

Subpoblaciones linfocitarias de pacientes venezolanos infectados con SARS-CoV-2

Drs. Soriuska José Mayora¹, Mercedes Zabaleta Lanz¹, Wendy Martínez¹, Felix Toro¹, Juan Bautista De Sanctis^{1,2}, Alexis García¹

RESUMEN

La infección por SARS-CoV-2 ha infectado a más de 50 millones de personas con un rango de letalidad de 3 %-10 % de los casos. En Venezuela, cerca de 95 mil casos se han reportado con una letalidad del 1 %. El objetivo de este estudio es evaluar las diferentes poblaciones linfocitarias, analizar los posibles marcadores pronósticos y compararlos con la literatura. Un total de 18 pacientes positivos, por la prueba de transcriptasa reversa más reacción de la cadena de polimerasa (RT-PCR), fueron analizados 12 (5 masculinos) moderados, rango de edad 15-71 años, 6 (4 masculinos) severos (rango de edad 29-50 años) y 100 controles de la misma edad y sexo. Se encontró linfopenia en ambos grupos de pacientes con disminución significativa de linfocitos T. La población de células de memoria al igual que las células CD25 disminuye en la infección viral. Sin embargo, en los pacientes jóvenes del grupo moderado, se observaron los valores más altos de linfocitos T y valores normales

de memoria sugiriendo la pronta resolución del proceso infeccioso. En conclusión, los disminución de linfocitos T y células CD25 está relacionada con la infección viral y CD45RO es un marcador de severidad en la población adulta.

SUMMARY

The SARS-CoV-2 infection has infected more than 50 million people with the lethality of 3 %-10 % of the cases. In Venezuela, around 95 thousand individuals have been found positive with the lethality of around 1 %. Our study aimed to ascertain the different lymphocyte cell populations, analyze possible prognostic markers, and compare them with the literature. A total of 18 RT-PCR positive patients were analyzed, 12 (5 male) moderate (age range 15-71 years), 6 (4 male) severe (age range 29-50 years), and 100 controls matched by age and gender. Lymphopenia was observed in both groups of patients and the T cell population was the most affected. The memory cell population was decreased with the infection as well as the CD25 cell population. However, young patients with moderate symptoms had the highest values of T lymphocytes and memory cells suggesting a prompt resolution of the infection. In conclusion, the decrease in T lymphocytes and CD25 cells is related to the viral infection and CD45RO is a marker of severity in adult patients.

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2020.128.s1.8>

¹ Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

² Institute of Molecular and Translational Medicine. Faculty of Medicine and Dentistry. Palacky University. Olomouc. The Czech Republic.

Correspondencia: Dr. Alexis García. Profesor Asistente. Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

E-mail: alexisgarcia27@gmail.com

Números Orcid

Soriuska José Mayora 0000-0002-7194-7264

Mercedes Zabaleta 0000-0002-9540-7318

Félix Toro 0000-0002-8044-3279

Juan B. De Sanctis 0000-0002-5480-4608

Alexis García 0000-0002-2354-0160

Conflicto de Interés:

Ninguno

INTRODUCCIÓN

En marzo de 2020 la organización mundial de la salud (OMS) declaró el estado de pandemia por el síndrome respiratorio agudo severo causado por el coronavirus 2 (SARS-CoV-2). El análisis filogenético sugirió que el SARS-CoV-2 pudo haber surgido de un ciclo zoonótico que evolucionó rápidamente a la transmisión de humano a humano (1).

Desde la primera alarma por síndrome respiratorio de origen desconocido a finales del 2019 y hasta la fecha se han contabilizado a nivel mundial más de 50 millones casos de individuos con prueba positiva para el virus con una letalidad del 3 % al 4 %. Actualmente en Venezuela se han identificado aproximadamente 97 mil casos, 92 mil recuperados y 855 fallecidos (2). La letalidad observada en Venezuela es inferior a la reportada a nivel mundial (2).

