación que en algunos casos puede generar desenlace fatal para el individuo enfermo. Esta investigación tuvo como objetivos la evaluación del perfil inmunológico celular de pacientes venezolanos infectados con el virus SARS-CoV-2, determinando el porcentaje de expresión de los marcadores de Linfocitos T, Linfocitos T reguladores (Treg), Linfocitos T de memoria, Linfocitos B, Linfocitos B de memoria, células NK y NkT, mediante la técnica de citometría de flujo; así como la determinación de la relación de las citoquinas (IL) IL-6, IL-10 y TNF- α mediante la técnica de ELISA. Encontramos una disminución significativa en la expresión de los marcadores de Linfocitos T y Linfocitos T de memoria en individuos, se observó que las células NK y NkT, aumentan su expresión durante la infección. Adicionalmente se comprobó la existencia de una respuesta de tipo reguladora, especialmente en los individuos con la forma leve de la enfermedad al observarse una correlación positiva entre la expresión de los marcadores CD4+/CD25+/CD127+ de los Linfocitos T reguladores y la concentración sérica de IL-10 y de TNF- α y la IL-6. Nuestro estudio expone la respuesta dual del sistema inmune al enfrentar al SAR-CoV-2, inferimos que la severidad de la infección estar determinada por los elementos predominantes en balanza inflamación/regulación.

Palabras clave: COVID-19, subpoblaciones linfocitarias, citoquinas.

IMMUNOLOGICAL PROFILE IN ADULT VENEZUELAN INDIVIDUALS WITH ACUTE SARS-CoV-2 INFECTION.

ABSTRACT

COVID-19 is a disease caused by the SARS-CoV-2 virus, first discovered in December 2019, in the city of Wuhan, China. During infection, there is an alteration in the immune system response, which leads to a state of hyperinflammation that in some cases can generate fatal outcome for the sick individual. The objectives of this research were to evaluate the cellular immunological profile of Venezuelan patients infected with the SARS-CoV-2 virus, determining the percentage of expression of T lymphocyte markers, regulatory T lymphocytes (Treg), memory T lymphocytes, B lymphocytes, memory B lymphocytes, NK and NkT cells, using the flow cytometry technique; as well as the determination of the ratio of IL-6, IL-10 and TNF- α by ELISA. We found a significant decrease in the expression of T lymphocyte and memory T lymphocyte markers in individuals, it was observed that NK and NkT cells increase their expression during infection. Additionally, the existence of a regulatory response was demonstrated, especially in individuals with the mild form of the disease, when a positive correlation was observed between the expression of CD4+/CD25+/CD127+ markers of regulatory T lymphocytes and the serum concentration of IL-10 and TNF- α and IL-6. Our study exposes the dual response of the immune system when confronted with SAR-CoV-2, we infer that the severity of infection is determined by the predominant elements in the inflammatory/regulatory balance.

Keywords: COVID-19, lymphocyte subpopulations, cytokines,

Introducción

La Enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19), surgió a principios de diciembre de 2019 en China y se convirtió en una situación de pandemia a nivel

mundial por su rápida propagación a más de 200 países o territorios (1). En Venezuela se decreta el estado de emergencia por esta enfermedad el 13 de marzo del 2020, representando un desafío económico

Solicitar copia a: Alexis García, (alexisgarcia27@gmail.com)

y social para toda la población. La respuesta inmunitaria del hospedero ante el SARS-CoV-2 parece desempeñar un papel fundamental en la patogénesis y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El virus altera las respuestas inmunitarias normales, lo que conduce a un sistema inmunológico deteriorado y respuestas inflamatorias incontroladas en pacientes con las formas moderadas y severas de la enfermedad. Estas se caracterizan por presentar linfopenia, activación y disfunción de linfocitos, anomalías de granulocitos y monocitos, niveles elevados de citoquinas y aumento de inmunoglobulina G (IgG) y anticuerpos totales (2).

A raíz de este descubrimiento, las características inmunes ahora se reconocen como posibles biomarcadores para la progresión de la enfermedad (2). Se ha demostrado en diferentes estudios que los linfocitos T, y las concentraciones de citoquinas inflamatorias en la sangre periférica, son los principales biomarcadores relacionados con la gravedad de la enfermedad COVID-19 (3).

