

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

Estudi del valor pronòstic de les poblacions limfocitàries T- específiques front el SARS-Cov-2 en COVID-19.

TESI DOCTORAL

GERMAN JULIA AGULLO

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Institut de recerca Sant Pau

Departament de malalties inflamatòries

Barcelona, Espanya

TESI Tesi doctoral supervisada per:

Directora/tutora:

Silvia Vidal Alcorisa

Tesi per l'obtenció del grau de doctor en Immunologia Avançada de la Universitat Autònoma de Barcelona

A Núria,

Magí i Dídac

Contingut

Índex de figures	8
Índex de taules.....	9
Abreviatures	10
1. INTRODUCCIÓ	11
Etiologia i manifestacions clíniques de la COVID-19.....	11
Maneig terapèutic del pacient COVID-19.....	12
Fisiopatologia de COVID-19.....	15
Estructura i replicació SARS-CoV-2.....	17
Resposta immunitària front SARS-CoV-2.	20
Resposta immunitària innata front SARS-CoV-2.....	21
Interferons.....	21
Macròfags:	24
Neutròfils i NETosis:	25
Inflamasoma	26
Cèl·lules NK.....	27
Immunitat humoral: El sistema del Complement.....	30
Cel·lules Dendrítiques.....	31
Resposta immunitària Adaptativa front SARS-CoV-2.....	32
Limfocits B i subtipus.....	33
Activació dels LBi producció Anticossos	34
Receptors Fc de Immunoglobulines i Funcions efectores	35
Funcions efectores dels anticossos	36
Els limfòcits T	39
Presentació antigènica alsLT.....	39
Activació i polarització dels LTh.	42
Activació LTC.	46

Polarització de LTc.....	48
LT memòria.....	49
Poblacions de LTh memòria i el seu desenvolupament	50
Poblacions de LTcmemòria i el seu desenvolupament	52
Parells receptors-co-estimuladors i marcadors d'activació.....	54
Mecanismes d'evasió de la R.I. de SARS-CoV-2.	57
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	60
3. MATERIALS I MÈTODES	62
3.1 Disseny, àmbit i aspectes etics.....	62
3.2 Població d'estudi i càlcul de mostra	62
3.3 Dades dels pacients.	63
3.4 Diagnòstic pacients COVID-19.....	67
Síntomes i signes de la infecció per SARS-CoV-2	67
Diagnòstic microbiològic SARS-CoV-2	69
3.5 Obtenció i processament de les mostres	71
3.6 Determinació de paràmetres paraclínic.....	72
3.7 Determinació dels paràmetres paraclínic immunològic.....	76
3.8 Anàlisi del fenotip de les cèl·lules de sang perifèrica.	77
3.9 Obtenció i cultiu de cèl·lules mononuclears.....	82
3.10 Anàlisi del fenotip de cèl·lules mononuclears del cultiu	83
Determinació de citocines al sobrenedant dels cultius.....	86
3.5 Anàlisi estadística.....	89
3.5.1 Anàlisi univariant.....	89
3.5.1 Anàlisi multivariant.....	90
3.6 Pla de treball, cronograma	91
4. RESULTATS.....	94
Descripció dels pacients COVID-19 i grup control	94
Relació entre les característiques dels pacients	97

Comparació pacients greus i moderats al T0(T0)	101
Paràmetres serològics	101
Anàlisi de les poblacions hematològiques:.....	104
Anàlisi de les subpoblacions limfocitàries	104
Comparació de l'expressió CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2	105
Arbre decisió per pronòsticar evolució greu en pacients hospitalitzats.....	107
Correlacions entre paràmetres a controls i pacients greus i moderats	109
Evolució dels paràmetres als pacients greus i moderats (T0→T1)	112
Canvis en els marcadors d'activació al T1	114
Comparació de l'evolució de paràmetres entre pacients greus i moderats	116
Activació in vitro dels leucocits de sang perifèrica de pacients greus i moderats al T1	120
Fenotip dels leucocits després d'activació policlonal (PHA).....	120
Fenotip dels leucocits després d'activació específica amb peptids de SARS-CoV2	121
Producció citocines després de l'activació policlonal T1.....	124
Producció citocines després de l'activació específica amb peptids de SARS-CoV2	125
5.DISCUSSIÓ.....	127
6.CONCLUSIONS.....	145
7.AGRAÏMENTS	147
8.Bibliografia.....	148

Índex de figures

Figura 1. Manifestacions clíniques extrapulmonars de COVID-19.....	11
Figura 2.Efectes de la infecció de SARS-CoV-2 als alveols pulmonars.....	15
Figura 3. Estructura de SARS-CoV-2.....	17
Figura 4 Cicle de replicació de SARS-CoV-2.....	18
Figura 5. Evolució en el temps de la càrrega viral i els títols d'anticossos.....	37
Figura 6. Vies de presentació antigènica als LT.....	40
Figura 7. Polarització dels LTh.....	44
Figura 8. Radiografia de torax per al diagnòstic de COVID-19.....	67
Figura 9. Scattergrama de poblacions hematològiques.....	73
Figura 10. Anàlisi de subpoblacions en sang perifèrica.....	78
Figura 11. Anàlisi de les subpoblacions en PBMCs.....	85
Figura 12. Dilucions seriades per a la preparació de la corba estàndard Luminex.....	86
Figura 13. Cronograma.....	92
Figura 14. Arbre de decisió per al pronòstic de evolució greu en pacients COVID hospitalitzats.....	107
Figura 15. Matrius de correlació entre els paràmetres serològics, poblacions hematològiques i subpoblacions limfocitàries de sèrum i sang perifèrica de.....	108
Figura 16. Matrius de correlació entre els paràmetres serològics, poblacions hematològiques i subpoblacions limfocitàries de sèrum i sang perifèrica de pacients COVID-19.....	110
Figura 17. Evolució dels paràmetres entre T0 i T1 als pacients Moderats i Greus.....	118

Índex de taules

Taula 1. Classes i funcions de les immunoglobulines.....	34
Taula 2. Marcadors de les subpoblacions CD4 i CD8 memòria.....	48
Taula 3. Parelles receptors lligands que participen en la co-estimulació del LT.....	54
Taula 4. Mecanismes d'evasió de la via dels IFNs per SARS-CoV-2.....	57
Taula 5. Supervivència a 10 anys segons el càlcul del índex Charlson.....	65
Taula 6. Anticossos per al marcatge de superfície de les subpoblacions cel·lulars.....	77
Taula 7. Paràmetres de la configuració de l'assaig Luminex.....	86
Taula 8. Característiques rellevants dels pacients.....	95
Taula 9. Relació entre les característiques rellevants dels pacients greus i moderats...	97
Taula 10. Diferències entre controls sans i pacients moderats i greus al T0.....	102
Taula 11. <i>Diferències de marcadors entre controls sans i pacients moderats i greus a T0.....</i>	<i>105</i>
Taula 12. <i>Evolució dels paràmetres dels pacients moderats i greus entre T0 i T1.....</i>	<i>113</i>
Taula 13. <i>Evolució dels marcadors i subpoblacions de memòria en pacients moderats i greus.....</i>	<i>114</i>
Taula 14. DMSO PHA als PBMCs analitzats per citometria.....	120
Taula 15. Ràtio PHA/DMSO en MOD Gre.....	121
Taula 16. Poblacions de PBMCs en estimul M, N, i S i Ràtio M, N, i S/DMSO.....	122
Taula 17. Citocines Resultats DMSO PHA i Ratio PHA/DMSO en MOD Gre.....	123
Taula 18. Citocines Resultats M N S i Ratio x/DMSO en MOD Gre.....	124

Abreviatures

RT-PCR	reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció reversa
DD	dimer-D
LDH	lactat deshidrogenasa.
PCR	proteïna C reactiva.
SDRA	síndrome de dificultat respiratòria aguda.
PRR	receptors de reconeixement de patrons.
IRF	factors d'alliberament d'IFN.
IP-10	proteïna 10 induïda per interferó.
MCP-1	proteïna 1 de quimiotaxi de monòcits.
G-CSF	factor estimulant de colònies de granulòcits.
Th	limfòcits Tcolaboradors.
NK	cèl·lules natural killer
ACE2	enzim convertidor de la angiotensina-2
IFN-I	Interferons de tipus I
pCD	Cèl·lules dendrítiques plasmacitoides
IRF	factors alliberadors d'interferó.
ROS	Espècies reactives de l'oxigen.
NETs	Trampes extracèl·lulars de neutròfils.
ITAM	Motiu immunoreceptor activador basat en tirosines.
ADCC	Citotoxicitat cel·lular dependent d'anticòs.
CPs	Cèl·lules plasmàtiques.
LTc	Limfòcits T citotòxics (LTc).
LB-2z	Limfòcits B de la zona marginal.
LB-2f	Limfòcits B foliculars.
LBmem	LB de memòria.

1. INTRODUCCIÓ

Etiologia i manifestacions clíniques de la COVID-19

L'agent infecció causant de la COVID-19 es el SARS-CoV-2, un virus d'RNA que pertany a la família *Coronaviridae*. Els Coronavirus son virus esfèrics d'aproximadament 125 nm de diàmetre que presenten proteïnes que sobresurten de la superfície del virió donant lloc a la aparença d'una corona. La subfamília Orthocoronavirinae presenta el genoma mes gran dels virus d'RNA, amb longituds entre 26 a 32 Kb, es subdivideix en 4 gèneres: alfa-coronavirus, beta-coronavirus, gamma-coronavirus i delta-coronavirus. Els alfa- i beta-coronavirus infecten únicament mamífers mentre que els gamma- i delta-coronavirus infecten aus. Dels coronavirus que infecten als humans, 4 (HCoV- NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 i HKU1) produeixen malalties respiratòries lleus com els refredats estacionals i 3 (SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2) causen malalties respiratòries greus (1).

Fins a un 80% dels infectats amb SARS-CoV2 són asimptomàtics o que presenten manifestacions clíniques lleus com son febre, tos, pèrdua de l'olfacte i el gust. Amb menys freqüència poden presentar fatiga, miàlgia, nàusies, vomits, diarrea o dolor abdominal. En canvi, fins el 15% de pacients pateixen una malaltia greu i desenvolupen a mes a mes manifestacions extrapulmonars (Figura 1.). En aproximadament el 5% dels casos l'empitjorament continu de la funció respiratòria, cardíaca, renal, hepàtica o de la coagulació poden arribar a ser fatals. En diferents cohorts, s'ha descrit que el risc de gravetat de la COVID-19 pot dependre de comorbiditats que presenti cada pacient (diabetis, hipertensió, neoplasia o immunodeficiència), així com de factors individuals (obesitat, edat, factors genètics) i tractaments (estat de vacunació, tractament immunosupressor) (2).

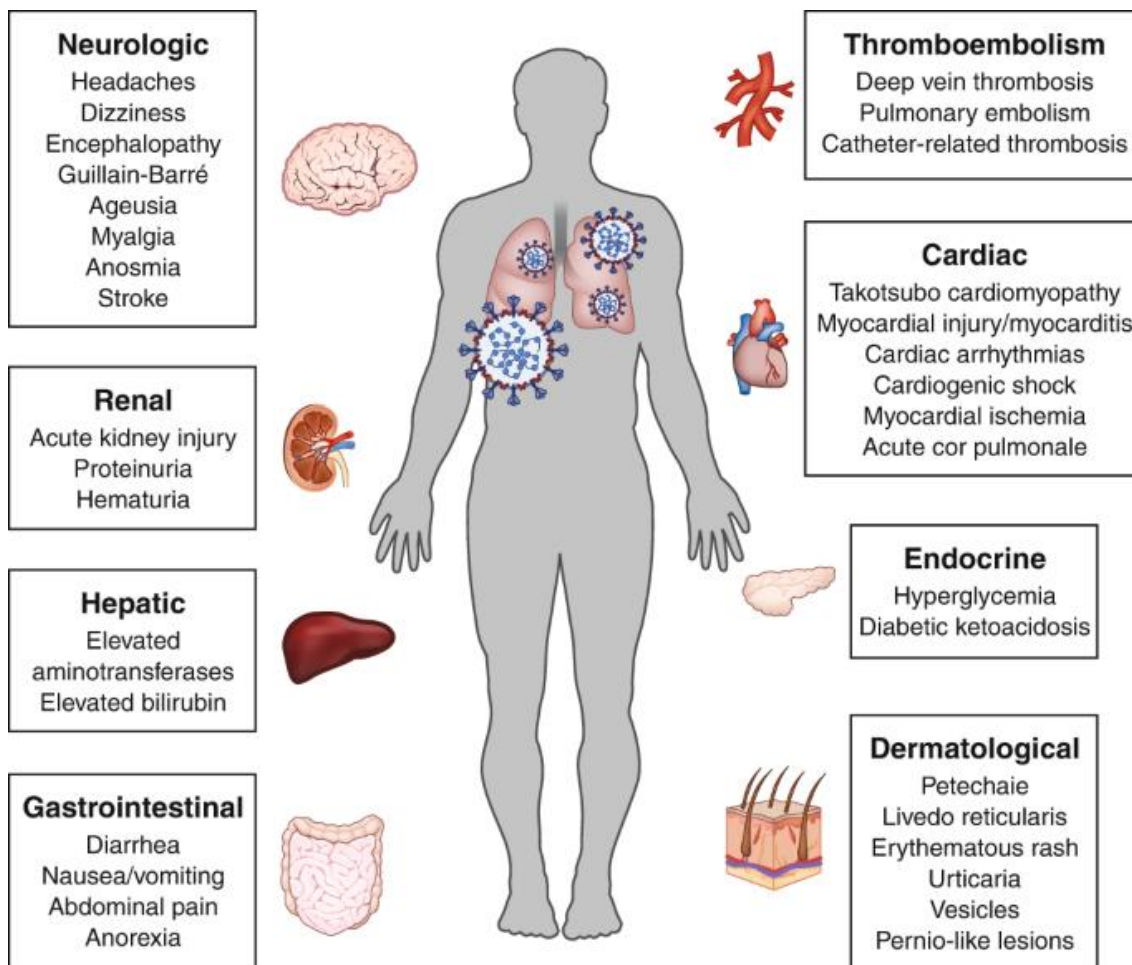


Figura 1. Manifestacions clíniques extrapulmonars de Covid-19. Imatge adaptada de: Gupta, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. Nat Med 26, 1017–1032 (2020)

Maneig terapèutic del pacient COVID-19.

El diagnòstic microbiològic de COVID-19 es basa en la detecció del RNA víric en hisop nasofaringi, mitjançant tècniques de reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció reversa (RT-PCR) o en la detecció dels antígens virals mitjançant immunocromatografia. També es tenen en compte criteris clínics, tècniques de diagnòstic per la imatge i els resultats de paràmetres paraclínic per al diagnòstic diferencial amb altres infeccions o patologies pulmonars.

Els paràmetres paraclínic que mes freqüentment es troben alterats als pacients COVID-19 i es poden fer servir en la monitorització i seguiment dels pacients hospitalitzats son:

- Hemograma (limfopènia, neutrofília, monocitopènia, eosinopènia i basopènia).
- Marcadors inflamatoris (inespecífics: velocitat de sedimentació globular, proteïna C reactiva (PCR) o la ferritina; immunològics: TNF- α , IL-1 o IL-6).
- Marcadors de dany tissular (lactat deshidrogenasa, LDH).
- Coagulació (dimer-D(DD), temps protrombina, trombocitopènia, fibrinogen).

Les complicacions que poden aparèixer durant l'hospitalització dels pacients COVID-19 són: pneumònia, síndrome de dificultat respiratòria aguda (SDRA), lesió hepàtica aguda (caracteritzada per elevacions d'aspartat transaminasa, alanina transaminasa i la bilirubina), lesió cardíaca (elevació de troponina), insuficiència cardíaca aguda, arítmies o miocarditis, coagulopatia protrombòtica (que produeix esdeveniments tromboembòlics venosos i arterials), lesió renal aguda, manifestacions neurològiques, malaltia cerebrovascular aguda i xoc. Les complicacions menys freqüents que poden aparèixer als pacients crítics COVID-19 són: tempesta de citocines i el síndrome d'activació de macròfags o limfohistiocitosi hemofagocítica secundària.

Al "Procediment d'actuació COVID-19. Protocol de maneig terapèutic infecció per COVID-19" es descriuen els criteris d'hospitalització i tractament dels pacients COVID-19 de l'hospital universitari Parc Taulí que es va seguir durant la realització de l'estudi. Els paràmetres clínics de classificació dels pacients són:

- ➔ **Pneumònia:** Infecció respiratòria aguda que afecta als pulmons, on els alvèols pulmonars s'omplen de líquid o pus, produint tos, febre, calfreds i dispnea.
- ➔ **CURB 65:** Escala de predicció de mortalitat y de valoració de severitat en pacients amb pneumònia adquirida a la comunitat. Establerta per el BritishThoracicSociety, CURB 65 es un acrònim de: Confusió (menys de 8 punts en el AMT, *abbreviated mental test score*), urea (major de 7mmol/L), respiració (freqüència respiratòria major de 30/min), pressió sanguínia (, sistòlica menor de 90 mmHg o diastòlica menor o igual de 60 mmHg) i

edat(major o igual a 65 anys). Per cada factor clínic que es presenti es suma un punt (escala de 0 a 5). Es recomana hospitalització si CURB 65 \geq 2.

- ➔ **FiO₂**: Fracció inspirada d'oxigen, es la fracció d'oxigen per unitat de volum. L'aire conté un 21% d'O₂ el que equival a una FiO₂ de 0.21. Els pacients que presenten dispnea se'ls hi subministra aire enriquit amb oxigen.
- ➔ **Saturació O₂(SatO₂)**: el percentatge normal a la sang es 95-100%. Valors per sota del 95% produeixen hipoxèmia.
- ➔ **Freqüència respiratòria (FR)**: La normal en adults es 8-16 respiracions/minut.
- ➔ **PaO₂/FiO₂**: Índex que relaciona la pressió parcial d'oxigen arterial mesurada per gasometria, amb la fracció inspirada d'oxigen que a l'aire es del 21%(3). Segons el valor del índex es defineixen 3 categories d'hipoxèmia: lleu (\leq 300 mmHg), moderada, (\leq 200 mmHg), i greu (\leq 100 mmHg).

Segons els paràmetres clínics, el quadre del pacient es classifica en:

Infecció lleu sense pneumònia. El pacient no presenta pneumònia i no requereix d'hospitalització, segueix un tractament simptomàtic i vigilància de la seva evolució.

Pneumònia no greu. El pacient presenta pneumònia, CURB 65 < 2, SatO₂ \geq 95% o FR \geq 20 resp/min. Si es menor de 70 anys, autònom i sense patologia pulmonar segueix un maneig ambulatori o hospitalització domiciliària amb tractament antibiòtic. Si es major de 70 anys hospitalització amb tractament antibiòtic.

Pneumònia moderada o greu. Si el pacient presenta pneumònia, CURB 65 \geq 2 o SatO₂ < 95% requereix d'hospitalització. El tractament antiviral, corticosteroid o amb fàrmac biològic dependrà dels criteris clínics, analítics i radiològics de cada tractament.

Els criteris per a l'ingrés del pacient a la unitat de crítics son fallada hemodinàmica, respiratòria o renal.

Fisiopatologia de COVID-19.

El mecanisme d'infecció de SARS-CoV-2, es basa en el seu transport a través de la saliva i les secrecions nasals alliberades durant el parlar, esternudar o tossir. El període mitjà d'incubació abans de l'aparició dels símptomes és variable, entre 4 i 10 dies, en funció de la quantitat de virus amb la que te lloc la infecció(4).