Los síntomas reportados con más frecuencia en los individuos infectados con el SARS-CoV-2 son: fiebre, tos no productiva, mialgia, dificultad respiratoria, pérdida del gusto y del olfato. Algunos de los signos paraclínicos reportados son: conteo normal o bajo de leucocitos totales en sangre periférica, trombocitopenia, aumento de Lactato Deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), proteína C reactiva, procalcitonina y dímero D (3-6). Se ha descrito linfopenia con leucocitosis en casos severos a predominio de neutrófilos disfuncionales (6,7). La disminución de linfocitos T de ambas subpoblaciones así como la disminución de linfocitos B circulantes se ha reportado en los pacientes con enfermedad moderada o severa (5-7). Sin embargo, todavía se discute la importancia de otras poblaciones leucocitarias y si la determinación de subpoblaciones celulares puede ser un marcador de progresión o resolución del proceso infeccioso.

El presente trabajo tiene el objetivo de determinar las subpoblaciones linfocitarias más afectadas en la enfermedad en pacientes venezolanos y los posibles marcadores de severidad en pacientes infectados de nuestra población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se evaluó un total de 18 muestras de pacientes COVID-19, positivos para la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el virus SARS-CoV-2 proveniente de diversos centros asistenciales. Los pacientes fueron clasificados según sus características clínicas en 2 grupos: moderados: 12 (5 hombres y 7 mujeres, edad media: 36 años) y severos 6 (4 hombres y 2 mujeres, edad media: 41 años). El grupo de pacientes moderados fue subdividido en 2 grupos: moderados jóvenes (n=6 edad, 3 hombres media=20 años) y moderados adultos (n=6, 4 hombres, edad media=50 años). También fueron incluidos 100 controles sanos, 50 de cada grupo etario, quienes no poseían enfermedades infecciosas y no estaban relacionados con los pacientes COVID-19. El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética del Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco C." de la Universidad Central de Venezuela.

Detección de las subpoblaciones linfocitarias y hemograma

Se realizó el hemograma de sangre periférica anticoagulada con el ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) utilizando el contador hematológico ACT-DIFF de Beckman Coulter y las subpoblaciones linfocitarias fueron identificadas y cuantificadas mediante el citómetro de flujo Epics XL de la casa comercial Beckman Coulter. La caracterización se realizó utilizando los siguientes anticuerpos de la casa comercial Biolegend: anti CD3-PeCy5, anti CD4-FITC, anti CD8-PE, anti CD3-FITC (CD16+CD56)-PE Coctel, anti CD19-PE, anti-CD45RO-FITC. Además del anticuerpo anti-CD25-PeCy5 opticlón.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el software GraphPad Prism 5.0. Para la comparación del hemograma se realizó la prueba t, se estableció $P < 0,05$ como diferencia significativa. Para el resto de los valores

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS DE PACIENTES VENEZOLANOS

leucocitarios, se realizó la prueba de ANOVA de una vía; se estableció el valor de corrección post test de Bonferroni de $P < 0,05$ como indicador de diferencia significativa.

RESULTADOS

Las características generales de la población se pueden observar en el Cuadro 1. En él, se comparan los valores entre el grupo de controles y pacientes. Se utilizaron los controles etarios jóvenes para analizar los pacientes moderados jóvenes y los controles etarios mayores para analizar la población de moderados mayores y

severos. Se pueden observar las características básicas del hemograma de los controles y pacientes según el grupo etario. En el grupo de jóvenes con síntomas moderados se observa una disminución significativa solo en la cantidad de linfocitos circulantes. Sin embargo, en adultos mayores con síntomas moderados se observa una disminución significativa en leucocitos totales y linfocitos cuyo valor es significativamente menor a la del grupo moderados jóvenes ($P < 0,01$). En el grupo severo se observa un incremento significativo de la cantidad de leucocitos a expensas de neutrófilos y una linfopenia significativa, similar a la observada en pacientes moderados adultos mayores

Cuadro 1
Características de los Grupos

	n	Edad	Leucocitos mm ³	P	Linfocitos mm ³	P
Controles jóvenes	50	29,2±7,4	7148±853		2615±328	
Controles mayores	50	55,4±4,7	7217±959		2722±398	
Pacientes Moderados jóvenes	7	20,3±7,8	6975±1774	0,5	2371±1147	0,02
Moderados mayores	5	58,4±11,2	5180±945	0,0003	1262±310	0,002
Severos	6	40,5±7,8	16150±7470	0,03	1238±550	0,003

El Cuadro 1 representa las características del hemograma de los controles y los pacientes.