En base a estas diversas características inmunitarias que se evidencian en los pacientes con COVID-19, la cuantificación de los diversos subtipos de linfocitos, así como también la determinación de citoquinas nos permite obtener una huella del perfil inmunológico celular del paciente; en donde se podría realizar una predicción sobre si este progresara de una enfermedad leve a una severa, y de esa manera facilitar la provisión de cuidados de apoyo apropiados. De igual modo, la cuantificación de estos biomarcadores puede ser de gran importancia para evaluar la efectividad y eficiencia de los medicamentos, o terapias aplicadas. El objetivo de nuestra investigación consistió en evaluar el perfil de inmunidad celular contra el SARS-CoV-2, en la población mestiza venezolana.

Materiales y método

Se evaluaron 50 pacientes con infección por SARS CoV-2, confirmada por prueba PCR, prueba de antígeno o tomografía computarizada, que además manifestaron no padecer de enfermedades que afecten el sistema inmune y que no estuvieron bajo tratamientos con esteroides. Con un rango de edad de 18- 67 años, sin distinción de sexo o raza, de los cuales el 54% estuvo representado por individuos del sexo masculino y el 46% restante por el sexo femenino. Según la gravedad de la enfermedad, los pacientes se clasificaron en 3 grupos: leve (Aquellos pacientes sintomáticos sin

evidencia de neumonía viral o hipoxia); moderado (aquellos pacientes con signos clínicos de neumonía como tos, fiebre, disnea, taquipnea y $SpO_2 > 93\%$) y severo (pacientes con signos clínicos de neumonía y $SpO_2 < 93\%$). El mayor porcentaje de esta se encuentra representado por pacientes con una infección leve (62%), seguido con un porcentaje más bajo de pacientes con una infección moderada (32%), y en cuanto a los pacientes que cursaron con una infección severa (6%), es necesario señalar que fue un porcentaje muy mínimo de la población de estudio

Previo consentimiento informado de cada uno de los pacientes se realizó la extracción de dos muestras de sangre periférica una en un tubo sin aditivos para la obtención de suero y la otra en un tubo con EDTA. Como controles sanos se utilizaron los datos de poblaciones celulares obtenidos de 50 muestras evaluadas pre pandemia.

Se determinaron los porcentajes de expresión de los marcadores de subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica (CD3/CD4/CD8) Linfocitos T, (CD4+/CD25+/CD127+) Linfocitos T reguladores (Treg), (CD3/CD45RO+) Linfocitos T de memoria, (CD19+/CD20+) Linfocitos B, (CD19+CD27+) Linfocitos B de memoria, (CD3/CD16/CD56+) células Natural Killer, (CD3+/CD16+/CD56+) células Nkt. Mediante el marcaje de superficie con anticuerpos monoclonales de la casa comercial Biolegend y el análisis en el citómetro de flujo Epics XL de la casa comercial Beckman Coulter. Adicionalmente, se midieron las concentraciones séricas de TNF- α IL-6 e IL-10 mediante los kits ELISA MAXTM Deluxe Set Human TNF- α , ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-6 y ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-10 de la casa comercial BioLegend, Inc. Switzerland fr-CH.

Es importante mencionar, que este estudio ha sido realizado en la población mestiza venezolana, con un programa de vacunación de hasta cuarta dosis y por lo menos la existencia de cuatro variantes del virus. Además, la mayoría de los estudios relacionados a este tema antes publicados, se realizaron entre 2020 y 2021, con el virus nativo y en plena creación y producción de las vacunas.

Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se utilizaron métodos basados en estadística descriptiva utilizando el software Graphpad Prisma versión 9. Se realizó la prueba de ANOVA de una vía y se estableció el valor de corrección pos test de Bonferroni de $p < 0,05$.

Resultados

Los pacientes con COVID-19 presentaron una disminución significativa de los porcentajes de Linfocitos T totales CD3+ ($p < 0,0001$), de Linfocitos T cooperadores CD4+ ($p < 0,0001$) y Linfocitos T citotóxicos CD8+ ($p 0,0237$) en comparación con individuos sanos (figura 1).