Durant la infecció per SARS-CoV-2, el virus infecta cèl·lules epitelials pulmonars així com pneumòcits alveolars tipus I i II i les cèl·lules endotelials capil·lars(5). Els components estructurals i el material genètic del virus activen els receptors de reconeixement de patrons (PRR) TLR3/7 dels endosomes i MAVS citoplasmàtics de les cèl·lules infectades i macròfags alveolars. La unió dels lligands desencadenen l'expressió de factors d'alliberament d'IFN (IRF) i activen la via NF- κ B. Fet que indueix la secreció d'IFNs i citocines inflamatòries com el TNF α , IL-1 i IL-6 (6). Les citocines alliberades promouen l'activació de l'endoteli vascular i el reclutament de mes monòcits i neutròfils al teixit infectat. A les cèl·lules infiltrants s'activen els PRR amb les estructures del virus, i s'indueixen la síntesi de mes citocines inflamatòries, donant lloc

a la tempesta de citocines (Fig 2.)(7,8)

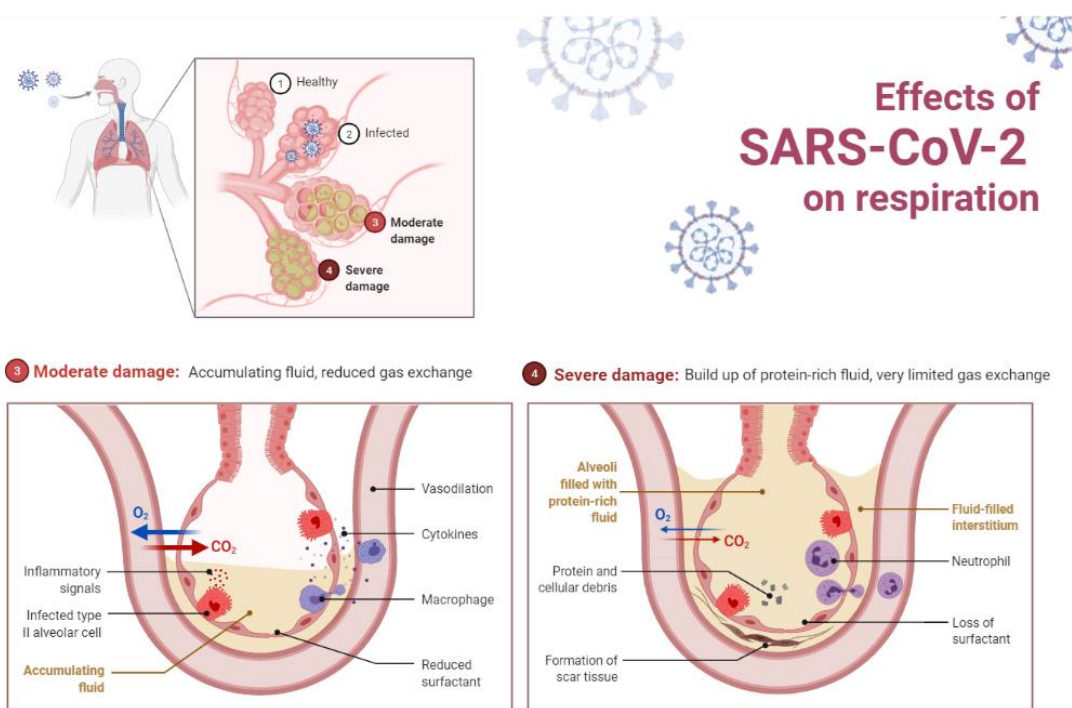


Figura 2. Efectes de la infecció de SARS-CoV-2 als alveols pulmonars. Imatge estreta de: Biorender.com

També s'indueix la síntesi i dipòsits de fibrina, es produeixen i s'alliberen pèptids vasoactius que promouen el relaxament del múscul llis vascular i l'increment de la permeabilitat vascular provocant que el líquid entri al teixit i ocupi l'espai alveolar, de manera que s'afecta la funció del surfactant pulmonar. Com a conseqüència, es produeix la insuficiència respiratòria compatible amb la síndrome de dificultat respiratòria aguda en fase inicial.

La síndrome de la dificultat respiratòria aguda, es defineix per la presència d'hipoxèmia aguda severa, infiltrats pulmonars bilaterals difusos, principalment neutròfils i la presència d'edema pulmonar, produït per l'increment de la permeabilitat vascular, que promou l'entrada de líquid i proteïnes a l'espai alveolar el que disminueix la capacitat pulmonar (9).

La tempesta de citocines fa referència a la hiperactivació de la resposta immunitària i la producció de alts nivells de citocines proinflamatòries com la proteïna 10 induïda per interferó (IP-10) proteïna 1 de quimiotaxi de monòcits (MCP-1), proteïna inflammatòria dels macròfags, MIP-1, IL-2, IL-6, IL-7, factor estimulant de colònies de granulòcits (G-CSF) i TNF- α , que causa coagulopatia intravascular disseminada, insuficiència multiorgànica i SDRA (10,11,12). Aquesta tempesta presenta 2 etapes:

1era etapa- Secreció de citocines pro-inflamatòries i quimiocines per cèl·lules epitelials infectades de les vies respiratòries i macròfags residents. Fet que promou l'arribada de monòcits, neutròfils, CD8, limfòcits T col·laboradors (Th) i cèl·lules natural killer (NK). Aquestes cèl·lules col·laboren amb cèl·lules del sistema immunitària innat i eliminen la infecció. Però determinats factors (producció deficient de IFNs o activitat citolítica de les cèl·lules NK reduïda) poden provocar una resposta antiviral inadequada i retardar l'eliminació del virus, donant lloc a una activació continuada dels mecanismes pro-

inflamatoris. Aixó condueix a la segona etapa i a una major infiltració dels pulmons (13,14,15,16). La segona etapa, es produeix normalment als set dies posteriors a la infecció i es caracteritza per la producció de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5, IL-6 i quimiocines(17).

Estructura i replicació SARS-CoV-2.

El virió presenta una forma esfèrica amb un diàmetre d'entre 80 i 120 nm amb un embolcall membranós (Fig. 3) i conté una nucleocàpside helicoidal simètrica que estableix el material genètic format per una única cadena d'RNA monocatenari de sentit positiu (RNA^{ss+}) de 29.9 kb, que presenta una estructura en cap 5' i una cua poliA en 3' que li permet actuar com un RNA missatger i traduir-se a l'interior de la cèl·lula infectada. Genèticament SARS-CoV-2 està relacionat amb SARS-CoV i amb altres coronavirus hospedadors d'humans com el MERS-CoV, de rat penats Bat CoVs i d'altres mamífers. El virió presenta 4 proteïnes estructurals: Espícula (S), membrana (M), embolcall (E) i nucleocàpside (N) codificades als gens pròxims a l'extrem 3' del genoma. També presenta 16 proteïnes no estructurals (nsp) i proteïnes accessòries, no son essencials per a la replicació del virus, que tenen importància en la patogènesi de SARS-CoV-2.

Proteïna S: Es una proteïna transmembrana de 150-200 kDa, homotrimerica (18). Cada monòmer presenta 2 subunitats S1 i S2, que conjuntament formen diferents dominis funcionals: Domini N-terminal , domini d'unió al receptor amb glicosilacions, lloc de tall de furina S1/S2, pèptid de fusió, hèlix central, dominis connector i transmembrana i cua citoplasmàtica. La principal funció es la interacció entre RBD de la subunitat S1 amb el receptor ACE2 a les cèl·lules de l'hoste. Es un dels principals determinants antigènics reconeguts pel sistema immunitària i participa a la patogènesi activant l'estres del reticle endoplasmàtic.

Proteïna M: Es la proteïna mes abundant a l'embolcall (25-30 kDa) i te tres dominis transmembrana Els homodimers s'associen amb altres proteïnes estructurals facilitant

l'ensamblatge dels components de les partícules virals. Pot presentar O-glicosilacions, condicionant el tropisme del virus i la senyalització d'IFN de les cèl·lules infectades.

Proteïna E: Proteïna (8-12 kDa) que forma un porus estret a la membrana i participa en l'ensamblatge i alliberament dels virions.

Proteïna N: Es l'únic component de la nucleocàpsid del virus. Presenta tres dominis: N terminal, C terminal i domini d'unió al RNA. Participa en l'ensamblatge del virus i potència la transcripció de l'RNA víric.

Altres proteïnes: El genoma de SARS-CoV-2 codifica per a 16 proteïnes no estructurals. D'entre les diferents funcions que presenten destaquen: inhibir la traducció dels mRNAs de l'hoste; participar del complex replicació-transcripció del virus i del complex amb activitat RNA polimerasa, promoure formació de vesícules de doble membrana. També codifica per a 8 proteïnes accessòries que participen en la replicació del virus i en els mecanismes d'evasió del sistema immunitària, degradant el complex major d'histocompatibilitat de classe I inhibint la senyalització i resposta dels Interferons de tipus I (IFN-I) (19,20).

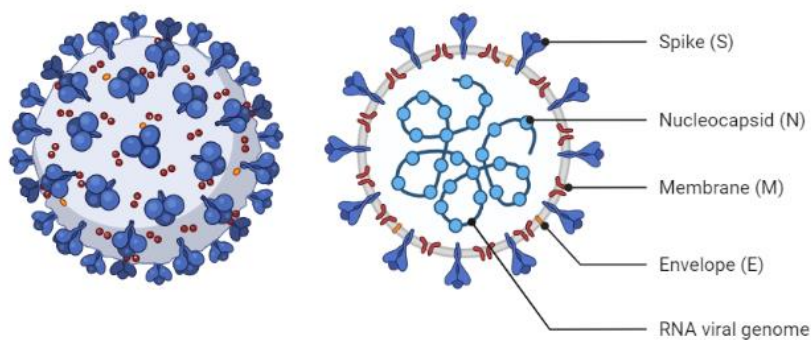


Figura 3. Estructura de SARS-CoV-2. Imatge estreta de: BIORENDER.com

Per completar un cicle replicatiu, el SARS-CoV-2 s'uneix al receptor enzim convertidor de la angiotensina-2 (ACE2) present a la cèl·lula hoste a través del domini RBD de la subunitat S1 present a la proteïna S (21). ACE-2 es una carboxipèptidasa que s'expressa principalment a les cèl·lules epitelials dels pulmons, intestí prim, ronyons i

cor. Després de la unió RBD-ACE2, la proteïna S rep una sèrie d'escissions que desencadena canvis conformationals i la fusió de membranes (Figura 4.).

La nucleocàpsida es alliberada al citoplasma de la cèl·lula hoste, on el ssRNA+ del virus es traduït com un mRNA per la maquinaria traduccional de la cèl·lula, formant-se les proteïnes no estructurals per formar el complex de replicació-traducció i vesícules amb doble membrana (VDM) al voltant del nucli cèl·lular on té lloc la replicació i la traducció dels RNAm subgenòmics. Les proteïnes estructurals S, M i E es sintetitzen als ribosomes del reticle endoplasmàtic, i la proteïna N als ribosomes. Les proteïnes estructurals sofreixen modificacions post-traduccionals i la proteïna M mitjançant interaccions amb les proteïnes S, E i N regula la condensació de la nucleocàpsida i la seva associació amb l'embolcall del virus. Els nous virions madurs formats, són transportats a l'espai extracèl·lular fent servir la via d'exocitosi de la cèl·lula.

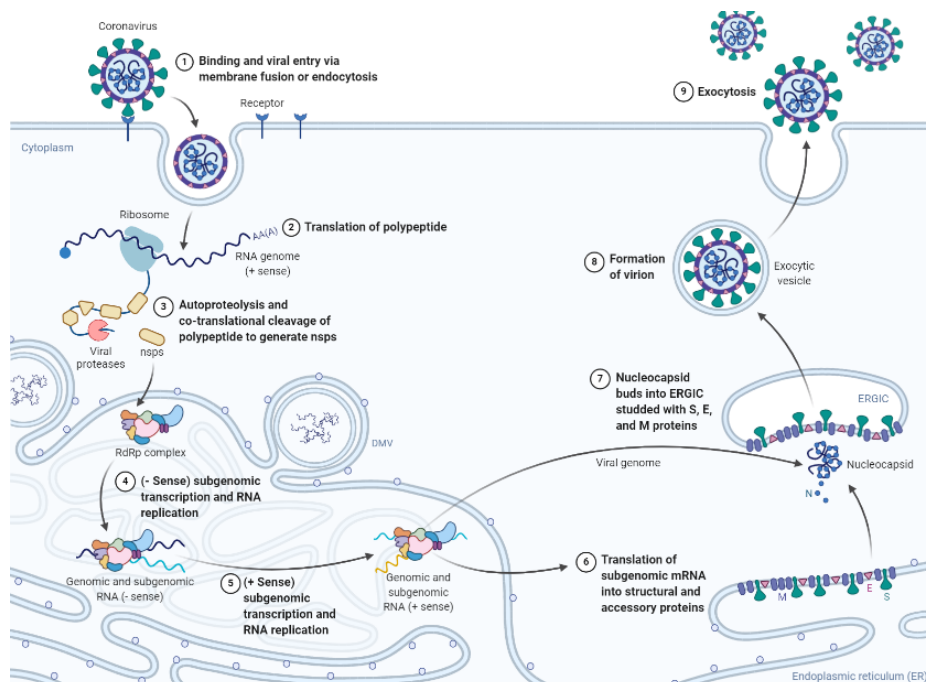


Figura 4. Cicle de replicació de SARS-CoV-2. Imatge estreta de: Biorender.com

La replicació del virus, interfereix amb la síntesi normal de proteïnes, el que comporta una afectació funcional i la mort de la cèl·lula infectada. Aquest mecanisme és un dels

efectes citopàtics dels virus. La infecció s'anomena lítica perquè la cèl·lula infectada es lisa per la replicació i alliberament de partícules virals.

Resposta immunitària front SARS-CoV-2.

La resposta front les infeccions víriques implica a tots els components del sistema immunològic de l'organisme que d'una manera coordinada i seqüencial intenten evitar la infecció, contenir-la, eliminar el virus, generar memòria específica i finalment contreure la resposta i reparar els teixits que han estat infectats i afectats per l'activació de la resposta immunitària.

La mucosa de les vies respiratòries superiors i els epitelis pròxims formen la primera barrera física que ha de travessar el virus per infectar l'organisme. A la mucosa, els elements fisico-químics com la capa de mucina que atrapa els patògens, la presència de la microbiota comensal de les vies aèries superiors, i els components del teixit limfoide subcutani i associat a la mucosa dificulten l'entrada del virus. A la conjuntiva ocular i a la mucosa respiratòria té lloc la secreció de IgA dimèrica que podria neutralitzar l'entrada del virus. A la nasofaringe, la microbiota comensal, la presència de moc i els moviments ciliars impedeixen l'entrada del virus a les cèl·lules. Als pulmons hi ha cèl·lules fagocítiques com els macròfags tissulars i secrecions, com el surfactant pulmonar, que eviten que els virus arribin a infectar les seves cèl·lules.

Tot i la presència de les barreres fisico-químiques, els virus poden arribar a infectar les cèl·lules epitelials pulmonars. Es llavors quan s'activa la resposta immunitària innata i l'adaptativa per bloquejar la infecció i eliminar les cèl·lules infectades. Tant els IFNs de tipus I com els anticossos neutralitzen els receptors del virus impedit que el virus infecti noves cèl·lules. Però una vegada que s'ha produït la infecció, les cèl·lules infectades són eliminades per cèl·lules NK o LT citotòxics.

Resposta immunitària innata front SARS-CoV-2.

La resposta immunitària innata (RII) actua immediatament, una vegada que els virus han travessat les barreres físico-químiques de les vies aèries superiors i han iniciat la infecció de les cèl·lules epitelials pulmonars. Aquesta resposta no es específica del virus sinó que es basa en el reconeixement d'estructures conservades als diferents patògens, i s'activa independentment del virus que la provoqui. En la majoria dels casos, la RII no pot eliminar la infecció, sinó que la conté fins que s'activen i s'expandeixen clonalment les cèl·lules efectores de la resposta immune adaptativa (RIA) específiques del virus.

Entre els mecanismes efectors de la RII front els virus s'inclouen: cèl·lules del parènquima del teixit infectat, neutròfils, macròfags, Cèl·lules dendrítiques (CD), cèl·lules limfoides innates i cèl·lules NK. També participen molècules solubles: IFN-I, citocines que coordinen la resposta tant de la RII com de la RIA, quimiocines que regulen la recirculació leucocitària i dirigeixen les cèl·lules efectores cap al teixit infectat, així com proteïnes del complement i altres molècules antimicrobianes, com els reactants de fase aguda. Tant les CD com els macròfags son cèl·lules residents als teixits que contínuament analitzen l'espai extracèl·lular per pinocitosi. Quan s'uneixen les estructures dels patògens als receptors de patrons moleculars, s'activen cascades de senyalització intracèl·lular per promoure el canvi en el patró d'expressió gènica i iniciar la síntesi de citocines pro-inflamatòries i les funcions efectores: fagocitosi i presentació antigènica.

Interferons

El IFNs reben el seu nom de la capacitat que presenten per interferir en la infecció viral, participen durant l'etapa inicial de la resposta anti-vírica. En humans, hi ha 17 subtipus d'IFN-I, codificats per un clúster gènic localitzat al cromosoma 9 i tots s'uneixen al mateix receptor heterodimèric (IFNAR1 i IFNAR2) (22). Els principals IFN-I que participen a la resposta front els virus son els IFNs α i β . L'IFN- β és induït pels

virus a la majoria de tipus cèl·lulars, mentre que les principals cèl·lules productores d'IFN- α són les CD plasmacitoides (pCD) i els fagòcits mononuclears (23). Les deficiències congènites de l'IFN-I confereixen susceptibilitat a diverses infeccions víriques així com reaccions adverses a vacunes (24).

El reconeixement dels àcids nucleics vírics per part dels receptors de reconeixement de patrons (PRR)'s intracel·lulars com els RLR o els TLR-3, -7, -8 i -9, presents a les membranes dels endosomes inicien cascades de senyalització, que inclouen l'activació dels factors de transcripció reguladors dels gens dels IFNs factors alliberadors d'interferó (IRF) i promouen l'expressió dels gens que codifiquen per als IFNs.

La infecció de cèl·lules humanes per part de SARS-CoV-2 indueix l'expressió i l'alliberament de IFN-I per diferents vies de reconeixement i senyalització intracèl·lular:

- ➔ **Síntesi d'IFNs per activació de RIG-1 o MDA5:** Quan el receptor MDA5 (de l'anglès *melanoma differentiation-associated gene 5*) o RIG-1 (de l'anglès *RNA helicase retinoic acid-inducible gene 1*) s'uneixen a l'RNA del SARS-CoV-2 present al citosol de les cèl·lules epitelials de pulmó, s'activa la cascada de senyal fins a l'estimulador del promotor d'IFN beta 1 (IPS-1) (25,26)
- ➔ **Síntesi d'IFNs per activació de TLRs:** L'RNA del SARS-CoV-2 també pot unir-se a TLR3 (per TICAM1) activant IRF3, o a TLR7 (per MyD88) activant NF- κ B (27,28). RNA pot també unir-se a TLR7 i TLR8 per induir que pDC, cèl·lules epitelials bronquials i endotelials, i pneumòcits alveolars produeixin IFN-I (29,30).

Els IFN-I tenen un efecte principalment paracrí sobre cèl·lules veïnes no infectades i un efecte autocrí per inhibir la replicació del virus a la pròpia cèl·lula productora de IFN. Mitjançant els receptors d'IFN-I (heterodímer format per dos polipèptids IFNRA1 i IFNRA2 que s'expressa a totes les cèl·lules nucleades) s'activen les vies de

senyalització intracèl·lulars (mitjançant STAT1 i STAT2) i l'activació del factor de transcripció IRF9, que activa l'expressió dels gens estimulats per IFN (ISG) (31,32).

Els IFNs juntament amb IL-6 i TNF- α indueixen l'expressió d'ISG que participen en diferents mecanismes de la defensa front els virus:

- ➔ **Inducció de l'estat antiviral:** Indueix l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes que confereixen a la cèl·lula un estat de resistència a la infecció: proteïna quinasa serina treonina activada per RNAs, que impedeix la transcripció i traducció RNA viral, 2' 5' oligoadenilat sintasa i RNAsa que degrada el RNA víric
- ➔ **Inducció de CD69 i retenció dels limfòcits als limfonodes:** L'increment de l'expressió de CD69 promou la retenció del receptor d'esfingosina-1-fosfat (S1P) als endosomes del limfòcit. Això evita que el limfòcit, que es troba a l'interior dels limfonodes, sigui sensible al gradient de S1P, quedant retingut. Així es facilita el reconeixement antigènic dels limfòcits als òrgans limfoides secundaris.
- ➔ **Potenciació de la RII i RIA front infeccions intracèl·lulars:** Els IFN-I incrementen la citotoxicitat cèl·lular de les cèl·lules NK i LT citotòxics (CD8+) i promouen la polarització dels LT naif cap a Th1.
- ➔ **Increment de l'expressió de MHC-I:** Els LT CD8+ reconeixen de pèptids derivats dels virus presentats per molècules MHC-I a la superfície de les cèl·lules infectades mitjançant el seu receptor de cèl·lula T (TCR). Quan els IFN-I augmenten l'expressió de molècules MHC-I, afavoreixen que les cèl·lules infectades presentin pèptids derivats dels virus, i faciliten que aquests puguin ser reconeguts per TCRs específics, activant els mecanismes citotòxics que promouen la mort de les cèl·lules infectades.