Las pruebas t de Student corresponden a la comparación entre los controles.

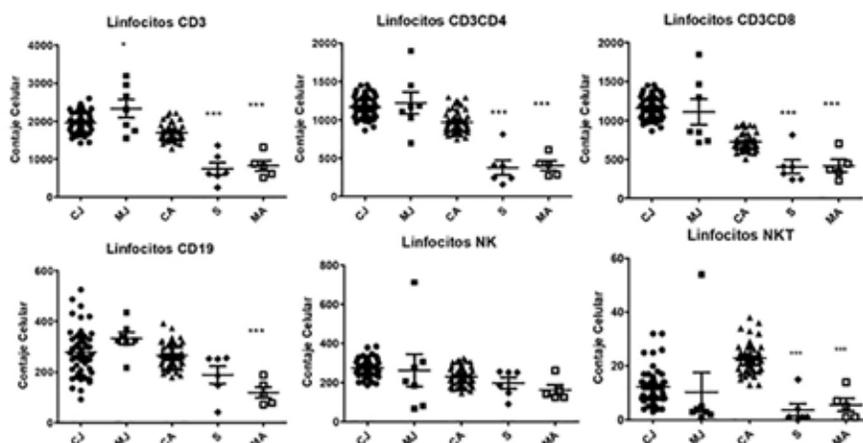


Figura 1. Diferencias entre las poblaciones de linfocitos T, B, NK y NKT de controles y pacientes. CJ representa controles jóvenes, MJ pacientes moderados jóvenes, CA controles adultos mediana edad, S severos y MA moderados adultos de mediana edad. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$.

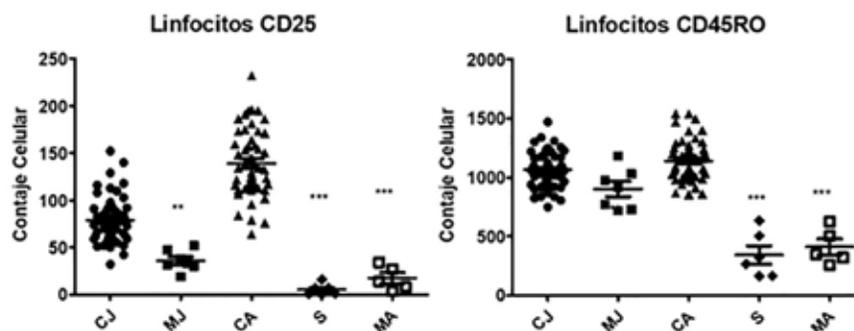


Figura 2. Diferencias entre las poblaciones de linfocitos CD25 y de memoria (CD45RO) de Controles y pacientes. CJ representa controles jóvenes, MJ pacientes moderados jóvenes, CA controles adultos mediana edad, S severos y MA moderados adultos de mediana edad. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$.

En la Figura 1 se comparan las poblaciones y subpoblaciones celulares analizadas. En el grupo de jóvenes con síntomas moderados, la única diferencia significativa se observa en el número de linfocitos CD3 totales, la cual no se observa en las subpoblaciones. En pacientes adultos mayores con síntomas moderados, se observan diferencias significativas en poblaciones totales de linfocitos T, en las dos subpoblaciones, en la población de linfocitos B y en la población NKT ($P < 0,0001$). Sorpresivamente, en la población NK no se observaron diferencias. En los pacientes severos, la cantidad total de linfocitos T y de las dos subpoblaciones están significativamente ($P < 0,0001$) disminuidas al igual que la población NKT. No se observan diferencias significativas en la población de linfocitos B.