Por otra parte, se encontró una disminución marcada de los Linfocitos T de memoria CD45RO+ ($p < 0,0001$) en los pacientes con la COVID-19 con respecto a los controles sanos, estas células median las respuestas rápidas y potenciadas a segundas y posteriores exposiciones a los antígenos, lo cual puede ser indicativo de que la memoria inmunológica se ve afectada durante la infección por SARS-CoV-2. También se evidenció

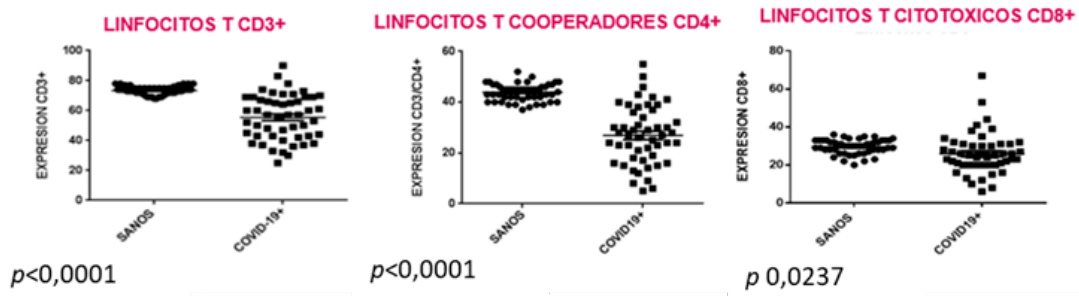


Figura 1. Expresión de los marcadores de las subpoblaciones de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con COVID-19 y controles sanos.

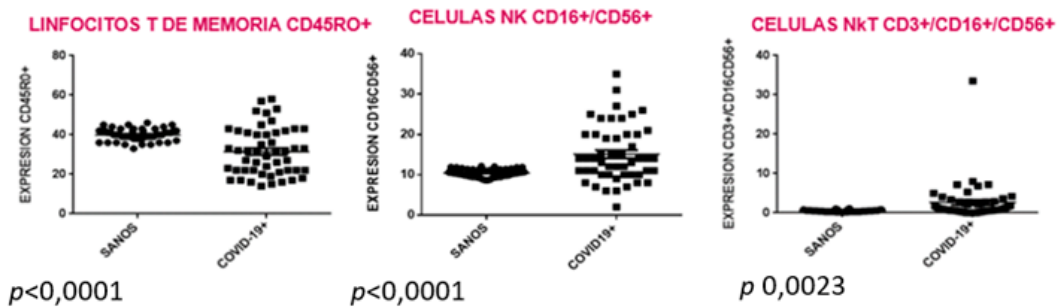


Figura 2. Expresión de los marcadores de linfocitos T de memoria, Células NK (CD16/CD56+) y células NKt (CD3+/CD16+/CD56+) en pacientes con COVID-19 y controles sanos.

un incremento en las células asesinas naturales y las células NkT ($p 0,0023$), de los pacientes con respecto a los controles sanos (figura 2). No se observaron cambios estadísticamente significativos del porcentaje de linfocitos B CD19+/CD20+. (figura 3).

Relación de los niveles de expresión de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y gravedad de la COVID-19.

Los pacientes con enfermedad moderada y severa evaluados, presentaron una disminución significativa de Linfocitos T cooperadores CD4+ ($p < 0,001$) a diferencia de los pacientes leves. (figura 4).

Se observó disminución de Células Natural Killer en los pacientes con enfermedad severa son respecto

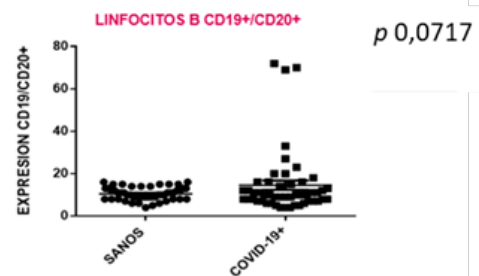


Figura 3. Expresión de los marcadores de las subpoblaciones de linfocitos B de sangre periférica en pacientes con COVID-19 y controles sanos.

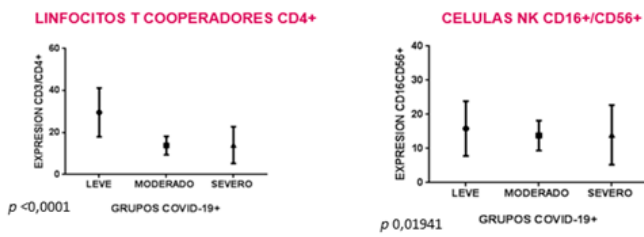


Figura 4. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y células Nk (CD16-CD56+) de sangre periférica.

a los pacientes con enfermedad leve, lo cual podría guardar relación con el hecho de que las células Nk son los linfocitos efectores del sistema inmune innato, cuya afectación o disminución puede conllevar a una proliferación viral y mayor afectación de la repuesta inmune, lo cual podría interpretarse como un posible mecanismo de evasión viral.