Alteracions dels IFNs en COVID-19

Els tres coronavirus epidèmics, SARS-CoV-2, MERS-CoV i SARS-CoV indueixen nivells molt més baixos d'IFN-I que els coronavirus comuns, causant infeccions

benignes. Fet que suggereix que la capacitat de disminuir la inducció d'IFN és un component clau de la virulència de SARS-CoV-2 (33,34). Quan SARS-CoV-2 infecta les primeres cèl·lules del teixit, aquestes no produeixen els nivells d'IFNs necessaris per activar l'expressió dels gens de resposta a IFNs a les altres cèl·lules epitelials pulmonars, i el virus no troba resistència a la infecció de cèl·lules veïnes. Les cèl·lules infectades moren per piroptosi i s'alliberen citocines i quimiocines proinflamàtores per promoure el reclutament de neutròfils (35,36). Com un dels efectes de l'acció dels IFNs és evitar que els neutròfils entrin als pulmons i els que hi arribin activin l'apoptosi, la deficient producció i senyalització d'IFNs fa que els neutròfils s'acumulin als pulmons i participin del mecanisme fisiopatològic.

Macròfags:

Els PRRs en els macròfags reconeixen les estructures del virus (PAMPs) i proteïnes intracèl·lulars alliberades per cèl·lules mortes o proteïnes de xoc tèrmic alliberades després del dany cèl·lular (DAMPs). Això induïx la seva activació (37). En el cas de la infecció per SARS-CoV-2, l'activació de RII es produeix per el reconeixement del RNA viral i els fosfolípids de membrana. La infecció dels macròfags, cèl·lules epitelials i endotelials per SARS-CoV-2, promou que les estructures del virus presents al citoplasma siguin reconegudes per l'inflamosoma i activin la caspasa-1 que dona lloc a les formes bioactives IL-1 i IL-18 per ser alliberades a l'espai extracèl·lular. Els receptors TLR-3, -7, -8 i -9 reconeixen l'RNA viral present al compartiment endosomal, i la unió al seu lligand activa vies de senyalització intracèl·lular que activen NF- κ B. Aquest factor de transcripció promou l'expressió de gens que codifiquen per diferents citocines proinflamàtores (TNF, IL6 i IL12), quimiocines (IL8, MCP-1 i RANTES), molècules d'adhesió (E-selectina), molècules co-estimuladores (CD80/CD86) i citocines antivirals (IFN α/β) (38).

Després de l'activació dels macròfags residents al teixit infectat es produeix la infiltració de neutròfils, atrets per la IL-8 i, paral·lelament, es

produeixen citocines proinflamàtòries que estimulen l'adhesió endotelial, afavorint la diapedesi de més neutròfils, monòcits, CD i cèl·lules NK al lloc de la infecció (35).

Alteracions dels macròfags en COVID-19: (36) Mentre que els monòcits a la sang de pacients amb COVID-19 moderat presenten un fenotip inflamatori impulsat pel ISG, en els casos greus de la malaltia, hi ha disfunció cel·lular deguda a la pèrdua d'expressió HLA-DR i la inducció de l'expressió d'alarmines. Els macròfags pulmonars de COVID-19 derivats de la infiltració de monòcits inflamatoris es troben en un estat hiperactivat que resulta en un bucle d'alliberament de citocines proinflamàtòries i el reclutament de cèl·lules efectores citotòxiques, agreujant així el dany dels teixits al lloc de la infecció.

Neutròfils i NETosis:

Els neutròfils són els primers en migrar des dels vasos cap als teixits quan es produeix una infecció. Juntament amb els altres mecanismes efectors de la RII contenen la infecció fins que s'activa la RIA. Un dels mecanismes efectors dels neutròfils és la fagocitosi. El reconeixement i la unió als patògens té lloc mitjançant diversos PRRs, el que permet la seva fagocitosi i en el fagosoma, agents antimicrobians, espècies reactives de l'oxigen (ROS) i els enzims bactericides dels grànuls citoplasmàtics, destruiran als patògens. Un altre mecanisme efector és la degranulació, que consisteix en alliberar el contingut dels grànuls a l'espai extracel·lular. Finalment, els neutròfils poden donar lloc a trampes extracel·lulars de neutròfils (NETs) que atrapen els patògens a l'espai extracel·lular permetent la seva eliminació, però que alhora causen la mort del neutròfil. Fisiològicament, la NETosis a les vies respiratòries contribueix a la protecció contra la infecció ja que incrementa la viscositat del moc i afavoreix la destrucció dels patògens (37). Tot i que les NET tenen activitat microbicida, el seu alliberament sostingut també pot desencadenar la inflamació del teixit o mantenir-la en el temps.

Neutròfils i NETs en COVID-19:

Els pacients amb COVID-19 que desenvolupen SDRA, presenten nivells més alts de neutròfils en plasma i al rentat broncoalveolar (38,39). També tenen gran infiltració de neutròfils als pulmons que en activar-se pel reconeixement del virus i les citocines IL-8 i IL-1 β , produïdes per les cèl·lules epitelials pulmonars i macròfags durant la resposta a la infecció, generen estrés oxidatiu, alliberen proteases i formen NETs que danyen el teixit (40). Els macròfags alveolars reconeixen el DNA alliberat durant la NETosi i alliberen més citocines i quimiocines proinflamatòries que potencien encara més la formació de NETs contribuint encara més a la tempesta de citocines i al manteniment de SDRA.

Quan les NET s'activen a la circulació, indueixen les alteracions de la coagulació i trombosi (41) observades als pacients COVID-19. Les plaquetes activades per la unió de la proteïna S del SARS-CoV-2 poden desencadenar la NETosi intravascular i causar danys i inflamació a l'endoteli mitjançant l'activació del complement, així com afavorir la coagulació i trombosi microvascular (42). Les NETs intravasculares poden unir-se a les parets de vasos, capturar plaquetes i microvesícules i obstruir la circulació. Els enzims i histones alliberades durant la NETosi promouen la mort i pèrdua de funció de cèl·lules endotelials i poden ocluir la microvasculatura i generar dany isquèmic als pulmons (43).

Inflamasoma

L'inflamosoma és un complex multimolecular citosòlic que promou el reconeixement d'estructures de patògens i molècules de l'hoste per part dels macròfags, neutròfils i CD del sistema immunitària innat (44). Son receptors tipus NOD que contenen un domini pirina i es coneixen fins a 14 tipus diferents. La formació d'inflamosomes requereix un PRR que actua com sensor de la infecció gràcies a un domini de reclutament de caspasa.

Quan s'activen monòcits per virus s'activen cascades de senyalització intracèl·lular fins a l'activació del factor de transcripció NF- κ B, que regula l'expressió de l'inflamasoma, la síntesi de citocines proinflamatòries i l'expressió de pro-caspasa-1. Seguidament, té lloc l'activació de l'inflamasoma NLRP3 per oligomerització i la formació del complex multiproteic que conté NLRP3, ASC i la pro-caspasa-1. La procaspasa-1 s'activa formant la caspasa-1 que indueix l'activació proteolítica de pro-IL-1 i pro-IL-18 en IL-1 i IL-18 madures (45,46). La IL-1 β és un potent mediador proinflamatori que participa del reclutament de cèl·lules de la RII al lloc d'infecció i de la modulació de les cèl·lules de la RIA. La IL-18 és un senyal activadora de la producció d'IFN- γ , potència l'activitat citolítica de les cèl·lules NK i LT (47). L'activació de la caspasa-1 elimina el virus mitjançant la inducció de piroptosi (48).

SARS-CoV-2 altera l'activació de l'inflamosoma:

Normalment, l'activació del inflamasoma té un paper protector ja que contribueix a la eliminació del virus en les primeres etapes de la infecció, evitant la progressió a formes greus (49). L'entrada de SARS-CoV2 a les cèl·lules i la replicació al citoplasma altera la integritat de la membrana cel·lular, ja que les porines codificades per el virió formen canals iònics que permeten la sortida de ions K⁺ i l'entrada de Ca²⁺ a l'interior del citoplasma, generant senyals que estimulen l'activació de NLRP3 i generen una producció desmesurada de les citocines proinflamatòries IL-1 i IL-18. Aquestes actuen sobre altres cèl·lules de la RII i promouen una producció excessiva d'altres IL-6, TNF i IL-8 que seran mediadors del desenvolupament del SDRA, insuficiència multiorgànica i coagulopatia (50).

Cèl·lules NK

Les cèl·lules assassines naturals (NK, *Natural Killer*) tenen una capacitat citolítica que no requereix d'un receptor específic de reconeixement antigènic sense expansió ni diferenciació clonal. Representen entre el 5 i el 15% de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, melsa i fetge i no són freqüents a teixits limfoides. Els individus amb

dèficits en el desenvolupament o funció de les NK tenen més probabilitat de contraure malalties víriques (51)

Moltes citocines modulen l'activitat funcional de les cèl·lules NK. Els IFNs i la IL-18 potencien l'activitat NK i promouen la secreció de IFN- γ , mentre que les citocines IL-12 i IL-15 són factors de creixement i diferenciació necessaris per a la supervivència de les cèl·lules NK.

Les cèl·lules NK es divideixen en dos grups: CD56^{bright}, que presenten una major capacitat de producció de citocines, i CD56^{dim}, que presenten una major capacitat citotòxica (52). S'activen per un equilibri entre receptors activadors i inhibidors codificats a la línia germinal (53). En general, els receptors activadors reconeixen lligands a les cèl·lules infectades i els inhibidors lligands de cèl·lules sanes. Cada cèl·lula NK pot presentar un conjunt diferent de receptors i per tant respondre front diferents tipus de patògens que infecten diferents cèl·lules.

Els receptors inhibidors tenen un motiu estructural comú a les cues citoplasmàtiques, el motiu immunoreceptor inhibidor basat en tirosines (de les sigles en anglès ITIM) que recluta i activa fosfatases per eliminar els grups fosfats units a les proteïnes o lípids de les vies de senyalització intracèl·lular, bloquejant la senyalització generada per els receptors activadors. Els lligands dels receptors inhibidors són molècules de HLA-I com HLA-B, HLA-C i HLA-E. Els receptors activadors inclouen receptors de la família de les lectines tipus-C. El seu lligand són les molècules MIC-A i MIC-B que només s'expressen a la superfície de les cèl·lules infectades o tumorals (54). Els receptors activadors presenten a les cues citoplasmàtiques un domini estructural comú, el motiu immunoreceptor activador basat en tirosines (ITAM), amb el que s'activa i recluta altres quinases que s'activen per fosforilació. Per a que la cèl·lula NK s'activi, les senyals intracèl·lulars generades per la unió dels lligands als receptors activadors han de sobrepassar les senyals generades per els receptors inhibidors.

Les cèl·lules NK eviten atacar les cèl·lules pròpies mitjançant el reconeixement de les molècules del MHC. Les cèl·lules tumorals i les infectades per virus redueixen l'expressió de MHC a la superfície per tal d'evadir la resposta específica dels LT citotòxics, però resulta en el reconeixement per part de les cèl·lules NK que portarà a la mort de la cèl·lula tumoral o infectada (55).

Les cèl·lules NK participen de la resposta antiviral mitjançant:

- ➔ **Citotoxicitat cèl·lular dependent d'anticòs (ADCC):** La cèl·lula NK mitjançant el receptor CD16 s'uneix a les regions Fc de les IgG1 i IgG3 unides als antígens vírics en la superfície de les cèl·lules infectades. Així es promou l'activació de la cèl·lula NK i l'alliberament del contingut dels grànuls citoplasmàtics, perforines i granzims, que indueixen l'apoptosi i la mort de la cèl·lula diana.
- ➔ **Perforines:** Proteïnes homologues a la proteïna C9 del complement que faciliten la desestabilització de la membrana citoplasmàtica al formar porus per on poden entrar els granzims a l'interior del citoplasma de la cèl·lula diana.
- ➔ **Granzims:** Tenen activitat serin-proteasa i quan es troben a l'interior del citoplasma de les cèl·lules diana, promouen la proteòlisi i l'inici de l'apoptosi.
- ➔ **Granulolisina:** Altera la permeabilitat de les membranes de les cèl·lules diana.
- ➔ **Activació de macròfags:** Les cèl·lules NK activades alliberen IFN- γ que activen els macròfags i la seva diferenciació cap a un perfil inflamatori. Aquests macròfags tenen més capacitat per fagocitar i destruir patògens a l'espai extracèl·lular, expressen més receptors d'opsonines i produeixen més espècies reactives d'oxigen
- ➔ **Polarització Th1:** Mitjançant la producció i alliberament de IFN- γ , les cèl·lules NK promouen la polarització dels LT naif als limfonodes cap a la diferenciació a Th1.

SARS-CoV-2 afecta al nombre, el fenotip i la funció de les cèl·lules NK

Les cèl·lules NK representen el 10-20% de les cèl·lules limfoides pulmonars. Aquí, les cèl·lules NK madures son CD56dim amb una elevada capacitat citotòxica. Però donat que l'entorn pulmonar és anti-inflamatori, les cèl·lules NK presenten un llindar d'activació elevat i requereixen de la secreció adequada d'IFN-I per a la seva activació (56). SARS-CoV-2, com els coronavirus epidèmics anteriors, interfereix en la producció i la senyalització dels IFNs impedit l'activació de les cèl·lules NK (57,58).

S'ha descrit que la infecció per SARS-CoV-2 redueix el nombre de cèl·lules NK i aquesta reducció es correlaciona directament amb la gravetat de la malaltia i (48). A més a més, les cèl·lules NK que expressen perforina i les CD56bright es troben disminuïdes als pacients COVID greus (59,60).

En els pacients COVID-19, l'expressió de CD39, enzim de superfície que inhibeix a les NK, esta augmentada a la sang i el PD1, un altre receptor inhibidor, augmenta a les cèl·lules NK (61). Però l'expressió de NKG2D, es troba disminuïda (62). En conjunt, el virus evadeix l'activitat antiviral de les cèl·lules NK i s'expandeix augmentant l'expressió dels receptors inhibidors i els seus lligands, i reduint l'expressió dels activadors (63).

Immunitat humoral: El sistema del Complement

El sistema de complement es pot activar a través de tres vies diferents(64). Això inicia la cascada d'activació del complement que promou la producció d'anafilatoxines i la formació del complex d'atac a la membrana (MAC) (65). El MAC es el mecanisme efector del complement que promou la lisi cèl·lular del patogen (66,67).

➔ **Via clàssica:** el complement s'activa mitjançant la unió de C1q a la regió Fc de IgG o IgM quan es troben unides a la superfície dels patogens.

- ➔ **Via de les lectines:** aquesta via utilitza MBL, que són receptors homòlegs a C1q i tenen la capacitat de reconèixer molècules sobre la superfície dels patògens, distingint-los de les cèl·lules de l'hoste.
- ➔ **Via alternativa:** l'activació es produeix sense anticossos o contacte previ amb un patògen. Té lloc espontàniament i mitjançant la regulació per proteïnes inhibidores s'evita l'activació aberrant (68).

El sistema del complement al COVID-19

Les proteïnes S i N de SARS-CoV-2 activen el complement mitjançant la via de les lectines per la unió directa de MBL. La proteïna S també activa el complement per la via alternativa (69,70), fet que s'ha associat amb l'increment de diferents marcadors de coagulació, com el Factor de Von Willebrand, i marcadors de lesió endotelial com la trombomodulina i la angiopoietina-2 que són trets característics de pacients greus. A més, C5a participa en la lesió pulmonar incrementant l'arribada de monòcits i neutròfils al teixit pulmonar (71). C5a s'uneix al seu receptor present als neutròfils i activa la formació de NETs als pacients COVID-19 (72). En conjunt, l'activació del complement participa en el mecanisme del SDRA als pacients amb COVID-19 greu.

Cel·lules Dendrítiques

Les CD són cèl·lules derivades de la medulla òssia que es distribueixen a la perifèria com a CD immadures. Quan les CD immadures són activades per un patògen via PRR, s'inicia un procés de maduració, que consisteix en la secreció de citocines i l'expressió de molècules superficials, com el MHC i les molècules co-estimuladores i altres receptors. L'expressió d'aquestes molècules permet a les CD obtenir la capacitat de migració i coestimulació.

La RII participa de l'activació de la RIA mitjançant la presentació antigènica dels pèptids vírics mitjançant les molècules de MHC-I i MHC-II. Les cèl·lules infectades i els neutròfils presenten pèptids citosòlics mitjançant les molècules MHC classe I (MHC-I).

Els macròfags i les CD expressen tant molècules MHC-I com MHC-II. Els pèptids citosòlics s'expressen a les MHC-II i els pèptids derivats de la fagocitosi dels virus mitjançant MHC-II. A més, les CD activades expressen les molècules co-estimuladores necessàries per activar els LT madurs naif.

Cèl·lules dendrítiques i COVID-19

La proteïna S, especialment el domini d'unió al receptor (RBD) pot induir la maduració i l'activació de les CD.(73) Però, en els pacients COVID-19 s'ha observat una reducció persistent de totes les subpoblacions de CD. Hi ha un augment de la freqüència de cèl·lules CD163+ CD14+ dins de les CD en pacients amb malaltia més greu que s'ha associat amb inflamació sistèmica. També hi ha una reducció persistent de la molècula costimuladora CD86 i un augment de PD-L1 associats amb una capacitat reduïda d'estimular LT CD4+naif i es correlaciona amb la gravetat de la malaltia. L'esgotament durador i el deteriorament funcional dels DC i els monòcits poden tenir conseqüències per a la susceptibilitat a infeccions secundàries en els pacients amb COVID-19 (74).

Resposta immunitària Adaptativafront SARS-CoV-2.

La RIA, a diferència de la RII, es compon per cèl·lules que presenten receptors clonals específics de les estructures dels patògens: el receptor de cèl·lula B (BCR) i els TCR, que són generats per recombinació somàtica i selecció clonal. A més la RIA quan es activa genera cèl·lules efectores específiques com les cèl·lules plasmàtiques (CPs), els LTc, i cèl·lules que coordinen i dirigeixen la resposta efectora com elsLTth. Alhora que es produeix l'activació de les cèl·lules efectores,també es generen LT i LB de memòria, que durant una futura resposta secundària, s'activaran més ràpidament per generar cèl·lules efectores, i que en el cas de LB presentaran una majorafinitat en el reconeixement antigènic que durant la resposta primària.

Les cèl·lules de la RIA passen per diferents punts de control durant la seva maduració. Tant en el procés de recombinació somàtica de les LB com LT el punt de control es la

producció correcta i funcional del receptors de membrana BCR i TCR per tal d'eliminar les autoreactives. Adicionalment, els LT estan restringits per MHC, es a dir que el TCR únicament reconeix pèptids presentats per molècules MHC.

Els principals mecanismes efectors de la RIA front virus son els anticossos i LT citotòxics (LTc). Els anticossos neutralitzen el virus lliure per evitar l'entrada a les cèl·lules de l'hoste i promouen la seva eliminació mitjançant la fagocitosis de les partícules virals opsonitzades. Mentre que la citotoxicitat cèl·lular dependent d'anticossos i les LTc eliminen les cèl·lules infectades mitjançant la inducció d'apoptosi.

Limfocits B i subtipus

Existeixen tres subtipus segons el teixit d'origen, la diversitat del BCR i el tipus d'antigen que reconeixen. Els LB-1 s'originen a partir de la cèl·lula mare hematopoètica del fetge fetal i es mantenen com una població amb capacitat d'auto-renovació localitzada principalment a mucoses i teixit peritoneal. Expressen un BCR amb una diversitat limitada, i que reconeix antígens timus-independents com son lípids i polisacàrids. Els LB-1 tenen la capacitat de secretar espontàniament anticossos IgM que es produeixen sense immunització prèvia i que podrien participar en la regulació de la tempesta de citocines i en impedir la ràpida expansió de SARS-CoV-2 mitjançant la neutralització del virus en les primeres fases de la infecció (75,76). Els Limfòcits B de la zona marginal (LB-2z) s'originen a partir de la cèl·lula mare hematopoètica de medul·la òssia i es localitzen prop del sinus marginal de la melsa i als òrgans limfoides secundaris, fora dels fol·licles. Expressen un BCR amb una diversitat limitada, els anticossos naturals, que reconeix antígens timus-independents, com son lípids i polisacàrids. Poden diferenciar-se encèl·lules plasmàtiques de vida curta i secretar IgM, participant en la resposta T-dependent. Els Limfòcits B fol·liculars (LB-2f) produeixen anticossos amb gran diversitat mitjançant la recombinació somàtica dels gens de les immunoglobulines. Poden generar LB de memòria (LBmem). Interactuen amb els Th

per formar els CG on maduren la afinitat del BCR mitjançant el procés d'hipermutació somàtica. Els LB madurs naif expressen a la membrana IgM i IgD, i en ser activats poden canviar la classe de immunoglobulina per els senyals de citocines polaritzants que rebin dels LT per produir IgA, IgG o IgE d'alta afinitat.