En la Figura 2 se detalla la diferencia en la expresión del marcador CD25 y de CD45RO (células de memoria), El único marcador donde la población de jóvenes moderados tiene menor expresión es en CD25 ($P < 0,01$). Por el contrario, en los demás grupos se observa una disminución significativa de ambos marcadores.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados permiten establecer que para el grupo de moderados jóvenes, la única alteración importante es en el marcador CD25, un

marcador de fase temprana de activación y a la vez un marcador parcial de células T reguladoras y células $T\gamma\delta$ (8). Probablemente, la disminución CD25 se deba a una disminución de células T reguladoras ya que, en las otras poblaciones celulares, los valores son similares a los controles. Recientemente, se ha documentado que en los pacientes recuperados se observa un incremento de células de memoria con la disminución en células reguladoras CD25 (9) lo cual concuerda con nuestros resultados. Es muy posible que el grupo de jóvenes con síntomas moderados sea capaz de responder de forma eficiente contra la infección viral sin mayores alteraciones. No hay que descartar que ese grupo pudo haber estado expuesto a infecciones anteriores por otros coronavirus que generaron una memoria celular CD8 capaz de eliminar el virus SARS-CoV-2.

En el grupo de pacientes adultos mayores moderados, se observa una disminución significativa en todos los marcadores empleados excepto el de células NK. Este grupo se asemeja al de los severos, excepto porque este último tiene mayores cantidades de linfocitos B circulantes. Muy probablemente en este grupo se encuentren individuos que desarrollen una enfermedad severa producto de la infección viral. Jin y col. (10), demostraron la importancia del marcador CD45 para definir severidad de la enfermedad en los pacientes y el pronóstico de la misma. La disfuncionalidad del receptor CD45 está asociada a mortalidad en pacientes infectados con SARS-

CoV-2 (10). Este solo marcador pudiera además ser predictivo de la respuesta efectiva contra la infección viral como se ha postulado (9-10).

Se concluye que, en la población de pacientes venezolanos analizados, las manifestaciones paraclínicas son similares a las reportadas en otros estudios. Sin embargo, en el grupo de pacientes moderados jóvenes las subpoblaciones linfocitarias no se ven afectadas significativamente a excepción de la población celular positiva para CD25. El marcador de células de memoria (CD45RO) es un marcador clave de severidad y riesgo de la infección viral. Por ello, se sugiere como marcador a evaluar en los pacientes infectados en concordancia con los valores reportados por otros grupos a nivel mundial (9-10). Finalmente, es importante determinar en un futuro si las poblaciones de células de memoria CD8 contra el SARS-CoV-2 pudieran ser un marcador importante para definir la respuesta a la infección natural y a las vacunas contra el virus.

Agradecimientos:

Proyecto Financiado por el FONACIT actas números 20,21 y 23 de 2020

REFERENCIAS

1. Sofi MS, Hamid A, Bhat SU. Coronavirus COVID-19: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosaf Health*. 2020; <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.11.002>
2. COVID-19 Coronavirus Pandemic. <https://www.worldometers.info/coronavirus/?> Noviembre 17, 2020.
3. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Leeflang MM, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;7(7):CD013665.
4. Cai L, Zhou X, Wang M, Mei H, Ai L, Mu S, et al. Predictive nomogram for severe COVID-19 and identification of mortality-related immune features. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;S2213-2198(20)31197-1.
5. Bell R, Zini G, d'Onofrio G, Rogers HJ, Lee YS, Frater JL. The hematology laboratory's response to the COVID-19 pandemic: A scoping review. *Int J Lab Hematol*. 2020;00:1-12.
6. Xie L, Wu Q, Lin Q, et al. Dysfunction of adaptive immunity is related to severity of COVID-19: a retrospective study. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14:1753466620942129.
7. Vitte J, Diallo AB, Boumaza A, Lopez A, Michel M, et al. A granulocytic signature identifies COVID-19 and its severity. *J Infect Dis*. 2020;jiaa591.
8. Lei L, Qian H, Yang X, et al. The phenotypic changes of $\gamma\delta$ T cells in COVID-19 patients. *J Cell Mol Med*. 2020;10.1111/jcmm.15620.
9. Kratzer B, Trapin D, Ettel P, Körmoczi U, Rottal A, Tuppy F, et al. Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy. Eur J Allergy Clin Immunol*. 2020; doi:10.1111/all.14647
10. Jin M, Shi N, Wang M, Shi C, Lu S, Chang Q, et al. CD45: A critical regulator in immune cells to predict severe and non-severe COVID-19 patients. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(20):19867-19879.