Este estudio reveló que no hubo una diferencia significativa en el porcentaje de linfocitos T reguladores, Linfocitos B, Linfocitos B de memoria y células NkT.

Evaluación de citoquinas. IL-6, IL-10 y TNF-α, en el suero de individuos venezolanos con la COVID-19.

Estudiamos la correlación existente entre la expresión de IL-6 e IL-10, durante la infección por el SARS-CoV-2, cuyos resultados arrojaron que no existe una correlación lineal entre ambos parámetros ($r: 0,0098$), lo que significa que durante la enfermedad COVID-19, ambas variables no presentan proporcionalidad de aumento o disminución de una en relación con la otra. (figura 5).

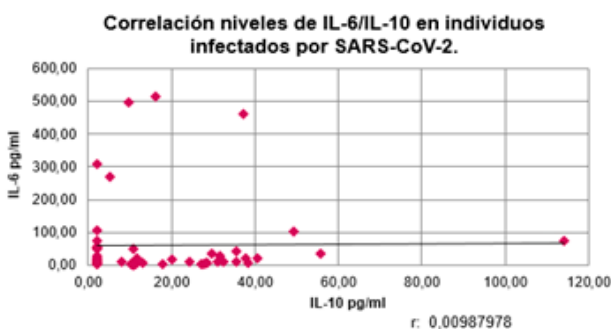


Figura 5. Evaluación de la correlación de las concentraciones séricas de IL-6 e IL-10 en individuos venezolanos con la COVID-19.

Examinando los resultados decidimos estudiar la relación que existe entre los marcadores CD4+ CD25+ de los Linfocitos Treg y la IL-10, encontrándose que existe una correlación positiva entre ambos parámetros estudiados ($r: 0,41$) (figura 6).

Además del estudio de las IL6/ IL10, durante la investigación notamos la importancia de otras citoquinas como lo es el TNF-α durante la infección por SARS CoV-2, lo que nos llevó a correlacionar la producción de esta con la IL-6, cuyos resultados arrojaron que existe una correlación positiva entre ambas citoquinas ($r = 0,63$) (figura 7).

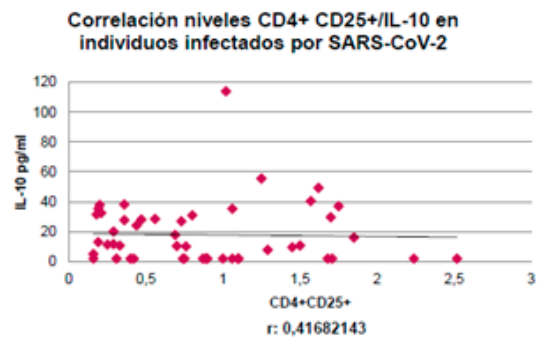


Figura 6. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y células Nk (CD16-CD56+) de sangre periférica.

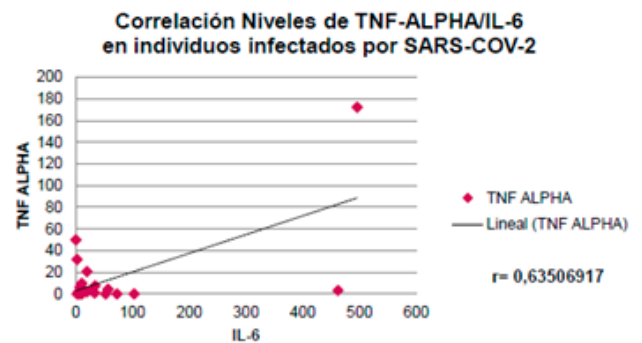


Figura 7. Concentraciones séricas de IL-16 y TNF-α en individuos venezolanos con la COVID-19.