Activació dels LB i producció d'anticossos

El procés d'activació dels LB durant la resposta immunitària al teixit limfoide associat a mucoses (MALT), s'inicia amb el reconeixement de l'antigen per part del BCR del LB madur naif. Aquest antigen promou l'activació del LB i la seva migració a la zona folicular del limfonode proximal o del MALT. Allà es on el LB prolifera i forma el CG (CG) (77). Dins el CG els LB competeixen per els senyals co-estimuladors dels LT col·laboradors foliculars (LThf) específics per al mateix antigen, per les citocines i per la unió al lligand de CD40 expressant al LThf. Els LB que rebin aquest senyal migraran de la zona clara a la zona fosca del CG (78) on es dona l'hipermutació somàtica, (79,80) i s'acumulen mutacions al DNA de les immunoglobulines. Posteriorment es seleccionen els LB amb els BCR de major afinitat i aquests seguir dos camins de diferenciació: LB memòria o CP productora d'anticossos (81,82).

Els LB memòria recirculen per els teixits perifèrics i la sang durant anys. Quan tornen a activar-se per el mateix antigen (83,84) es diferencien ràpidament a CP (85). A les mucoses i als pulmons es manté una població de LB memòria residents que s'associen amb una immunitat protectora front a la infecció per SARS-CoV-2. En canvi, les CPs son una població diferenciada terminal que no poden tornar a formar un CG i es mantenen a la medul·la òssia durant anys, i des d'on secreten grans quantitats d'anticossos específics per la ràpida neutralització dels patògens (86,87).

La immunitat humoral induïda per la infecció o per la vacunació, permet el bloqueig de la infecció i la disseminació del virus en la seva forma extracel·lular, però una vegada el virus entra a les cèl·lules diana i es replica al seu interior, els anticossos no poden unir-se i per tant el virus escapa dels principals mecanismes efectors dels anticossos.

Els anticossos que es produeixen per la col·laboració entre els LB i LT als CG dels òrgans limfoides secundaris front als antígens T-dependents amb elevada afinitat, poden canviar la classe de IgM a IgG o IgA. Els antígens T-dependents poden generar LB memòria. Aquests són els més efectius en l'eliminació de les formes extracèl·lulars dels virus.

Taula 1. Classes i funcions de les Immunoglobulines.

Classe d'anticòs	Funció efectora específica front infeccions viriques
IgG	Opzonització dels antígens i fagocitosis de macròfags i neutròfils.
	Activació de la via clàssica del complement.
	Citotoxicitat dependent d'anticòs (ADCC).
	Immunitat materno-fetal, transferència d'anticossos a través de la placenta i el tracte digestiu.
	Inhibició de l'activació de LB.
IgM	Activació de la via clàssica del complement.
	Receptor de membrana dels LB naif.
IgA	Immunitat de les mucoses, secreció de IgA al llum del tracte respiratori i gastrointestinal.
	Activació del complement per la via alternativa i de les Lectines.
IgE	Degranulació de mastòcits, reaccions d'hipersensibilitat immediata.
IgD	Receptor de membrana dels LB naif.

Les funcions efectoras dels anticossos estan determinades per les regions constants de la cadena pesada (Taula 1.). De manera que les diferents cadenes pesades de les diferents classes de immunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgE i IgD, promouran diferents funcions efectoras en la resposta front els virus.

Receptors Fc de Immunoglobulines i Funcions efectoras

Els receptors de les regions Fc dels anticossos s'expressen als leucòcits i uneixen les regions constants de les cadenes pesades de les immunoglobulines. Aquests receptors, en unir el seu lligand, promouen l'activació de la funció efectora a la cèl·lula. Existeixen diferents tipus de receptors Fc:

- ➔ **FcεR:** Els FcεR s'uneixen a la cadena pesada de IgE i indueixen la degranulació de basòfils, mastòcits i eosinòfils en les reaccions d'hipersensibilitat.
- ➔ **FcRn:** S'expressen a la placenta, a les cèl·lules epitelials intestinals i l'endoteli vascular i intervé en el transport de IgG a través de la barrera hemato-placentària, i de la transferència de la IgG materna a través de l'intestí dels neonats. En adults el FcRn contribueix a augmentar la vida mitja de la IgG.
- ➔ **Receptor Poli-Ig:** S'expressen a la membrana basal i lateral de les cèl·lules epitelials de les mucoses i participa en el transport de la IgA produïda per les CPs de la lamina pròpia dels teixits mucosos cap al llum de la mucosa.
- ➔ **FcγR:** Reconeixen la regió constant de la cadena pesada de la IgG quan està unida a l'antigen. La transducció del senyal a l'interior del citoplasma té lloc mitjançant la cadena α citoplasmàtica dels receptors FcRs que presenten dominis ITAM o ITIM. Els FcγR es classifiquen en tres grups segons la seva afinitat per la regió constant de la cadena pesada de la IgG: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) i FcγRIII (CD16).

Funcions efectores dels anticossos

Els anticossos col·laboren en la resposta a les infeccions víriques a través de diferents mecanismes efectors:

- ➔ **Neutralització:** Els anticossos que s'uneixen a les molècules de reconeixement i unió del virus amb la cèl·lula diana. Així interfereixen en la capacitat del virus per interaccionar amb els receptors cèl·lulars i poden impedir la infecció de les cèl·lules. Aquests anticossos poden neutralitzar els virus en les dues etapes extracèl·lulars, tant prevenint la infecció com la disseminació del virus dins dels teixits de l'hoste. Els anticossos de la classe IgA secretats a les mucoses són importants en la neutralització de l'entrada del virus a través de les mucoses dels teixits respiratoris i tracte digestiu. En el cas dels virus respiratoris, les vacunes orals permeten la generació d'immunitat a les mucoses al·linduir la producció

d'anticossos neutralitzants de la classe IgA que poden evitar la infecció de l'individu. La neutralització es la única funció que no està mediada per la regió Fc de l'anticòs.

- ➔ **Opsonització:** Els anticossos de la classe IgG recobreixen la superfície de les partícules virals i activen la fagocitosi i l'eliminació dels virus via FcR.
- ➔ **Activació del complement:** IgG i IgM en unir-se als antígens presents a la superfície dels virus, poden iniciar la via clàssica d'activació del complement.
- ➔ **Citotoxicitat cèl·lular dependent d'anticòs (ADCC)** (Veure pag.21).

Resposta de LB i anticossos en la infecció per SARS-CoV-2:

La infecció per SARS-CoV-2 indueix una resposta humoral robusta en la majoria de les persones infectades (Fig.5) (88,89). Tanmateix, els nivells d'anticossos sèrics produïts contra SARS-CoV-2 poden variar entre els individus i els seus nivells canvien amb el temps. Els anticossos específics front les proteïnes de SARS-CoV-2 es detecten després de 4 a 7 dies des de l'aparició dels símptomes (90,91), i la majoria dels pacients es sero-converteixen dins dels 21 dies posteriors a l'aparició dels primers anticossos (92). Durant les primeres 2-5 setmanes la majoria de les infeccions primàries per SARS-CoV-2 s'observa un pic d'anticossos específics del virus (91,92). Tot i que els nivells màxims d'anticossos poden variar fins a 200 vegades entre diferents pacients (93). En general s'observa una disminució dels nivells d'anticossos d'entre 5 i 10 vegades als 5 mesos (95). La disminució varia segons l'isotip, la especificitat de l'antigen viral reconegut i la edat del pacient (96,97). Els anticossos IgM i IgA disminueixen més ràpidament i esdevenen indetectables després de 3 mesos (98,99) mentre que els anticossos IgG disminueixen a un ritme més lent. Els anticossos generats front els diferents antígens virals com la proteïna N, el domini RBD o la proteïna S presenten cinètiques diferents. Els anticossos anti-N disminueixen més ràpidament que els anti-S o anti-RBD. En la majoria de les infeccions, la semivida mitjana estimada d'IgG, IgM i IgA1 anti-S és de 14 a 33, 8 i 6 setmanes respectivament

(100). De mitjana, l'anticòs que disminueix més ràpidament és la IgG anti-N, amb una reducció de dos terços dels nivells als 4-9 mesos, moment en el que el 33% dels pacients presenten nivells indetectables. Passat 1 any, gairebé tots els pacients no tenen IgG anti-N detectables (101-102). En canvi les IgG anti-S disminueixen més lentament, disminuint a menys d'un terç dels nivells màxims als 8-10 mesos. Tanmateix, gairebé tots els pacients, entre el 90 i el 97%, presenten nivells de IgG anti-S detectables als 12-13 mesos (103,104).

En canvi, la resposta de LB de memòria específica front SARS-CoV-2 augmenta durant els primers 4-5 mesos després de la infecció (105,106). Les CPs específiques de SARS-CoV-2 es mantenen de manera estable a la medulla òssia entre 7 i 11 mesos després de la infecció, fet que permet que les CPs de llarga vida mantinguin els nivells d'anticòs sèrics durant mesos o anys després de la infecció (106,107)

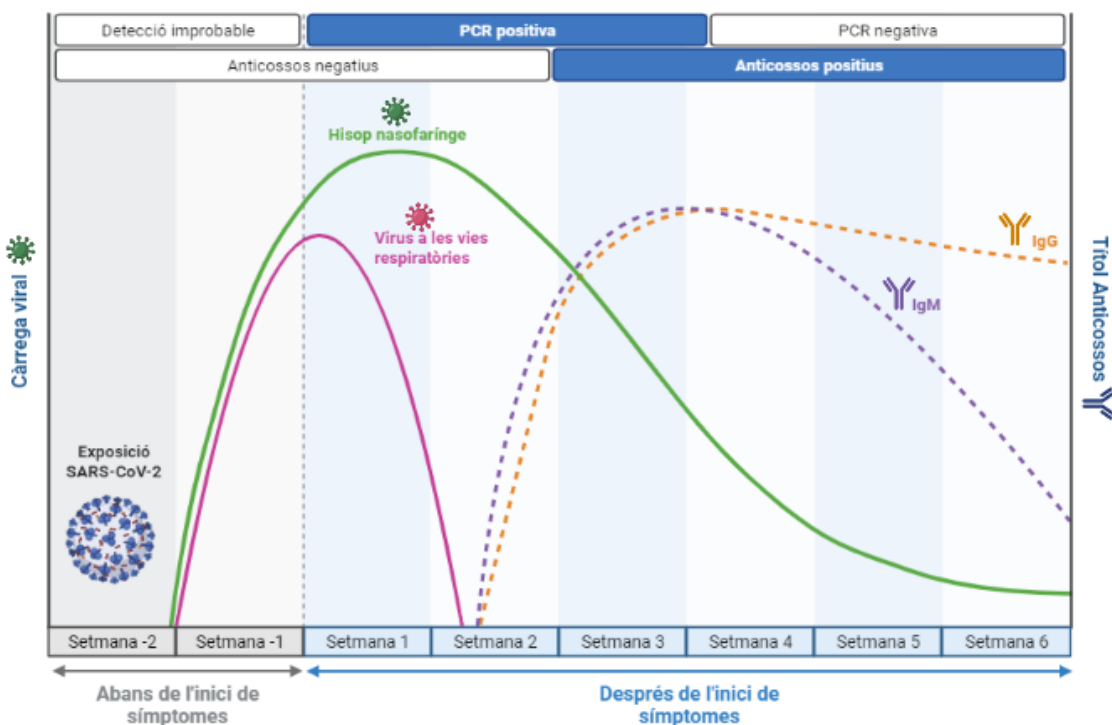


Figura 5.: Càrrega viral i anticòs durant la infecció per SARS-CoV-2. Durant el transcurs temporal de la infecció per COVID, la positivitat de les proves basades en tècniques de biologia molecular d'anàlisi de la presència del RNA de SARS-CoV-2 per PCR o mitjançant determinacions serològiques dels títols d'anticòs. S'observa que les proves de PCR són positives abans en el curs de la malaltia, mentre que les proves serològiques són positives més tard en el curs de la malaltia. Biorender.com

La infecció greu per SARS-CoV-2 en comparació amb els pacients que presenten infeccions lleus, s'associa a una resposta elevada d'anticossos i de LBmem (108,109). Possiblement el fet que els individus amb una evolució greu de la infecció generen una resposta de LB extrafol·liculars, es relaciona amb un augment dels nivells de citocines proinflamatòries i un avançament en el temps dels títols alts d'anticossos neutralitzants (110). S'ha descrit que alguns pacients amb curs greu de la infecció no poden formar CG funcionals, donat que presenten una disminució del nombre de LThfals ganglis limfàtics proximals i a la melsa (111). Aixó condueix a nivells baixos d'hipermutació somàtica als LB activats.(112,113,114).

Els limfòcits T

Els LT participen en l'eliminació de les infeccions intracèl·lulars i la coordinació de la resposta immunològica mitjançant l'activació d'altres cèl·lules com macròfags i LB. La diferenciació dels LT es un procés dependent de l'expressió del TCR. El reconeixement antigènic i l'activació dels LT naif es dependent de la presentació antigènica per part de les APCs mitjançant molècules MHC de classe I i II. Aquesta presentació antigènica als LTnaif té lloc als teixits limfoides secundaris, i requereix que en el cas dels LTnaif, les CD fagocitin els antígens i els transportin als òrgans limfoides secundaris per on els LTnaif circulen. Una vegada que un LT reconeix un pèptid sobre una molècula MHC en presència de senyals co-estimuladors, s'activarà i polaritzarà la seva funció efectora segons la combinació de citocines que rebi durant el procés d'activació.

Presentació antigènica als LT.

Les vies de processament antigènic generen pèptids a partir de proteïnes citosòliques o de l'espai extracèl·lular presentats als LT sobre molècules MHC (Fig. 6). Les molècules MHC de classe I s'expressen a totes les cèl·lules nucleades de l'organisme i presenten pèptids originats al citosol, tant pèptids propis com de patògens intracèl·lulars. Es componen d'una cadena α polimòrfica, associada a una cadena β 2-microglobulina. Participen de la presentació antigènica als LTc, la molècula CD8 dels

LTc s'uneix al domini α -3 de la MHC-I i estabilitza el complexe mentre el TCR reconeix el pèptid carregat a la molècula MHC-I. Les molècules de MHC de classe II s'expressen a les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) tenen dues cadenes, α i β i es sintetitzen al reticle endoplasmàtic. Participen en la presentació de pèptids provinents de l'espai extracèl·lular als LTh, la molècula CD4 s'uneix al domini β 2 de la MHC-II i estabilitza el complexe mentre el TCR reconeix el pèptid carregat a la molècula MHC-II.

➔ **Via endògena i presentació antigènica MHC-I:** Els pèptids presentats per les molècules MHC classe I es generen per la proteòlisi citoplasmàtica de proteïnes pròpies o de patògens intracèl·lulars després de passar pel proteasoma o mitjançant proteases citoplasmàtiques. Els pèptids generats, de 8 a 16 aminoàcids de longitud, són transportats a l'interior del RE mitjançant un transportador on entrarà en contacte amb les molècules MHC-I. Després els complexespèptid-MHC-I són transportats mitjançant vesícules exocítiques a la membrana plasmàtica.

➔ **Via exògena i presentació antigènica MHC-II:** Els pèptids presents a l'espai extracèl·lular, són internalitzats mitjançant endocitosi, pinocitosi o fagocitosi a les APCs. Al compartiment endosomal es formen fago-lisosomes on té lloc la proteòlisi de les proteïnes extracèl·lulars, i la seva càrrega sobre les molècules MHC-II. Al final del procés, els complexespèptid-MHC-II són transportats mitjançant vesícules exocítiques a la membrana plasmàtica.

També hi ha d'altres mecanismes de presentació antigènica com cross-presentació d'antígens fagocitats via MHC-I (antígens fagocitats es presenten via MHC-I als LTh) i la presentació d'antígens citosòlics via MHC-II (mitjançant la autofàgia, els antígens s'envolten de membrana pròpia d'estructures cel·lulars)(115,116).

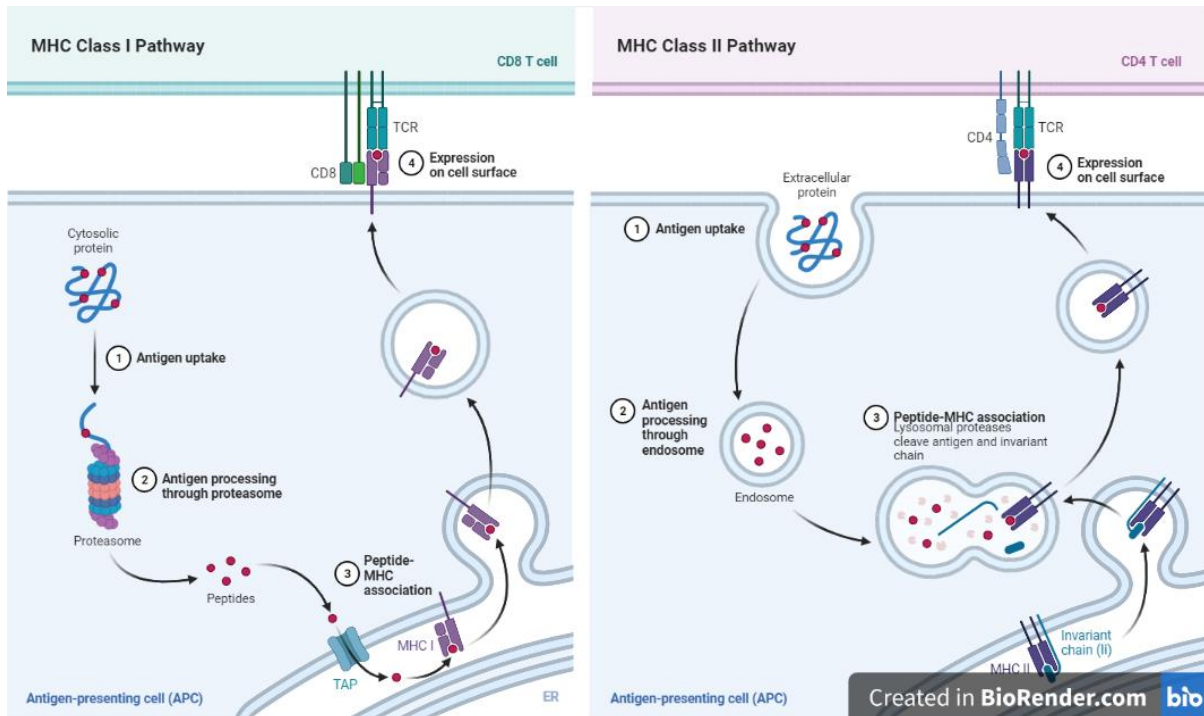


Figura 6. Vies de presentació antigènica a LT. Els pèptids associats a molècules MHC-I es generen per la proteòlisi citoplasmàtica de les proteïnes presents al citosol cel·lular, es transporten a l'interior del RE on s'uneixen a les molècules MHC-I. Els pèptids associats a molècules MHC-II es generen per la degradació proteolítica als fago-lisosomes, i posteriorment s'uneixen a les molècules MHC-II. Imatge estreta de: Biorender.com

Les diferents vies de processament antigènic promouen l'activació i la polarització de la RIA, així els antígens derivats de proteïnes dels patògens extracel·lulars activen principalment la resposta dels LTh que s'activen i sintetitzen citocines. Aquestes polaritzen la resposta del sistema immunitari per tal d'afavorir els mecanismes fagocítics i d'anticossos efectius front els patògens extracel·lulars. Mentre que els pèptids antigènics derivats dels patògens intracel·lulars, com els virus, seran reconeguts per els LTc, que s'activen i es dirigeixen cap als teixits infectats i en reconèixer el complex pèptid-MHC-I a una cèl·lula infectada, activen els mecanismes citotòxics i promovent la mort de la cèl·lula infectada. Amb la cross-presentació antigènica s'incrementa la capacitat de la RIA, de manera que front els

patògens extracèl·lulars també s'activaran els LTc i front els intracèl·lulars també s'activaran els LTh. En conjunt l'activació dels LT depèn del tipus de patògen, de les senyals co-estimuladores i de citocines que reben durant la seva activació.

Activació i polarització dels LTh.

Els LTh naif recirculen a través de la sang i els òrgans limfoides secundaris i entren als limfonodes per les vècules d'endoteli alt (HEV) on sense els antigens presentats per les APCs, si no troben cap antígen que sigui reconegut específicament per el seu TCR, surten per els vasos limfàtics eferents fins un altre limfonode seguint el gradient de S1P (117).

Per a l'activació dels LTh es requereixen 2 senyals: la primera senyal consisteix en el reconeixement específic del pèptid-MHC a la APC per part del TCR del LT. El reconeixement específic dels pèptids presentats per les CD fa que els LTh naifs'activin i s'expandeixen clonalment. El TCR emet senyals intracèl·lulars que portaran a un increment transitori de CCR7 que permet al LT ser sensible als gradients de citocines CXCL-19 i -21, i l'expressió de CD69, que impedeix l'expressió del receptor de S1P en la membrana. Aquests canvis promouen que el LT incrementi el temps que permanència al limfonode mentre té lloc l'activació, proliferació i diferenciació del LT activat (118-119). Si el LT no rep cap altre senyal, no s'activarà ni proliferarà completament i entrarà en un estat d'anergia. Després, si rep altres senyals per molècules com CD28 (molècula co-estimuladora) o CTLA-4 (molècula co-inhibidora), les integrarà. Si els senyals co-inhibidors superen els senyals co-estimuladors, el LT no s'activarà i entrarà en un estat insensible a l'antigen d'anergia o de tolerància. Però si els senyals co-estimuladors superen els senyals co-inhibidors, el LT proliferarà i es diferenciarà en una cèl·lula efectora.

A banda dels dos senyals necessaris per activar-se, els LTh requereixen d'un tercer senyal proporcionat per citocines i que polaritza la seva diferenciació funcional (Fig.7). Durant la presentació antigènica, les CDs alliberen citocines que promouen la

polarització de la diferenciació dels LTh naif en diferents tipus funcionals que determinen la orientació i el tipus de resposta immunitària. Les citocines produïdes per cada tipus de LTh participen en la coordinació de la resposta front els diferents patògens.

➔ **Th1.** Les citocines IFN- γ , IL-12 i IL-18 produïdes per CD, macròfags i cèl·lules NK en resposta a patògens intracèl·lulars i virus activen els factors de transcripció T-BET, STAT-1 i STAT-4 que promouen la polarització de la diferenciació dels LTh naif cap a Th1. Els LTh1 produeixen IFN- γ que: promou la polarització LTh1 i inhibeix la LTh2, activa els macròfags per a que eliminen més eficientment els patògens intracèl·lulars, activa l'enzim NADPH oxidasa, incrementa la generació d'espècies reactives d'oxigen i l'expressió d'enzims lisosomals, promou la síntesi de TNF, IL-1 i IL-12, i augmenta l'expressió de molècules co-estimuladors. Els LTh1 participen de l'activació dels LTc via IFN- γ i expressen CD40L. La seva unió d'aquesta molècula amb el CD40, fa que la CD produïxi el IFN- γ necessari per a l'activació dels LTc naif específics d'antigen. Els LTh1 també alliberen TNF α i participen de l'activació dels neutròfils i promouen la inflamació.

➔ **Th2.** La IL-4 produïda per les CD en resposta a helmints, activa els factors de transcripció STAT-6 i GATA-3 que promouen la diferenciació a LTh2. Els Th2 produeixen IL-4, IL-5 i IL-13. La IL-4 juntament amb IL-13 promouen el canvi de classe dels anticossos per a la producció d'IgE. Incrementen la renovació i la síntesi de moc per les cèl·lules epitelials de les mucoses, així com el peristaltisme de l'intestí. La IL-5 mobilitza i activa els eosinòfils, els basòfils i els mastòcits coordinant la resposta front els paràsits helmíntics (120). La IL-4 i la IL-13, promouen l'activació alternativa dels macròfags que participen de la reparació del teixit.

➔ **Th17.** Les IL-1 i IL-6 i IL-23, produïda per les CD en resposta a bacteris extracèl·lulars i fongs, activa els factors de transcripció STAT-3 i ROR- γ t que

promouen la polarització a LTh17. Els Th17 produeixen IL-17A, IL-17F i IL-22. La IL-17 potència la resposta inflamatòria del RII, ja que promou la síntesi de TNF α , IL-1 i IL-6. També promou la síntesi d'IL-8 que atreu als neutròfils al lloc d'infecció i promou la síntesi de G-CSF que afavoreix la generació i maduració dels neutròfils. La IL-22 promou la funció barrera dels epitelis a les mucoses, la síntesi de defensines i pèptids anti-microbians.

- ➔ **Th9.** El TGF- β juntament amb la IL-4 produïda per les CD en resposta a paràsits, activa els factors de transcripció STAT-6 i SMADS que promouen la diferenciació a LTh9. Els Th9son abundants a la pell i a les mucoses on produeixen IL-9.
- ➔ **Th22.**La IL-6 i el TNF α produïda per les CD activa el factor de transcripció AHR que promou la diferenciació a Th22. Les cèl·lules Th22 presenten receptors de localització epitelial, i participen de la síntesi d'IL-22 (121,122).
- ➔ **Thf.**La IL-6 activa els factors de transcripció STAT-3 i Bcl-6 que promouen la diferenciació a LThf (123). Aquesta diferenciació es un procés que requereix 2 APCs, primerament la CD promou l'inici de la diferenciació i el LB activat completa la maduració mitjançant la síntesi d'IL-6 i el lligand de ICOS. Els LThf col·laboren amb els LB durant la reacció de CG, la presentació antigènica per part delLB al LThf, la unió de CD40-CD40L, juntament amb les citocines produïdes per el LThf, activen el canvi de classe de immunoglobulina. La producció d'IFN- γ i IL-21 promou el canvi de classe a IgG, la IL-4 i IL-21 promouen el canvi de classe a IgE i TGF- β promou el canvi de classe a IgA al teixit limfòide de les mucoses (124,125).
- ➔ **Treg.** Conformen una població heterogènia que comparteixen l'expressió del factor de transcripció FoxP3 (126) i el receptor IL-2 d'alta afinitat. En conjunt es consideren cèl·lules queinhibeixen les respostes efectores de LT i LB i a més modulen la RII, participen del manteniment de la auto-tolerància i eviten la autoimmunitat. Mitjançant diferents mecanismes efectors: producció de citocines anti-inflamatòries i reguladores comIL-10, TGF- β i IL-35. Expressen nivells alts d'IL-2R α a la membrana que competeix per la IL-2, factor de creixement i

supervivència essencial per als LTh. Expressen molècules co-inhidores com CTLA-4 i LAG-3 impedit l'activació dels LT auto-reactius (127,128). Poden produir la mort dels LTh auto-reactius mitjançant citotoxines. Expressen i alliberen nucleotidases com CD39 i CD73, que promouen l'anergia dels LT (129,130).

Cadascun dels subtipus de LTh regula els altres mitjançant l'expressió de citocines, les citocines que polaritzen cap a LTh1, alhora inhibeixen la diferenciació a Th2 i Th17 i inhibeixen la producció d'IL-4 i IL-17 (131,132). Els LTh2 inhibeixen la diferenciació Th1 mitjançant la inhibició d'IL-12R β 2 (133).

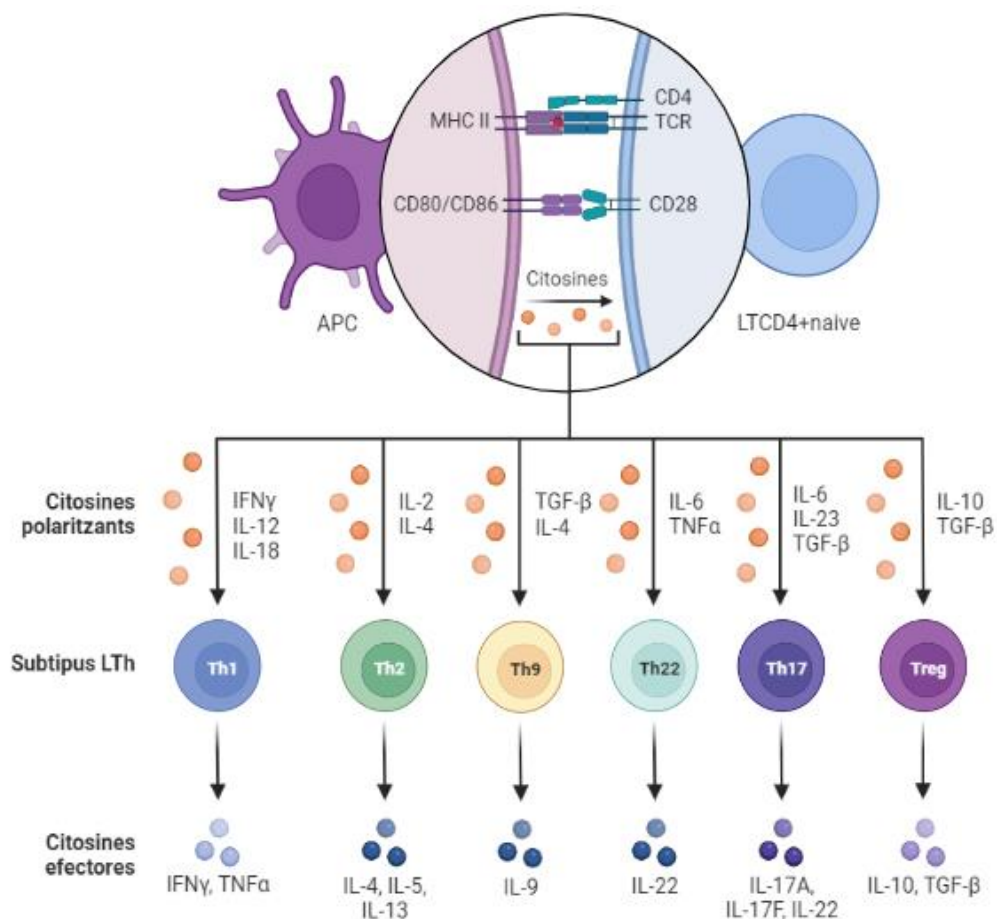


Figura 7. Polarització dels LTh. La diferenciació funcional dels LTh requereix de 3 senyals: 1) reconeixement del peptid-MHC per part del TCR a la superfície de una APC. 2) Senyals co-estimuladors, unió de CD28 del LT amb la molècula CD80/86 de la APC. 3) La unió de les citocines polaritzants al seu receptor sobre la membrana del LTh. Diferents combinacions de citocines promouen la polarització de diferents tipus de LTh que realitzaran funcions efectores diferents. Imatge estreta de: Biorender.com

Activació LTc.

Els LTc participen de la resposta front les infeccions víriques i tumors. Els LTc naif recirculen per els òrgans limfoides secundaris, la seva activació es dependent del reconeixement específic del TCR, i té lloc en dos fases. La primera té lloc als òrgans limfoides secundaris, on una CD presenta els pèptids antigènics sobre una molècula MHC-I que són reconeguts per el TCR del LTc, el que promou la proliferació i la diferenciació funcional del LTc. Una vegada s'ha activat, canvia el seu patró de recirculació, fet que el portarà fins al teixit infectat, on té lloc la segona fase d'activació. Allà, els LTc activats tornen a reconèixer específicament el pèptid antigènic en el context de MHC-I a les cèl·lules infectades per virus i es desencadena l'activació funcional del LTc. L'activació del mecanisme citotòxic promou l'alliberament dels grànuls citoplasmàtics, que contenen perforines, granzims, i l'expressió de CD40L. Fet que produeix la mort de la cèl·lula infectada per el virus.

La activació dels LTc per part de CD als òrgans limfoides secundaris requereix de 3 senyals. El primer senyal, consisteix en el reconeixement específic del complex antigen-MHC-I per part del TCR sobre una CD llicenciada, una CD que presenta incrementada l'expressió de molècules co-estimuladors com CD80/86, i una major capacitat de producció de citocines a l'haver rebut un senyal activador previ be per reconeixement del antigen mitjançant un TLR, o mitjançant la presentació antigen-MHC-II a un Th específic i la unió de CD40-CD40L. El segon senyal, consisteix en la integració dels senyals co-estimuladors i co-inhibidors com es el cas de la interacció de CD28 del LTc i CD80/86 de la CD. En presència de senyals co-estimuladors el LTc s'activa i expressa IL-2 i el IL-2R α d'alta afinitat. El tercer senyal ve donat per les citocines IL-2 i IL-12, que promouen la proliferació i la diferenciació junt amb l'activació dels gens de les perforines i granzims que intervenen en el mecanisme citotòxic efector del LTc. Quan es produeix una infecció en un teixit no limfoide com les mucoses, el sistema digestiu, o el respiratori, s'organitza el teixit limfoide terciari el que promou l'activació dels LTc localment i la generació de LTc memòria resident en el

teixit (134,135). Els LTc memòria, s'activen, proliferen i es diferencien més ràpidament que les naif després de la reexposició al mateix antigen.

Amb l'activació i diferenciació els LTc canvien els receptors de quimiocines i per tant surten a través de la limfa i la sang, fins arribar a l'endoteli vascular activat del teixit infectat (133). Després de l'entrada als teixits, els LTc han de continuar la migració al teixit fins contactar amb les cèl·lules infectades. L'acció citolítica efectora dels LTc requereix del contacte estret amb la cèl·lula diana, de manera que el reconeixement del complex peptid-MHC-I per part del TCR inicia la formació de la sinapsi immunològica que mantindrà les dues cèl·lules unides. El citoesquelet es reorganitza per orientar els grànuls citolítics cap a la zona de reconeixement, es produeixen canvis en la molècula d'adhesió LFA-1 del LTc de manera que adopta una conformació d'alta afinitat per unir el lligand ICAM-1 de la cèl·lula diana (136). Aquesta unió és temporal, fins que es produeix la mort de la cèl·lula diana, llavors el LTc es separa i es dirigeix cap a una altra cèl·lula infectada. Els LTc indueixen l'activació de nucleases a les cèl·lules infectades i promouen la degradació del genoma viral i mitjançant la síntesi de citocines com IFN- γ potencien la fagocitosi de partícules víriques o cèl·lules infectades

Existeixen dos mecanismes citolítics per als quals els LTc poden produir la mort de les cèl·lules infectades:

➔ **Citolisi mediada per granzims i perforines.** El reconeixement per part del TCR, promou un increment del Ca^{2+} intracel·lular que indueix l'alliberament mitjançant exocitosi dels grànuls citoplasmàtics i s'alliberen perforines i granzims. Els granzims s'uneixen a receptors de la cèl·lula diana i promouen l'endocitosi de les perforines. Al compartiment endosomal, les perforines polimeritzen sobre la membrana de la vesícula endocítica i generen porus per on s'introdueixen els granzims al citoplasma (137). Els granzims inicien l'activació de la via apoptòtica mitjançant l'activació de les proteïnes pro-apoptòtiques de la família Bcl-2, que en

activar-se alliberen el citocrom cque inicia l'apoptòsi de la cèl·lula, fragmentant-se el DNA, i generant-se cossos apoptòtics (138). Paral·lelament dona la fragmentació del DNA viral a la cèl·lula infectada, el que contribueix a la eliminació del virus. Els LTc inhibeixen l'acció dels granzims perquè expressen serpine.

➔ **Citolisi mediada per Fas/FasL.** Els LTc activats expressen FasL a la membrana plasmàtica on s'unirà el Fas. Aquesta unió activa els dominis de mort cèl·lular i la cascada de senyalització que portarà a l'activació de caspasa-8, i l'apoptòsi (139).

Polarització de LTc.

De forma semblant als LTh, els LTc també poden presentar diferents subtipus funcionals que polaritzen la resposta efectora dels LTc :

➔ **LTc1.** Les citocines IL-2 i IL-12, activen els factors de transcripció T-bet, Blimp, Id2 i IRF4, promouen la diferenciació cap a LTc1. Aquestes presenten una elevada producció de perforines i granzims adquirint gran capacitat citotòxica, tant per Fas com per granzims i perforines. La seva activació és important en la eliminació dels virus i els patògens intracèl·lulars. També poden produir IFN- γ i TNF- α (140,141). La majoria dels LTc1 moren per apoptòsi després de l'eliminació del patògen, però una fracció es manté com LTc1 memòria.

➔ **LTc2.** La IL-4 és la principal citocina que activa el factor de transcripció GATA-3, promovent la diferenciació cap a LTC2. Aquestes tenen capacitat citotòxica per granzims i perforines, i produeixen IL-5, IL-13 i IL-4 per amplificar LTh2 (142,143)

➔ **LTc9, LTc17, LTcreg.** La polarització cap a LTc9 es induïda per TGF- β i IL-4, expressen el factor de transcripció IRF i alliberen IL-9 i IL-10 (144). La polarització cap a LTc17 s'indueix per TGF- β , IL-6 i IL-21, que promouen l'expressió dels factors de transcripció ROR γ t, ROR α i IRF4 i alliberen IL-17 i IL-21 (145). La polarització cap a LTcreg s'indueix per TGF- β , que promou l'expressió del factor de transcripció Foxp3, i la síntesi de TGF- β , IL-10 perforines i granzims que participen

de la regulació de la activitat dels LTh (146,147). En conjunt LTc9, LTc17 i LTcreg tenen capacitat supressora i de modulació de la resposta immunitària.

LT memòria

Una vegada s'ha eliminat el patògen, la major part de les cèl·lules efectores moren, però una fracció de les cèl·lules LT específiques es mantenen circulant o residint als teixits com cèl·lules de memòria durant períodes llargs de temps. Al requerir un llindar d'activació menor que les LT naif s'activaran mes ràpidament si hi ha una reinfecció.

S'han proposat diferents models per explicar com s'originen les cèl·lules T memòria, atenent al moment de la seva diferenciació. Podrien originar-se alhora que les cèl·lules T efectores, durant el procés d'activació de les cèl·lules naif. Des de l'inici de l'activació la cèl·lula hauria adquirit el compromís de LT efector o LT memòria (148,149). Podrien originar-se a partir d'un subconjunt de cèl·lules efectores que escapen de la mort una vegada s'ha resolt la infecció (150). Altres models estableixen l'origen segons la intensitat de la senyalització activadora. Així una activació repetida mantindria les propietats efectores i al disminuir la intensitat o freqüència de l'activació, s'adquireixen les propietats de memòria (151,152).

Segons els nivells d'expressió de CD45, i l'expressió del CCR7 es diferencien:

Taula 2: Marcadors de les subpoblacions CD4 i CD8 memòria

LTh memòria central (CD4+Tcm)	CCR7+ CD45-
LTh memòria efectora (CD4+Tem)	CCR7- CD45-
LTc memòria central (CD8+Tcm),	CCR7+ CD45-
LTc memòria efectora (CD8+Tem),	CCR7- CD45-
LTc memòria efectora que re-expressen CD45RA (CD8+Temra)	CCR7- CD45+

CD45 Intervé de la regulació de la diferenciació cèl·lular de les cèl·lules hematopoètiques i en altres processos cèl·lulars. Esta codificada per el gen PTPRC, que conté 34 exons. Els exons 4, 5 i 6 codifiquen per a les regions A, B i C respectivament, que mitjançant splicing alternatiu es poden combinar donant lloc a isoformes diferents. Totes les cèl·lules hematopoètiques nucleades expressen alguna de les isoformes. Els LT naif expressen la isoforma CD45RA que conté la regió A, mentre que els LT activats i els LTmem expressen CD45RO que intervé en la regulació de la senyalització del TCR. Es fa servir per diferenciar els limfòcits, el monòcits i el granulòcits segons el seu nivell d'expressió en la membrana, i en el diagnòstic de la leucèmia limfàtica crònica (153,154,155).

CCR7 (CD197) es un receptor de quimiocines de la família CC codificat pel gen CCR7. Els seus lligands son les quimiocines CCL-19 i CCL-21. Participa de la recirculació limfocitària als òrgans limfàtics secundaris (limfonodes, melsa i teixits limfoides associats a mucoses). Als limfonodes, les cèl·lules reticulars fibroblàstiques de la zona paracortical alliberen CCL19 i CCL21 generant un gradient que atreu els LT naif que expressen CCR7 i van cap a les zones T dels limfonodes per on recirculen fins trobar l'antigen específic del seu TCR. Les CDs activades expressen CCR7 i també son sensibles al gradient de CCL19 i CCL21 que les atreu cap a les zones T de la melsa o els limfonodes per presentar els antígens als LT. En canvi, els LTc naif quan s'activen perden l'expressió de CCR7, el que els fa insensibles al gradient de CCL19 i CCL21 i surten del sistema limfàtic per recircular per la sang i dirigir-se als teixits infectats (156).

Poblacions de LTh memòria i el seu desenvolupament

Els LTh naif presenten el fenotip CD45RA⁺ i CCR7⁺, i poden recircular entre els òrgans limfoides secundaris, mentre que els LTh memòria no expressen CD45RA i segons l'expressió de CCR7, el patró de recirculació i la seva localització als teixits, es distingeixen 3 subpoblacions (157):

- **LTh memòria central (CD4+Tcm)** presenten el fenotip CD45RA⁻ CCR7⁺ CD62L⁺ amb capacitat de recircular per els òrgans limfoides secundaris fins que son activades per una CD(158). El percentatge de CD4+Tcm es de l'ordre de mil vegades superior al dels LTnaif específiques d'un antigen. Presenten menor capacitat de producció d'IFN-γ i IL-4 que els CD4+Tem, però major capacitat de produir IL-2, el que els hi confereix una major capacitat proliferativa (159). Es poden polaritzar cap a LThf, expressar CXCR5 i adquirir capacitat per migrar a regions fol·liculars per col·laborar amb LB i organitzar la resposta d'anticossos mes ràpidament que els LTnaif (160).
- **LTh memòria efectora (CD4+Tem)** presenten el fenotip CD45RA⁻ CCR7⁻, i per tant recirculen preferentment per la sang i els teixits perifèrics. Es poden activar mes rapidament i adquirir funcions efectores que els LTnaif i CD4+Tcm perquè tenen un llindar mes baix d'activació al requerir menors nivells de co-estimulació per part d'una CD. El tercer senyal necessari per a l'activació efectora els prové de la IL-1 que expressa constitutivament el CD4+Tem i per tant s'inicia ràpidament la producció de les citocines efectores IL-17 i IFN-γ (161).
- **LTh memòria resident (CD4+Trm)** presenten el fenotip CD45RA⁻ CCR7⁻ i no recirculen a través de la limfa, però tampoc a la sang ja que expressen les molècules CD69, CD103 i el receptor de S1P, fet que afavoreix la seva entrada i permanència als teixits (162). L'expressió de CD69 i CD103 es independent de l'activació per TCR i s'indueix per IL-33 i IFNs (163). Els CD4+Trm formen part de la primera línia de defensa front les re-infeccions al teixit respiratòri, teixits mucosos i la pell. Presenten un llindar d'activació baix, i responen sintetitzant IFN-γ, IL-2 i IL-17. També poden modular la resposta immunitària als teixits mitjançant l'expressió d'IL-10 (164).