Discusión

Las subpoblaciones de linfocitos son factores importantes para preservar la función inmunológica y su nivel de expresión tiende a fluctuar de manera fisiológica cuando el individuo está expuesto a retos

infecciosos en pro de eliminar la posible amenaza. El SARS-CoV-2 es un virus que afecta el sistema inmune del huésped, y esto puede verse expresado en los resultados obtenidos del estudio de cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas. Encontramos una disminución significativa de los marcadores de expresión de diferentes subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica de los pacientes estudiados con respecto a los individuos controles (linfocitos T colaboradores y citotóxicos, linfocitos T de memoria) de manera similar a Wang y col, Mayora y col; quienes realizaron estudios donde se midieron los subconjuntos de linfocitos (4,5). En contraste a los mismos autores, nosotros encontramos un aumento de las células Nk y NkT Sin embargo, esto puede deberse a que a diferencia de nuestra investigación ellos contaban con una mayor proporción de pacientes con enfermedad severa dentro de su estudio. En cambio, Balzanelli y col exponen que las células NK fueron normales o elevadas El SARS-CoV-2 ataca las células epiteliales de la mucosa respiratoria y se propaga a otras células, infecta los glóbulos blancos periféricos y las células inmunitarias, en particular los linfocitos T. Eso explica, en parte, la linfopenia observada en pacientes con COVID-19 (6). Las células naturales Killer, son células efectoras que se encuentra en la primera línea de defensa contra el virus, por lo tanto, un desequilibrio en el sistema inmunitario innato puede ser otro de los factores desencadenantes de la proliferación viral y la desregulación inmunitaria.

En cuanto a los Linfocitos B de nuestros resultados fueron similares a los de Jiang y col, quienes realizaron una comparación entre individuos controles y pacientes con COVID-19 observando que no existen diferencias estadísticas significativas entre los linfocitos B de los 2 grupos estudiados (7).

Al estudiar los marcadores evaluados comparándolos entre los grupos de estudio según la severidad de la enfermedad, pudimos observar que Los linfocitos T CD4 + tendieron a ser un biomarcador predictor de la gravedad, ya que los individuos con las formas moredas y severas presentaron una disminución estadísticamente significativa con respecto a los individuos que cursaban con la forma leve.

Comprender la interacción entre IL-6 e IL-10 refleja que el equilibrio entre las citoquinas pro inflamatorias y antiinflamatorias es de crucial importancia para identificar a los pacientes en estado hiperinflamatorio, lo que permite una mejor estratificación de los pacientes

y podría ayudar a determinar racionalmente las mejores opciones de tratamiento de forma individual.

Durante las enfermedades virales, incluida la COVID-19, la respuesta innata induce a las células infectadas a secretar varios mediadores proinflamatorios, lo cual genera una potente respuesta inflamatoria. La IL-6 y la IL-10 se producen en los sitios de inflamación del tejido y son liberadas a la circulación por una variedad de células diferentes, incluidos macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células endoteliales y epiteliales. Una vez producidas, estas citoquinas aumentan el flujo sanguíneo cerca del sitio de la infección y activan los macrófagos y otras células fagocíticas para eliminar el virus, así como las células infectadas.

IL-6 es un mediador clave en varios procesos inflamatorios, incluido el daño tisular y la infección. Ha estado en el centro de esta pandemia de COVID-19, al comienzo del brote, los niveles de IL-6 eran un indicador confiable de la gravedad de la enfermedad y un factor predictivo en términos de asistencia respiratoria. De acuerdo a los resultados de Wu y col, los niveles de IL-6 estaban estrechamente relacionados con la edad, el sexo, la temperatura corporal, la saturación de oxígeno (SpO₂) de la sangre y las enfermedades subyacentes. Por lo que indican que, como indicador estable, los cambios en los niveles de IL-6 podrían indicar las condiciones inflamatorias durante una infección vírica (8).

Por otro lado, se sabe que la IL-10 tiene propiedades antiinflamatorias que inician respuestas inmunitarias innatas y adaptativas y, por lo tanto, limitan las respuestas proinflamatorias para prevenir el daño tisular. Por lo tanto, a lo largo del curso agudo de una infección, la IL-10 inhibe la actividad de las células T, las células NK y los macrófagos que, a pesar de ser necesarios para la eliminación viral, también son factores clave que inducen el daño tisular. Por lo tanto, mientras limita el daño tisular colateral, la IL-10 también puede prevenir la eliminación viral exitosa (9). El equilibrio entre los niveles séricos de las citoquinas IL-6 e IL-10 puede ser una herramienta útil para predecir la gravedad de la enfermedad y los estudios adicionales deberían abordar esta característica (10).