El factor de transcripció T-bet, característic de la polarització cap a Th1, també intervé en la generació dels LTmem CD4⁺ i CD8⁺. Una elevada expressió de T-bet afavoreix el manteniment dels LT efectors mentre que una expressió baixa de T-bet afavoreix el

desenvolupament de LThcm (165,166). Addicionalment T-bet també regula l'expressió dels receptors de quimiocines característics de les subpoblacions LTh de memòria. Nivells baixos de T-bet promouen l'expressió de CCR7 i es generen LThcm mentre que nivells elevats d'IFN- γ promouen l'expressió de T-bet i no s'expressa CCR7 a la membrana, generant-se LThem (167). La diferenciació de LThmem requereix nivells alts d'IL-2, aquesta activa l'expressió del factor de transcripció Bcl-6 i participa del desenvolupament dels LThmem a partir de LT naif, però per generar memòria de vida llarga són necessaris nivells baixos d'IL-2. La IL-2 activa l'expressió de STAT-5 i Bcl-6 que promouen l'expressió del receptor d'IL-7, factor de supervivència dels LThmem juntament amb la IL-15 (168,169,170). D'altra banda per a la generació dels LThrm es requereix TGF- β , produït per diversos tipus cel·lulars tissulars com fibroblastos, cèl·lules epitelials, queratinòcits i enteròcits. El TGF- β induïx l'expressió de CD103 que promou l'entrada i retenció als teixits epitelials. Els LThrm poden arribar a formar el 20% del total dels LTh residents als teixits. Una subpoblació de LTrm expressa Foxp-3, i poden realitzar funcions reguladores als teixits perifèrics (171,172).

Poblacions de LTc memòria i el seu desenvolupament

Els LTc naif presenten el fenotip CD45RA⁺ i CCR7⁺, i tenen capacitat per recircular entre els òrgans limfoides secundaris fins trobar una CD on reconèixer l'antigen en context MHC-I. Les subpoblacions de LTc memòria són:(53)

➔ **LTc memòria central (CD8Tcm)**, expressen CD45RA i CCR7 i poden recircular entre els òrgans limfoides secundaris. També expressen nivells baixos de granzims i perforina conferint-los una baixa activitat citotòxica. Però tenen alta capacitat proliferativa i produir IL-2, i després de l'estimulació poden produir IFN- γ . Tenen capacitat d'autorenovació homeostàtica en resposta a IL-7 i IL-15. Poden proliferar i expandir-se ràpidament generant efectores després de la reestimulació (173). Els factors de transcripció que promouen el seu desenvolupament i la seva funció

son: Eomes, TCF1, BCL-6, ID3 i STAT3 (174-177). Donat que es localitzen als òrgans limfoides secundaris responen eficientment front infeccions sistèmiques.

- ➔ **LTc memòria efectora (CD8+Tem)**, no expressen CD45RA ni CCR7, i recirculen per la sang i els teixits perifèrics, expressen integrines i receptors de quimiocines, per a la seva localització a teixits perifèrics inflamats, i alts nivells de granzims i perforina. Poden produir IFN- γ i TNF- α i activar ràpidament la capacitat citotòxica després de la reestimulació (178). En absència d'estimulació, una part pot convertir-se en CD4+Tcm i adquirir capacitat d'autorenovació (179). Els factors de transcripció que promouen el seu desenvolupament i la seva funció son: T-bet, Blimp1, ID2 i STAT4 (179-184). S'activen ràpidament als teixits amb gran capacitat citotòxica i son eficients en la resposta front les infeccions als teixits perifèrics.
- ➔ **LTc memòria efectora que re-expressen CD45RA (CD8+Temra)**, expressen CD45RA però no CCR7, i recirculen per sang i teixits perifèrics (185). Expressen nivells alts de granzims i la perforina i tenen capacitat per produir citocines proinflamatòries i activar ràpidament la capacitat citotòxica després de la reestimulació. Si hi ha estimulació repetida s'acumulen a perifèria i expressen marcadors de diferenciació terminal (CD57) i longitud telomèrica reduïda (186).
- ➔ **LTc memòria resident (CD8+Trm)**, es defineixen per l'expressió de CD69, CD103 fet que afavoreix l'entrada i permanència als teixits. A cada teixit presenta diferents integrines que les mantenen al teixit i formen part de la primera línia de defensa front les re-infeccions a mucoses. Presenten un llindar d'activació baix, responen ràpidament al reconeixement específic del TCR amb senyals co-estimuladors de les APC residents del teixit. Els factors de transcripció que promouen el seu desenvolupament i la seva funció son: Hobit, Blimp-1 i Runx3 i a la seva maduració participen TGF β , TNF α , IL-33 i IL-15 (187,188). Al certs teixits poden activar mecanismes citotòxics i produir ràpidament d'IFN γ per facilitar la lisi de cèl·lules diana. Les CD8+Trm activades indueixen l'expressió de gens antibacterians i antivirals, i faciliten l'activitat dels APC. Activen les cèl·lules NK, promouen la

maduració de les CD i afavoreixen la migració dels LT i LB cap al teixit infectat mitjançant vies dependents d'IFN γ , TNF i IL-2R.

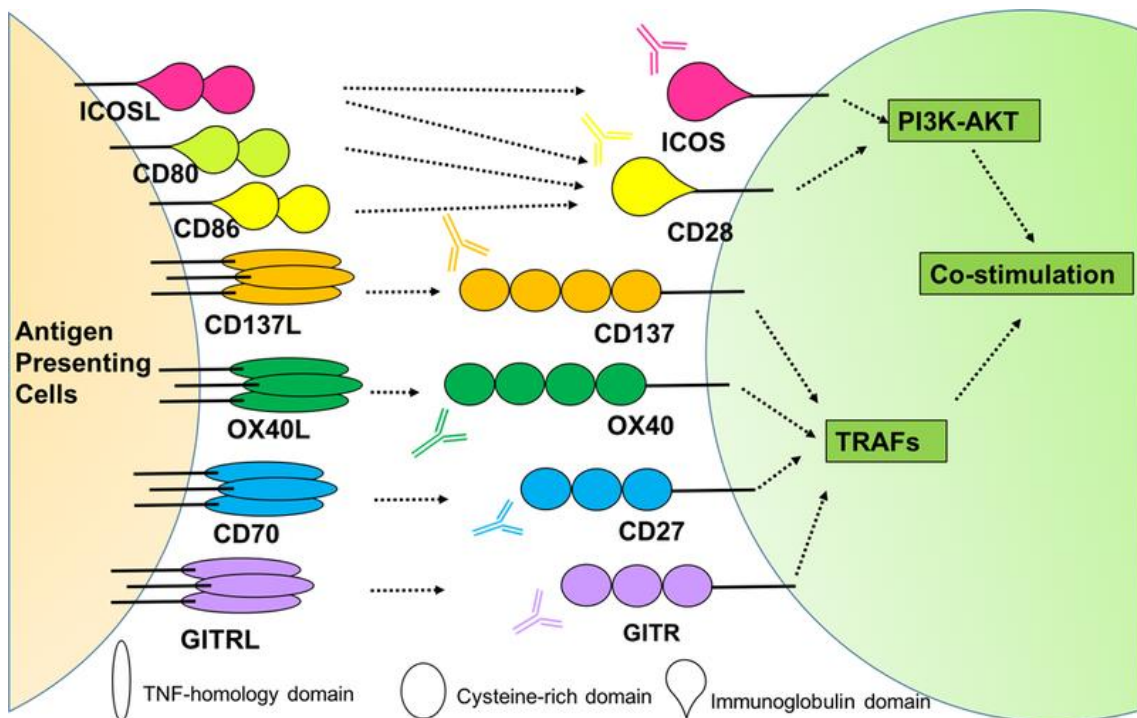
Parells receptors-co-estimuladors i marcadors d'activació

Durant les infeccions hi ha diferents parells de receptors co-estimuladors i lligands importants per a les funcions dels LT D80/86, CD40-CD40L, CD137-CD137L i CD134-CD134L (189,190,191,192)

- ➔ **CD28** és una glicoproteïna coestimuladora canònica i la més ben estudiada. La seva funció és fonamental per a la co-estimulació de L_Tnaif. El seu lligand és CD80/86. L'activació mitjançant CD28 dona com a resultat la protecció de la mort cel·lular, una secreció de citocines més forta i una proliferació molt millorada.
- ➔ **CD27** també conegut com TNFRSF7 s'expressa en LT de forma constitutiva pel que sembla que participa en l'estimulació. Després de l'estimulació d'un L_Tnaif, augmenta l'expressió de CD27. També s'expressa en LB i NK, i el seu lligand és CD70. La unió de CD70 dona un senyal co-estimulador per l'expansió del LT. Una regulació controlada de CD70 en cel·lules presentadores d'antigen, LT i NK assegura la transitorietat d'aquesta co-estimulació. CD70 s'incrementa per TNF- α , agonistes de TLR o irradiació (193).
- ➔ **CD134** és una proteïna de la superfamília del receptor de TNF, validat com a marcador de activació per identificar L_Th específics d'antigen (194). No s'expressa als LT que no han estat activats i la seva expressió s'indueix pel reconeixement i senyalització del TCR i es modula per la senyalització del CD28, el receptor d'IL-2 i el receptor d'IL-4 (195). La unió de CD134 amb el seu lligand CD134L a la APC participa a la proliferació i supervivència dels LT, i la diferenciació de L_Th. CD134 s'expressa a totes les subpoblacions de L_Th inclosos els L_Treg (196, 197).
- ➔ **CD137**, també conegut com a 4-1BB o receptor 9 del factor de necrosi tumoral (TNFR9), va ser originalment descobert com una molècula inducible a la superfície de LT activats. Als L_Tc presenta un pic d'expressió en membrana a les 24h, i als

LTh, el pic s'inicia a les 6 hores post-estimulació (198). Ara ha estat validat com a marcador de activació. El seu lligand, CD137L, o anomenat 4-1BBL, s'expressa a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen. L'activació dels LT a través del TCR incrementa l'expressió de CD137 a la membrana i la unió amb el lligand sobre APCs activa la proliferació i producció de citocines (199, 200). Quan s'uneix el seu lligand a LT activats, augmenta la proliferació, la secreció de citocines i supervivència, millorant així les funcions efectores (Sanmamed, Pastor et al., 2015). A més també s'expressa en cèl·lules T reguladores, LB, cèl·lules mieloides i cèl·lules NK activades

- ➔ Altres parells, son CD40-CD40L i CD357-CD357L. CD40 s'expressa en cel·lules presentadores d'antigen, incluint LT i el seu lligand s'expressa en els LT activats. **CD357** es una proteïna que s'indueix després de l'estimul via TCR dels LTs. Mentre que s'indueix als LT efectors despres de l'estimul via TCR, els Ltreg mostren nivells constitutius alts. La unió del seu lligand augmenta la proliferació i capacitat efectora gracies a la producció d'IL-2 i IFN- γ . A més, la sembla protegir contra la mort cel·lular induïda per l'activació.



Taula 3. Parelles receptors lligands que participen en la co-estimulació del LT

Durant l'activació de la resposta de LT les principals citocines proinflamàtores produïdes durant infeccions víriques són IFN tipus I, IFN γ , IL-2, IL-12, IL-27 i IL-33, que promouen la proliferació, diferenciació i la supervivència dels LT, a través de l'increment de l'expressió dels receptors de citocines i molècules co-estimuladores com CD25, CD134 i CD137; inhibidors de serin-proteases o de BCL-3 que limita la transcripció de gens dependents del factor nuclear κ B (NF- κ B) (201).

LT en la infecció per SARS-CoV-2

La principal característica dels pacients amb un curs greu de la infecció per SARS-CoV-2 es la limfopènia perifèrica, que es reverteix amb la resolució de la infecció (202,203,204). Diferents hipòtesis expliquen les causes de la limfopènia T i especialment la dels LTc:

- ➔ a) Una elevada migració de les cèl·lules Tc activades cap al teixit pulmonar als pacients greus (205), el que podria afavorir la resolució de la infecció. De fet, l'autòpsia de pacients va revelar una infiltració extensa de cèl·lules T als pulmons
- ➔ b) L'increment de l'apoptosi als LT (206).

L'anàlisi de cèl·lules immunitàries del líquid de rentat broncoalveolar de pacients amb COVID-19 va demostrar la presència d'expansió clonal. A més, es va demostrar que els números de LTh específics del virus estaven associats amb la producció d'IgG que s'adreça al domini d'unió al receptor del SARS-CoV-2. En particular, les anàlisis de casos persistents de COVID-19 van mostrar que, després de l'activació, les seves cèl·lules T semblaven perdre polifuncionalitat i citotoxicitat, tendint a un fenotip esgotat. (citada a wang i yang)

Els nivells elevats de citocines proinflamàtores com el TNF- α podrien causar defectes en la supervivència i la proliferació dels LT. A banda de la limfopènia, la RIA als pacients greus també es ineficient perquè els LTc dels pacients greus presenten un

increment en els receptors inhibidors com PD-1 i Tim-3, que podrien tenir relació amb els nivells elevats de IL-6 observats en aquests pacients (207, 208).

La resposta fisiològica front virus consisteix en l'activació dels LTc i la polarització cap a LTc1, i la polarització dels LTh cap a LTh17 observada als pacients greus (209), que s'associa al dany pulmonar i la patogènesi de la malaltia. Els LTh17 alliberen IL-17 que contribueix de la tempesta de citocines activant neutròfils, macròfags i monòcits per produir IL-1, IL-6 i TNF- α . Durant la infecció greu per SARS-CoV-2 la resposta dels LTh es ineficient, a causa de la limfopènia LTh observada i la presència de LTh que expressen el receptors inhibidors com PD-1 a totes les subpoblacions de LTh excepte els LTnaif (210).

Els LTc son necessaris per a la eliminació dels virus, ja que maten les cèl·lules infectades que presenten antígens del virus mitjançant MHC-I, l'expansió dels LTc específics del virus s'associa a un bon pronòstic de la infecció (211). Es poden identificar en sang perifèrica els LTc i LTh específics de SARS-CoV-2 als pocs dies des de l'inici de símptomes, observant-se un pic als 14 dies (212,213). La producció per part dels LTc de les molècules efectores IFN- γ , granzims i perforines, s'associa a un millor pronòstic de la infecció. Per contra, l'increment dels LTc específics que expressen HLA-DR i CD38, o que expressen molècules pro-apoptòtiques en superfície com el receptor TRAIL, s'associen a desenvolupar una malaltia greu. (cita)

Mecanismes d'evasió de la R.I. de SARS-CoV-2.

Resposta IFN

S'han descrit múltiples punts de la via de síntesi dels IFNs, que poden ser regulats per proteïnes estructurals o no estructurals de SARS-CoV-2 (214). Els mecanismes d'evasió dels IFNs interfereixen durant el reconeixement del RNA viral per part dels receptors RIG-I o RLR. Aixó també repercuteix en la senyalització intracèl·lular secundària al reconeixement del RNA viral, com es el cas de MAVs, STATs, IRFs.

Aquest fet comporta una deficient activació de l'expressió d'IFN per part de la cèl·lula infectada, a l'interferir en la síntesi proteica i el tràfic de les proteïnes a l'interior del citoplasma, i dificultant la traducció i alliberament del IFNs. Els mecanismes d'evasió també afecten al reconeixement de l'IFN per part de les cèl·lules veïnes mitjançant el receptor de IFN, ja que proteïnes víriques poden unir-se al receptor d'IFN i competir amb l'IFN per la seva unió i senyalització. (Taula 4).

Taula 4. Mecanismes d'evasió de la via dels IFNs per SARS-CoV-2.

Viral Protein	Known Functions	Host Interactions	Mechanism of IFN Evasion
NSP1	Host translational shut off	40 s Ribosomal Subunit, NXF1	Blocks host mRNA translation Inhibits mRNA nuclear export
NSP3	Papain-like proteinase; polyprotein processing	MDA5, IRF3	Targeting of ISGylated proteins: MDA5 and IRF3
NSP5	3C-like Protease; polyprotein processing	RIG-I, STAT1	Inhibition of K63 polyubiquitination of RIG-I
NSP6	Membrane rearrangements	TBK1	Inhibition of IRF3, STAT1/2 phosphorylation
NSP7	RdRp Subunit(non-enzymatic)		Inhibition of type I IFN signaling
NSP8	RdRp Subunit(primase)	7SL RNA, SRP19, SRP54, SRP72	Inhibition of protein trafficking
NSP9	non-enzymatic RBP	7SL RNA	Inhibition of protein trafficking
NSP10	RNA-capping		RLR evasion
NSP12	RNA-dependent RNA polymerase	IRF3	Enhancement of NSP14 inhibition
NSP13	RNA helicase	TBK1, TBKBP1	Inhibition of IRF3 nuclear translocation RLR evasion
NSP14	RNA-capping (3'-5' exoribonuclease)		Inhibition of TBK1, IRF3, and STAT1/STAT2 phosphorylation Inhibits NF-κB activation RLR evasion
NSP15	Uridylate-specific endoribonuclease	RNF41	Blocks host mRNA translation
NSP16	RNA-capping (2'-O-methyl-transferase)	U1 and U2 snRNA	IFNAR1 Antagonism RLR evasion
ORF3a	Viroprotein	TRIM59	RLR evasion
ORF3b			Spliceosome inhibition
ORF6		KPNA1/2, Nup98, Rae1	Inhibition of STAT1 phosphorylation Inhibition of IRF3 nuclear translocation
ORF7a			Inhibition of nuclear import and export
ORF7b			Inhibition of STAT2 phosphorylation
ORF9b		NEMO, TOM70, RIG-I, MDA5, MAVS, TBK1, STING, TRIF	Inhibition of STAT2 phosphorylation Inhibition of K63-linked poly-Ub of NEMO
M (membrane)	Viral assembly		Blocks TOM70-HSP90 interaction Inhibition of TBK1 phosphorylation
N (nucleocapsid)	Viral capsid	RIG-I, MDA5, MAVS, TBK1, TRAF3	Inhibition of TBK1 phosphorylation Block of MAVS aggregation
S (spike)	Cell entry		Inhibition of TRAF3-TANK-TBK1-IKKe complex formation
E (envelope)	Forms viral envelope		Inhibits RIG-I ubiquitination Inhibition of STAT1/2 phosphorylation

Taula extreta de Yoo, J.-S., Sasaki, M., Cho, S.X., Kasuga, Y., Zhu, B., Ouda, R., et al., 2021. SARS-CoV-2 inhibits induction of the MHC class I pathway by targeting the STAT1 IRF1-NLRC5 axis. Nat. Commun. 12 (1), 6602.

MHC-I.

Orf-8 es la principal proteïna vírica que intervé en la disminució de l'expressió del MHC-I a les cèl·lules infectades per SARS-CoV-2 (215). Orf-8 s'uneix a les molècules MHC-I i les dirigeix cap a la degradació lisosomal en autofagosomes. Altres proteïnes, com Orf-6, disminueixen la transcripció dels gens de MHC-I mitjançant el bloqueig dels

factors de transcripció STAT1, IRF, NLRC5 (216). De manera que les cèl·lules infectades no presenten eficientment pèptids en molècules MHC-I i per tant son resistents a l'acció citotòxica per part dels LTc.

Mutacions S.

Des de l'origen de la pandèmia per SARS-CoV-2, el virus ha evolucionat, i ha anat acumulant mutacions, que en el cas de la proteïna S han generat múltiples variants amb menor immunogenicitat però major eficiència per unir-se al receptor ACE-2. Les mutacions de la proteïna S que donen lloc a canvis en la seqüència de la proteïna reconeguda per el BCR i TCR, intenten evadir el reconeixement específic per part dels LB i LT. D'altra banda les mutacions que confereixen major eficiència en la unió al receptor ACE-2 intenten infectar mes ràpidament altres cèl·lules abans que els anticossos reconeixin el virus i el neutralitzin.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Des de principis del 2020, el SARS-CoV-2 s'ha estès a tot el món, provocant una pandèmia que continua causant danys devastadors a la salut pública i als mitjans de vida de les persones. Tot i que s'ha fet un esforç significatiu, encara estem lluny d'entendre's els mecanismes pels quals la immunitat de l'hoste combat la infecció per SARS-CoV-2 i quines diferències del pacient condicionen una evolució moderada o greu de la malaltia.

De la recerca de la resposta immunitària de l'hoste per fer front a infeccions viriques destaquen 3 aspectes claus: la producció d'anticossos neutralitzants que evitin la infecció de noves cel·lules, la generació d'una resposta efectora que elimini les cel·lules infectades i per tant el virus, i el desenvolupament d'una memòria immunològica protectora i robusta contra futures reinfeccions.

Les dades disponibles, comparant altres virus, suggereixen que la memòria eficient a llarg termini no s'adquireix fàcilment per a les infeccions per coronavirus humans. A mes a mes, els models matemàtics recents suggereixen que després de la infecció per SARS-CoV-2 es produeix una immunitat protectora de curta durada. Tot i que s'ha informat que els LT específics del SARS-CoV-2 es poden detectar en el 70-100% dels pacients convalsents amb COVID-19, fins ara, encara no està clar fins a quin punt els LT específics per SARS-CoV-2 poden establir la memòria i com responen aquestes cel·lules quan es tornen a exposar als antígens virals.

Objectiu general

Estudiar l'associació de les característiques clíniques i la progressió de la COVID-19 amb les respostes immunitàries de l'hoste.

Objectius específics

1) Es determinaran les proporcions de les diferents subpoblacions de limfòcits T de memòria i el fenotip d'activació dels limfocits T dels pacients amb COVID-19 en el moment de l'ingrés hospitalari respecte a controls sans.

- S'analitzarà si existeixen associacions diferents entre els paràmetres en controls sans i pacients.

2) Es compararan els nivells de paràmetres paraclítics, les proporcions de les diferents subpoblacions de limfocits T de memòria i el fenotip d'activació dels limfocits T entre pacients amb COVID-19 d'evolució moderada i els d'evolució severa, per tal de trobar una combinació de paràmetres que permeti predir l'evolució en el moment de l'ingrés hospitalari.

- S'analitzarà si el canvi de tots aquests paràmetres són diferents entre els pacients dels dos grups d'evolució entre dos temps.

3) Es caracteritzarà la resposta dels limfocits de sang perifèrica de pacients que han tingut una evolució moderada i una evolució greu per respondre davant una reactivació per antígens de SARS-CoV2 tant a nivell de fenotip cel·lular com de producció de citocines.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Disseny, àmbit i aspectes ètics

Estudi observacional, prospectiu, longitudinal.

Estudi unicèntric d'àmbit hospitalari.

El projecte s'ha realitzat en conformitat amb la normativa vigent següent:

Llei 14/2007, de 3 Juliol, de Recerca Biomèdica.

Reial decret 1716/2011, de 18 de Novembre de biobancs.

Reglament (UE) 2016/679 del Parlament Europeu i del Consell de 27 d'Abril de 2016 de Protecció de Dades (RGPD).

Llei orgànica 3/2018 de Protecció de Dades Personals i garantia dels drets digitals.

Prèviament a l'inici del reclutament de pacients, el projecte de recerca va ser avaluat i aprovat per part del Comitè ètic d'investigació clínica i medicaments (CEICm) de la Fundació parc Taulí, amb número CIR2020053.

3.2 Població d'estudi i càlcul de mostra

Es van incloure 47 pacients hospitalitzats a l'hospital universitari Parc Taulí de Sabadell a causa de la infecció per SARS-CoV-2 i 16 controls sans. Durant el període de temps entre el 16 de Juny i el 23 de Novembre de 2021.

Criteris d'inclusió de pacients:

- ➔ Pacient hospitalitzat a l'hospital universitari Parc Taulí de Sabadell a causa de la infecció per SARS-CoV-2.
- ➔ Pacient diagnosticat de la infecció per SARS-Cov-2 amb resultat de PCR-SARS-CoV-2 positiu.

- ➔ Llegir el full d'informació i presentar signat el consentiment informat de participació a l'estudi.

Criteris d'exclusió:

- ➔ Pacient amb tractament previ a la hospitalització amb quimioteràpia, diàlisi o hemodiàlisi.
- ➔ Pacient amb diagnòstic previ d'immunodeficiència, dislipèmia, malalties inflamatòries cròniques autoimmunitàries o amb activació del sistema immunitari.
- ➔ Pacient que presenti alguna sobreinfecció prèvia o durant l'ingrés hospitalari.

Seguiment dels pacients:

El seguiment dels pacients inclosos a l'estudi es va registrar fins 4 setmanes després de l'alta hospitalària (T2). Els pacients es van classificar segons la seva evolució durant l'estada hospitalària en un dels 2 grups següents:

- ➔ **Evolució favorable.** Definida per el requeriment d'hospitalització, i no presentar les característiques per a la classificació en el grup de pacients d'evolució greu.
- ➔ **Evolució greu.** Definida per la necessitat de ventilació mecànica invasiva o no invasiva o intubació oro-traqueal, $FiO_2 > 0.5$, freqüència respiratòria ≥ 30 respiracions per minut, saturació d'oxigen $< 92\%$ y quocient $PaO_2/FiO_2 < 200$.

Càlcul de la mostra:

Per tal d'aconseguir un nivell de confiança del 95% amb una significació del 5% i amb la evidència que un 10% dels pacients que ingressen per COVID-19 requeriran atenció en UCI, es necessitaria incloure 51 pacients.

3.3 Dades dels pacients.

Per a la recollida de les dades demogràfiques, dels paràmetres clínics i dels paràmetres paraclítics dels pacients es va dissenyar un quadern de recollida de dades.

Els pacients es van anonimitzar i les dades es van introduir al quadern de recollida de dades durant la realització del projecte.

En el moment de la inclusió, es van recollir les dades demogràfiques, es van registrar les característiques clíniques rellevants prèvies a la hospitalització i part de les característiques descriptives del curs de la infecció. Durant el temps que el pacient va requerir hospitalització, es van registrar la resta de característiques descriptives del curs de la infecció i la informació relativa als períodes de temps rellevants. Després del període de seguiment de 4 setmanes, es va registrar la supervivència i es va classificar al pacient com d'evolució favorable o greu de la infecció.

Dades demogràfiques:

→ **Edat.**

→ **Sexe.**

→ **Estat vacunal front SARS-CoV-2**, es van registrar la data, el tipus de vacuna (Jansen, Astra zeneca o Pfizer) i el número de dosis rebudes. Es considera que un pacient ha estat vacunat si ha rebut una o dues dosis d'alguna de les vacunes disponibles en el moment de la realització de l'estudi, i l'administració de la vacuna ha tingut lloc abans dels 7 dies previs a l'inici de símptomes..

Característiques clíniques prèvies a la hospitalització:

→ **Antecedents patològics**, es van registrar les patologies prèvies dels pacients que no es van considerar part dels criteris d'exclusió. Dels 47 pacients inclosos, 2 pacients presentaven antecedents de cardiopatia isquèmica (CI), 1 malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), 3 malaltia del teixit conjuntiu (ETC) i 7 diabetes mellitus (DM). A l'anàlisi posterior el grup amb antecedents previs s'inclou tots els pacients amb algun antecedent previ sense diferenciar el tipus ni la causa de l'antecedent, ja que el número de pacients de cada grup de patologia per separat es insuficient per observar diferències significatives entre grups.

→ **Tractament immunosupressor previ**, es van registrar els tractaments previs dels pacients que no es van considerar criteris d'exclusió. Dels 47 pacients inclosos 2 presentaven tractament corticosteroide previ. A l'anàlisi posterior no es va considerar com a variable d'estudi ja que el número de pacients amb tractament previ es insuficient per observar diferències significatives entre els grups.

Característiques descriptives del curs de la infecció:

→ **Síntomes previs a la hospitalització**, es van registrar els símptomes que cada pacient havia manifestat des de l'inici de la infecció. Als pacients inclosos, els símptomes registrats van ser: tos, febre, dispnea, diarrea, anòsmia i agèusia.

→ **Índex de risc**, per a cada pacient inclòs a l'estudi, es va calcular l'índex Charlson de comorbiditat en el moment de l'hospitalització (250). Aquest índex relaciona la supervivència a llarg termini amb la comorbiditat del pacient (Taula MM0). Per cadascuna de les següents comorbiditats es suma un punt en el càlcul de l'índex: edat de 50 a 59 anys, infart de miocardi, insuficiència cardíaca congestiva, malaltia vascular perifèrica, malaltia cerebrovascular, demència, malaltia pulmonar obstructiva crònica, malaltia del teixit connectiu, hepatopatia lleu, ictus pèptic, diabetes mellitus sense afectació orgànica. Per cadascuna de les següents comorbiditats es sumen dos punts en el càlcul de l'índex: edat de 60 a 69 anys, diabetes mellitus amb afectació orgànica, hemiplegia, insuficiència respiratòria crònica, tumor no metastàtic, leucèmia i limfoma. En cas de presentar edat de 70 a 79 anys o malaltia hepàtica moderada o severa, es sumen tres punts en el càlcul de l'índex. En cas de pacients amb edat superior a 80 anys, es sumen 4 punts. Per cadascuna de les següents comorbiditats es sumen sis punts en el càlcul de l'índex: tumor sòlid amb metastasi o SIDA. Es va considerar que els pacients presentaven un índex de comorbiditat baix si van obtenir 2 o menys punts en el càlcul de l'índex, mentre que els pacients amb 3 o mes punts es van considerar de comorbiditat alta.

Index Charlson	Supervivència estimada a 10 anys
0 p	98%
1 p	96%
2 p	90%
3 p	77%
4 p	53%
5 p	21%
6 p	2%
>6 p	0%

Taula 5. Supervivència a 10 anys segons el càlcul del índex Charlson.

- ➔ **PaO₂/FiO₂ min**, es va registrar el valor mínim de l'índex de Kirbyde cada pacient assolit durant la hospitalització.
- ➔ **Oxigenoteràpia**, es va registrar si va requerir o no suport d'oxigen cada pacient, i el tipus d'oxigenoteràpia requerit durant la hospitalització: ulleres nasals, ventimask, ulleres d'alt flux o ventilació mecànica.
- ➔ **Tractament hospitalització**, s, es va registrar el tractament rebut cada pacient durant l' hospitalització. Tant si van rebre tractament corticosteroides en monoteràpia com combinat amb tocilizumab, si van rebre tractament antiviral amb Remdesivir i si van rebre tractament antibiòtic.
- ➔ **Requeriment UCI**, es va registrar si els pacients van requerir atenció en la unitat de crítics.
- ➔ **Condicions de la mostra a T1**, es va registrar si la segona extracció de sang perifèrica es va realitzar amb el pacient hospitalitzat o si ja havia rebut el alta i per tant ja no estava en fase aguda de la infecció.
- ➔ **Gravetat**, es va classificar i registrar cada pacient com d'evolució favorable o greu de la infecció.
- ➔ **Supervivència**, de cada pacient es va registrar la supervivència 4 setmanes després de l'alta hospitalària.

Característiques relatives als períodes de temps rellevants:

De cada pacient es van registrar les dates de: inici de símptomes (Is), diagnòstic (Dx), hospitalització (H), inclusió a l'estudi (Inc), primera extracció (T0), segona extracció (T1), ingrés en UCI i alta hospitalària (AH). Per a cada pacient es van calcular els períodes de temps, en dies, que es consideren rellevants per al curs de la infecció:

- Des de l'inici de símptomes fins al diagnòstic.
- Des de l'inici de símptomes fins a hospitalització.
- Des de l'inici de símptomes fins a inclusió.
- Des de la inclusió fins a la primera extracció.
- Des de la primera extracció fins a la segona extracció.
- Des de l'inici de símptomes fins a la primera extracció.
- Des de l'inici de símptomes fins a la segona extracció.
- Des de la hospitalització fins a la primera extracció.
- Des del diagnòstic fins a la primera extracció.
- Des de la hospitalització fins a l'ingrés en UCI.
- Des de la hospitalització fins a l'alta hospitalària.
- Des de la segona extracció fins a l'alta hospitalària.

3.4 Diagnòstic pacients COVID-19.

El diagnòstic de la infecció per SARS-CoV-2 es basa d'una banda en la sospita clínica, fonamentada en l'anamnesi i l'observació dels símptomes i signes característics de la infecció mitjançant l'examen físic i les proves complementaries com la radiografia de tòrax (FIGMM0) o els paràmetres analítics dels pacients. I d'altra banda en el diagnòstic microbiològic que es basa en la detecció del virus al frotis nasofaringi.

Símptomes i signes de la infecció per SARS-CoV-2

- ➔ **Anamnesi**, mitjançant la realització de preguntes senzilles i clares, s'obté informació sobre els antecedents i símptomes dels curs de la infecció com: febre, dispnea, dolor pleurític, tos, expectoració, dispnea, agèusia, vòmits, diarrea, hemoptisi i hipotensió.
- ➔ **Examen físic**, durant la exploració física s'avaluen la presència de taquipnea, cianosi, es mesura la saturació d'O₂, auscultació pulmonar de sorolls respiratoris,

avaluació de la trombosi venosa profunda mitjançant ecografia doppler i observació de inflamació d'extremitat unilateral.

→ **Radiografia de tòrax**, els patrons de les manifestacions radiològiques pulmonars en la infecció per SARS-CoV-2 son:

- Infiltrat unilateral multilobal en vidre esmerilat perifèric.
- Infiltrats bilaterals en vidre esmerilat i/o patró intersticial.
- Infiltrats/condensacions bilaterals alveolars difusos i de predomini perifèric, compatibles amb síndrome de distres respiratori agut.
- Patrons pseudonodulars.

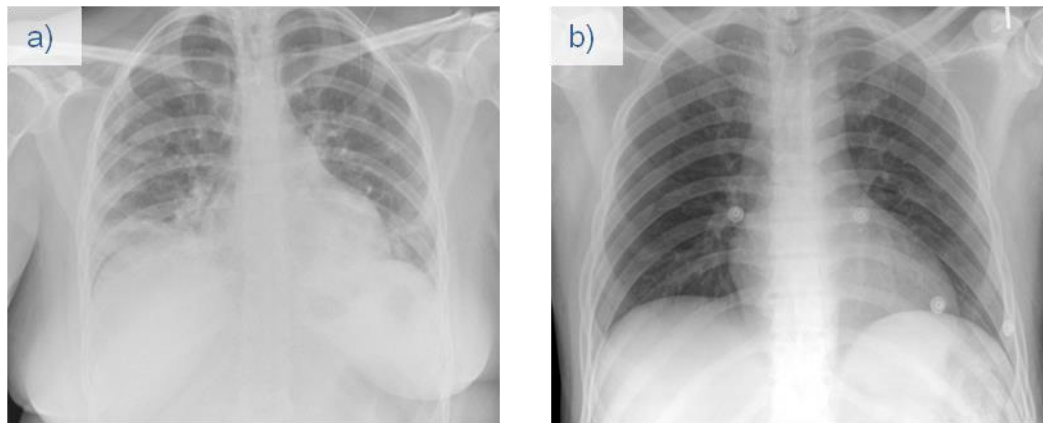


Figura 8. Radiografia de tòrax per al diagnòstic de COVID-19 de: a) Pacient COVID-19 greu amb SDRA en la que s'observen opacitats alveolars bilaterals en vidre esmerilat, amb major consolidació en lòbul inferior dret. b) Radiografia normal en pacient COVID-19 que no presenta SDRA. Índex cardio-toràcic inferior a 0.5, no s'observen consolidacions ni signes de redistribució pulmonar.

→ **Paràmetres analítics o paraclínic**s, els paràmetres de diagnòstic i seguiment dels pacients infectats per SARS-CoV-2 son:

- Hemograma, valorar limfopènia (<1.200 limfòcits/mL).
- Perfil hepàtic, valoració dels nivells de les transaminases aspartat aminotransferasa (GOT) i alanina aminotransferasa (GPT).
- Lactat deshidrogenasa (LDH), valorar nivells per sobre de rang de normalitat.
- Ferritina, valorar si nivells son >500ng/mL.

- Coagulació, valorar dimer-D, temps de protrombina, temps de tromboplastina parcial activada.
- Albúmina, valorar hipoalbuminèmia <3.5gr/dL.
- Funció renal, valorar creatinina i filtrat glomerular.

Diagnòstic microbiològic SARS-CoV-2

El diagnòstic microbiològic es realitza mitjançant mètodes moleculars per determinar la presència del material genètic de SARS-CoV-2 als exsudats naso-faringis.

El diagnòstic microbiològic de la infecció per SARS-CoV-2 als pacients inclosos, es va realitzar mitjançant el procediment automatitzat rutinari de l'Hospital Universitari Parc Taulí. Les mostres de frotis naso-faringi es van obtenir per raspat del hisop nasal sobre la mucosa nasofaríngea i orofaríngea, es van processar seguint les instruccions del fabricant, i es van remetre al servei de laboratori. Les mostres d'hisops recollides en medi de transport viral es van processar dintre de les 6 hores posteriors a la obtenció de la mostra. Es van inactivar en campana de flux en condicions d'esterilitat, mitjançant el tampó AVL d'inactivació i a continuació en van processar a l'analitzador *Panther Fusion System* (Grifols *Diagnostic Solutions* Inc.). Mitjançant el *kit Procleix SARS-CoV-2 Assay* (Ref 9052110, Diagnostic Grifols).

El mètode per determinar el RNA de SARS-CoV-2 en mostres de frotis nasofaringi i orofaringi consisteix en l'amplificació d'àcids nucleïcs mediada per transcripció(TMA).

Consisteix en:

- ➔ **Preparació de la mostra i captura de la diana**, les mostres d'hisop es transfereixen a un tub secundari que conté el tampó d'extracció de mostres de Procleix (SEB). Que lisa les cèl·lules i estabilitza els àcids nucleïcs. La mostra es tracta amb un detergent per solubilitzar l'embolcall viral, desnaturalitzar les proteïnes i alliberar l'RNA genòmic viral. Els oligonucleòtids de captura compostos per 8 oligonucleòtids complementaris a la seqüència d'RNA que

codifica per a la proteïna N de SARS-CoV-2 s'hibriden a l'RNA de SARS-CoV-2 present a la mostra. A continuació, els híbrids formats es capturen en micropartícules magnètiques que es separen de la mostra en un camp magnètic i es renten les molècules no unides.

➔ **Amplificació de la diana d'RNA de SARS-CoV-2 per TMA**, l'amplificació te lloc mitjançant el mètode d'amplificació TMA5, que fa servir dos enzims: la transcriptasa inversa MMLV i l'RNA polimerasa T7. La transcriptasa inversa genera una còpia de DNA que conté una seqüència promotora de l'RNA polimerasa T7. L'RNA polimerasa T7 genera múltiples còpies d'RNA partir de la seqüència de DNA.

➔ **Detecció dels productes d'amplificació**, te lloc mitjançant el mètode de protecció de l'hibridació, que fa servir sondes d'àcid nucleïc monocatenari amb etiquetes químioluminiscent complementàries de l'amplicó, aquestes s'hibriden, i el reactiu *Selection Reagent* diferencia entre sondes hibridades i no hibridades i inactiva l'etiqueta de les sondes no hibridades. La detecció del senyal químioluminiscent produït per la sonda hibridada es mesurat amb un luminòmetre i s'informa com unitats de llum relativa (RLU). El control intern (CI) *Target Capture Reagent* (wTCR) s'afegeix a cada mostra, control i calibrador. El senyal químioluminiscent del CI es discrimina del senyal SARS-CoV-2 per la cinètica d'emissió de llum de les sondes. L'amplicó específic del CI es detecta mitjançant una sonda amb emissió ràpida de llum (senyal intermitent). L'amplicó específic de SARS-CoV-2 es detecta mitjançant sondes amb una cinètica d'emissió de llum més lenta (senyal brillant). Per diferenciar els senyals de les etiquetes intermitents i brillants es fa servir el mètode *Dual Kinetic Assay*. El punt de tall del nivell de positivitat s'obté a partir del resultat RLU dels calibradors.

➔ **Interpretació**, per a cada mostra es determinen el valor RLU del senyal brillant (RLUS) i el valor RLU del senyal intermitent (RLUCI). I es calculen els índex de

l'aplicó específic de SARS-CoV-2 dividint el valor RLUS pel CO: $RLUS/CO$. El resultat es considera no reactiu si l'índex $RLUS/CO$ es menor de 1 i RLUCI es superior al valor establert per el lot del kit. El resultat es considera reactiu si l'índex $RLUS/CO$ es major de 1 i RLUCI es superior al valor establert per el lot del kit. El resultat es considera invàlid si l'índex $RLUS/CO$ es menor de 1 i RLUCI es inferior al valor establert per el lot del kit.