Al estudiar la relación IL-10 linfocitos T reguladores en nuestros pacientes, encontramos una correlación positiva entre ambas variables, lo cual guarda mucha relación ya que los Linfocitos Treg tienen como función suprimir las respuestas inmunitarias y mantener

la tolerancia frente a lo propio, para así lograr la homeostasis del cuerpo, todo este proceso a su vez genera un aumento de IL-10, ya que la producción de esta es una de los mecanismos de supresión de los linfocitos T reguladores.

Los linfocitos T producen una gran expresión de citoquinas, lo que a su vez conduce a una marcada elevación de IL-6, acompañada además con la elevación de TNF- α sabiendo que el factor de necrosis tumoral, cumple con la función de regular simultáneamente la apoptosis y la proliferación celular, además promueve la producción de otras quimiocinas y citoquinas, y también participa en una serie de procesos fisiológicos como el control de la inflamación y la homeostasis del sistema inmunitario (11,12).

Conclusiones

Nuestro estudio demuestra la importancia de la evaluación del sistema inmune para la clasificación de pacientes y predicción del curso de la enfermedad, especialmente ante la aparición de nuevos agentes infecciosos, como fue el caso del SARS-CoV-2

Los marcadores celulares evaluados, específicamente los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T de memoria, así como las concentraciones séricas de IL-6 se proponen como predictores de severidad de la COVID-19.

Financiamiento:

Esta investigación fue financiada por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT) Proyecto N° 202000PGP2, ente adscrito al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.

Referencias

- Dhama K, Patel SK, Pathak M, Yatoo MI, Tiwari R, Malik YS, *et al.* An update on SARS-CoV-2/COVID-19 with particular reference to its clinical pathology, pathogenesis, immunopathology and mitigation strategies. *Travel Med Infect Dis* 2020;37:101755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101755>.
- Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, *et al.* COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5(1):128. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00243-2>.
- Jiang M, Guo Y, Luo Q, Huang Z, Zhao R, Liu S, *et al.* T-Cell Subset Counts in Peripheral Blood Can Be Used as Discriminatory Biomarkers for Diagnosis and Severity Prediction of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis* 2020;222(2):198-202. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiaa252>.
- Mayora S, Zabaleta M, Martínez W, Toro F, De Sanctis J, García A. Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations of Venezuelan Patients Infected with SARS-CoV-2. *Gaceta médica de Caracas*. 2020;128:S74-S78. <http://dx.doi.org/10.47307/GMC.2020.128.s1.8>.
- Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, *et al.* Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis* 2020;221(11):1762-1769. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiaa150>.
- Balzanelli MG, Distratis P, Dipalma G, Vimercati L, Catucci O, Amatulli F, *et al.* Immunity Profiling of COVID-19 Infection, Dynamic Variations of Lymphocyte Subsets, a Comparative Analysis on Four Different Groups. *Microorganisms*. 2021;9(10):2036. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9102036>.
- Jiang M, Guo Y, Luo Q, Huang Z, Zhao R, Liu S, *et al.* T-Cell Subset Counts in Peripheral Blood Can Be Used as Discriminatory Biomarkers for Diagnosis and Severity Prediction of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis* 2020;222(2):198-202. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiaa252>.
- Wu J, Shen J, Han Y, Qiao Q, Dai W, He B, *et al.* Upregulated IL-6 Indicates a Poor COVID-19 Prognosis: A Call for Tocilizumab and Convalescent Plasma Treatment. *Front Immunol* 2021;12:598799. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.598799>.
- Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He YW. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol* 2021;42(1):3-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2020.10.012>.
- Azaiz MB, Jemaa AB, Sellami W, Romdhani C, Ouslati R, Gharsallah H, *et al.* Deciphering the balance of IL-6/IL-10 cytokines in severe to critical COVID-19 patients. *Immunobiology* 2022;227(4):152236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152236>.
- Todd J, Simpson P, Estis J, Torres V, Wub AH. Reference range and short- and long-term biological variation of interleukin (IL)-6, IL-17A and tissue necrosis factor-alpha using high sensitivity assays. *Cytokine* 2013;64(3):660-665. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.09.018>.
- Guo Y, Hu K, Li Y, Lu C, Ling K, Cai C, *et al.* Targeting TNF- α for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. *Front Public Health* 2022;10:833967. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2022.833967>.