3.5 Obtenció i processament de les mostres

Per a la determinació dels paràmetres paraclítics, prèviament a cada extracció de sang, es va generar una petició informatitzada i es van obtenir 2 tubs de 5mL amb gel separador, un tub de citrat de 3mL i 5 tubs EDTA (àcid etildiaminotetraacètic) de 3mL.

Les mostres de sang perifèrica es van obtenir per veno-punció en tubs amb anticoagulant EDTA.

El sèrum es va obtenir mitjançant la centrifugació dels tubs amb gel separadora 2000 rpm (revolucions per minut) durant 10 minuts a temperatura ambient (T/A). Es va dividir la mostra en 3 alíquotes identificades amb el número de petició del pacient. De les que una alíquota es va fer servir per a les determinacions automatitzades i la resta es van mantenir a -80°C en una col·lecció pròpia registrada al *Registro Nacional de Biobancos del instituto de salud Carlos III*, fins la realització de la resta de determinacions.

El plasma es va obtenir mitjançant la centrifugació de la sang perifèrica extreta en tub amb anticoagulant EDTA, a 2000 rpm (revolucions per minut) durant 10 minuts a T/A.

El plasma citrat es va obtenir mitjançant la centrifugació de la sang perifèrica extreta en tub amb anticoagulant citrat trisòdic, a 3500 rpm (revolucions per minut) durant 10 minuts a temperatura ambient (T/A).

3.6 Determinació de paràmetres paraclínic

Hemograma

La determinació dels percentatges i números absoluts de les poblacions hematològiques en sang total, es va realitzar mitjançant el procediment automatitzat rutinari de l'Hospital Universitari Parc Taulí, dintre de les 6 hores posteriors a la extracció de la mostra. Un tub de sang EDTA es va processar a l'analitzador Sysmex XN-10 (Sysmexcorporation). Mitjançant els kits Fluorocell WDF (WDF-800A) (Ref.AL-337-564, Sysmexcorporation) i LysercellWDF (Ref. AW-993-605, Sysmexcorporation) per a la determinació del nº absolut i els percentatges de neutròfils, limfòcits, monòcits i eosinòfils. El número absolut i els percentatges de basòfils es van determinar mitjançant els kits Fluorocell WRN (WDF-800A) (Ref. BG128712, Sysmexcorporation) i Lysercell WRN (Ref. BL-121-531, Sysmexcorporation).

El mètode per determinar els leucòcits en sang perifèricaconsisteix en citometria de fluxe fluorescent lateral amb colorant de polimetina per a àcids nucleïcs. 100 µL de sang total es dilueixen 1:60 en diluent de mostra, i posteriorment la sang es hemolitzada amb el reactiu Lysercell. S'afegeix el reactiu Fluorocell que contèpolimetina, compost fluorescent que tenyeix el nucli de les cèl·lules. La mostra es manté a una temperatura constant durant la tinció del nucli. Posteriorment la mostra s'adquireix pelcitòmetre de flux i s'excita amb un làser amb una longitud d'ona de 633nm. Al detector de fluxe es mesuren la llum dispersada lateralment (SSC, SideScater) i la fluorescència lateral de cada cèl·lula (SFL). Els escatergrames (Fig 9) obtinguts permeten diferenciar els diferents tipus cèl·lulars i ofereix els valors absoluts i percentatge dels leucòcits de la sang total.

Dímer D

La determinació dels nivells de dimer-D en plasma citrat es va realitzar mitjançant el procediment automatitzat rutinari de l'Hospital Universitari Parc Taulí dintre de les 6

hores posteriors a l'extracció de la mostra. Una alíquota de plasma citrat es va processar a l'analitzador ACL TOP (Werfen). Mitjançant el Kit D-Dimer HS 500 (Hemosil, Inn. Diag).

El mètode per determinar el dimer-D en plasma citrat consisteix en un immunoassaig turbidimètric de partícules de làtex. El dimer-D s'uneix a les partícules de làtex recobertes amb fragments $F(ab')_2$ anti-dimer-D, el que promou la seva aglutinació i la generació d'immunocomplexes que son mesurats mitjançant turbidimetria a 570/800 nm. La quantificació es realitza mitjançant l'extrapolació de la senyal obtinguda a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

PCR

La determinació dels nivells de Proteïna C Reactiva (PCR) en sèrum es va realitzar mitjançant el procediment automatitzat rutinari de l'Hospital Universitari Parc Taulí, dintre de les 6 hores posteriors a l'extracció de la mostra. Una alíquota de sèrum es va processar al mòdul 502 de l'analitzador Roche Cobas 8000 (Roche Diagnostics). Mitjançant el Kit CRP4 (Ref. 07876033190, Roche diagnostics).

El mètode per determinar la PCR en sèrum consisteix en un test immunoturbidimètric potenciat amb partícules. La PCR humana s'uneix a les partícules de làtex recobertes amb anticossos monoclonals anti-PCR, el que promou la seva aglutinació i la generació d'immunocomplexes que son mesurats mitjançant turbidimetria a 570/800 nm. La quantificació es realitza mitjançant l'extrapolació de la senyal obtinguda a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

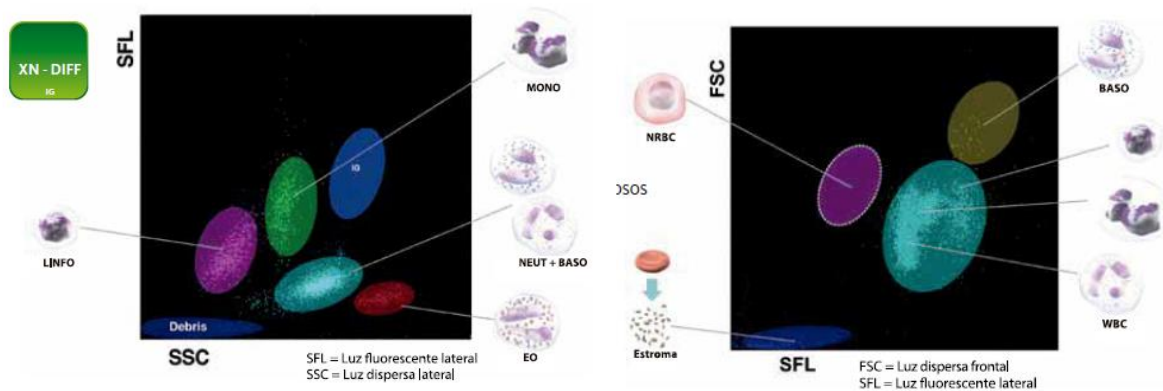


Figura 9.Scatergrama de poblacions hematològiques. Estreta de Sysmex.com

LDH

La determinació dels nivells de lactat deshidrogenasa (LDH) en sèrum es va realitzar mitjançant el procediment automatitzat rutinari de l'Hospital Universitari Parc Taulí, dintre de les 6 hores posteriors a l'extracció de la mostra. Una alíquota de sèrum es va processar al mòdul 702 de l'analitzador *Roche Cobas 8000* (*Roche Diagnostics*). Mitjançant el Kit LDIH2 (Ref. 05169330190, *Roche diagnostics*).

El mètode per determinar la LDH en sèrum consisteix en un test enzimàtic amb anàlisi per espectrofotometria-UV. L'enzim LDH catalitza la conversió de L-lactat a piruvat. Durant la reacció el coenzim dinuceòtid nicotinamida adenina (NAD) es redueix a NADH. La producció de NADH es directament proporcional a l'activitat catalítica de l'enzim LDH. Es determina mitjançant fotometria amb radiació ultravioleta i mesurant l'increment de l'absorbància. La quantificació es realitza mitjançant l'extrapolació del resultat obtingut a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

Ferritina

La determinació dels nivells de ferritina en sèrum es va realitzar mitjançant el procediment automatitzat rutinari de l'Hospital Universitari Parc Taulí, dintre de les 6 hores posteriors a l'extracció de la mostra. Una alíquota de sèrum es va processar al

mòdul 702 de l'analitzador *Roche Cobas 8000*(*Roche Diagnostics*). Mitjançant el Kit FERR4 (Ref. 05172390190, *Roche diagnostics*).

El mètode per determinar la ferritina en sèrum consisteix en un test immunoturbidimètric potenciat amb partícules. La ferritina humana s'uneix a les partícules de làtex recobertes amb anticossos monoclonals anti-ferritina, el que promou la seva aglutinació i la generació d'immunocomplexes que son mesurats mitjançant turbidimetria a 570/800 nm. La quantificació es realitza mitjançant l'extrapolació de la senyal obtinguda a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

Calprotectina sèrica

Es van determinar els nivells de calprotectina sèrica en una alíquota de sèrum congelat. Es va descongelar a 37°C i es va processar a l'analitzador *Bio-Flash* (*Werfen group*) mitjançant el kit *QUANTA Flash Circulating Calprotectin* (Ref. 701365, *Innova diagnostics*).

El mètode per determinar la calprotectina lliure en sèrum consisteix en un immunoanàlisi sandvitx de quimioluminescència. La calprotectina present al sèrum diluït s'uneix a les partícules paramagnètiques recobertes d'anticossos anti-calprotectina, es realitzen diversos rentats immobilitzant les partícules per magnetisme per eliminar les molècules no unides als anticossos. Després, s'afegeix un anticòs anti-calprotectina conjugat amb isoluminol, s'incuba a 37°C i posteriorment es renten els anticossos no units als immunocomplexes. S'afegeixen reactius iniciadors que promouen que l'isoluminol generi una reacció luminiscent. La llum generada es mesura pel sistema òptic del BIO-FLASH com unitats relatives de llum (URL). El número d'URL es proporcional a la quantitat de calprotectina capturada a les partícules. La quantificació es realitza mitjançant l'-extrapolació de les URL obtingudes a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

3.7 Determinació dels paràmetres paraclínic immunològics

IL-6

La determinació dels nivells de IL-6 en sèrum es va realitzar en una alíquota de sèrum congelat. Es va descongelar a 37°C i es va processar al mòdul e601 de l'analitzador *Roche Cobas 6000* (*Roche Diagnostics*). Mitjançant el Kit *Elecsys IL-6* (Ref. 09015604190, *Roche diagnostics*).

El mètode per determinar la IL-6 en sèrum consisteix en un immunoassaig sandvitx d'electroquimioluminiscència. La mostra s'incuba amb un anticòs anti-IL-6 biotinitat, s'afegeix un anticòs anti-IL-6 marcat amb quelat de ruteni i micropartícules recobertes d'estreptavidina. Els anticòs, la IL-6 i les micropartícules amb estreptavidina formen un immunocomplexe sandvitx. Les micropartícules es fixen per magnetisme a la superfície de l'elèctrode. Es renten els elements no fixats. Posteriorment a l'aplicar un corrent elèctric té lloc la reacció quimioluminiscent que es detectada per el fotomultiplicador. La quantificació es realitza mitjançant l'extrapolació de la senyal obtinguda a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

Anticòs anti-proteïna S i anti-proteïna N de SARS-CoV-2

La determinació dels nivells de anticòs IgG, IgA i IgM anti-proteïna S i anti-proteïna N de SARS-CoV-2 en sèrum es va realitzar en una alíquota de sèrum congelat. Es va descongelar a 37°C i es va processar al mòdul e601 de l'analitzador *Roche Cobas 6000* (*Roche Diagnostics*). Mitjançant els Kits *Elecsys Anti-SARS-COV-2 S* (Ref. 09289275190, *Roche diagnostics*) i *Elecsys Anti-SARS-COV-2* (Ref. 09203079190, *Roche diagnostics*).

El mètode per determinar nivells de anticòs IgG, IgA i IgM anti-proteïna S i anti-proteïna N de SARS-CoV-2 en sèrum consisteix en un immunoassaig sandvitx d'electroquimioluminiscència amb doble antigen. 12µL de la mostra s'incuba amb l'antigen SARS-CoV-2 S-RBDbiotinitat o N-RBDbiotinitat. S'afegeix un antigen SARS-

CoV-2 S-RBD o N-RBD marcat amb quelat de ruteni i micropartícules recobertes de estreptavidina. Els anticossos, els antígens SARS-CoV-2 S-RBD o N-RBD i les micropartícules amb estreptavidina formen un immunocomplexe sandvitx. Les micropartícules es fixen per magnetisme a la superfície de l'elèctrode i es renten els elements no fixats. Posteriorment al aplicar un corrent elèctric té lloc la reacció quimioluminiscent que es detectada pel fotomultiplicador. La quantificació es realitza mitjançant la extrapolació de la senyal obtinguda a una corba patró amb estàndards de concentració coneguda.

Anticossos anti-IFN α

Es van determinar els anticossos IgG, IgA i IgM anti-IFN α en una al·lquota de sèrum congelat. Es va descongelar a 37^aC i es va processar mitjançant un procediment semiautomàtic a l'analitzador de tècniques de ELISA (de l'anglès *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) Triturus (Griffols), fent servir el kit *Human Anti-IFN α ELISA Kit* (Cat n^o BMS217, Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant.

Càlcul dels resultats, es va realitzar una corba patró al software *GraphPadPrism* (versió 5.0.0 per a Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) amb els resultats de l'absorbància dels estàndards S1 a S7, mitjançant el mètode d'ajust de corba de 5 paràmetres. La quantificació de les mostres es va realitzar mitjançant l'extrapolació de l'absorbància obtinguda a la corba patró, al software *GraphPadPrism*.

3.8 Anàlisi del fenotip de les cèl·lules de sang perifèrica.

L'anàlisi del fenotip de les poblacions cèl·lulars de sang perifèrica es va realitzar dintre de les 6 hores següents a l'extracció de la mostra. El procediment consisteix en el marcatge de superfície amb anticossos monoclonals (Taula 6.), lisi dels eritròcits i adquisició de les mostres amb el citòmetre de flux.

Taula 6. Anticossos per al marcatge de superfície de les subpoblacions cèl·lulars.

		Especificitat	Fluorocrom	Clona	Isotip	Proveïdor
SANG	PBMCs	Tinció vitalitat	7-AAD	N/A	N/A	BD Biosciences
		CD137	APC	4B4-1	Mouse IgG1,k	BD Biosciences
		CD134	PE	134-1	IgG1	Cytognos
		CD3	FITC	UCHT1	Mouse IgG1,k	BD Biosciences
		CD4	APC-H7	RPAT-4	Mouse IgG1,k	BD Biosciences
		CD8	V500	SK1	Mouse (BALB/c IgG1,k)	BD Biosciences
		CD45RA	BV421	HI100	Mouse IgG2b,k	BD Biosciences
		CCR7	BV786	3D12	Rat IgG2a,k	BD Biosciences
		PD-L2	BV711	MIH18	Mouse IgG1,k	BD Biosciences
		CD38	BV605	HB7	Mouse IgG1,k	BD Biosciences
		HLA-DR	R718	L203.rMAb	Mouse (BALB/c IgG1,k)	BD Biosciences
		CD11a	PE-Cy7	HI111	Mouse IgG1,k	BD Biosciences

Tinció de superfície en sang total i adquisició amb el citòmetre de flux. Per a cada pacient es van retolar 1 tub de citometria amb el numero d'identificació, es van dispensar al fons de cada tub els següents anticossos monoclonals: 20µL d'anticòs anti-CD3, 5µL d'anticòs anti-CD4, 5µL d'anticòs anti-CD8, 5µL d'anticòs anti-CD45RA, 5µL d'anticòs anti-CCR7, 5µL d'anticòs anti-CD38, 5µL d'anticòs anti-CD11a, 5µL d'anticòs anti-HLA-DR, 5µL d'anticòs anti-PD-L2. Posteriorment es van dispensar 50µL de sang total EDTA homogeneïtzada dels pacients a cada tub corresponent i es va agitar suaument per barrejar els anticossos i la sang. Es van incubar durant 15minuts a T/A en condicions de foscor. Es van lisar els eritròcits i es van rentar les cèl·lules amb el lisador automatitzat BD FACS *Lyse wash assistant*. Posteriorment es van resuspendre les cèl·lules en tampó *FacsFlow* (BectonDickinson,) i es van adquirir amb el citòmetre BD *FacsLyric*. Per a cada pacient es van adquirir 250.000events totals.

Anàlisi de les poblacions mitjançant FlowJo: Mitjançant el software FlowJo (v10.8.1, Treestar, Ashland, Oregon) es van seleccionar les poblacions a estudi seguint la següent estratègia d'anàlisi (FIG MM3). Primerament es van excloure els doblers mitjançant un plot bidimensional amb el FS-H a l'eix de les ordenades i FS-A a l'eix de abscisses (anàlisi no mostrat), posteriorment es van seleccionar les poblacions

de granulòcits, monòcits i limfòcits segons la seva complexitat citoplasmàtica (eix SSC-A) i el seu tamany (eix FSC-A).

De la població de monòcits es va seleccionar la població positiva per a HLA-DR (Monòcits HLA-DR+).

De la població de limfòcits es va seleccionar la població CD3+, i d'aquesta, es van seleccionar les poblacions de limfòcits CD4+ i CD8+. De cadascuna de les poblacions de limfòcits, i mitjançant un plot amb els marcadors CCR7 i CD45RA es van diferenciar les poblacions CD4+Tcm, CD4+Tem, CD4+Temra, CD4+Tn, CD8+Tcm, CD8+Tem, CD8+Temra i CD8+Tn.

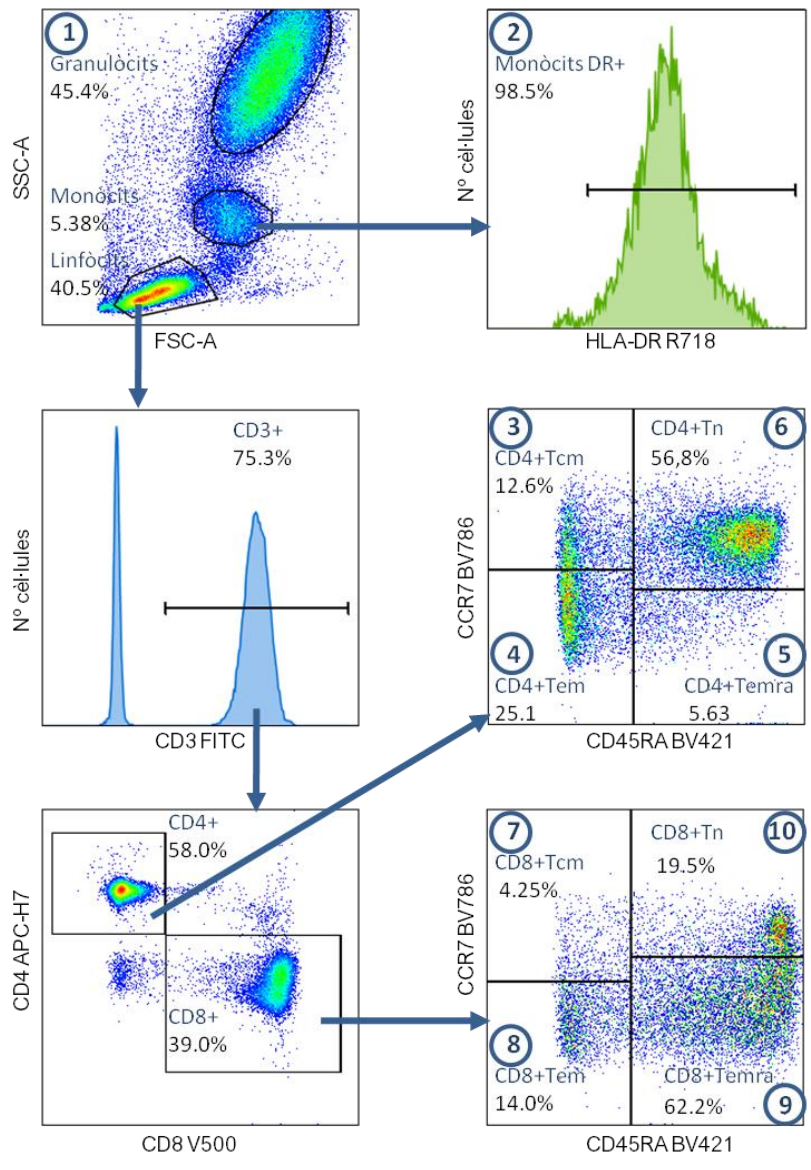
Posteriorment, de les poblacions de granulòcits, monòcits HLA-DR+, CD4+Tcm, CD4+Tem, CD4+Temra, CD4+Tn, CD8+Tcm, CD8+Tem, CD8+Temra i CD8+Tn, es va analitzar l'expressió dels marcadors de superfície CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 (Fig 10).

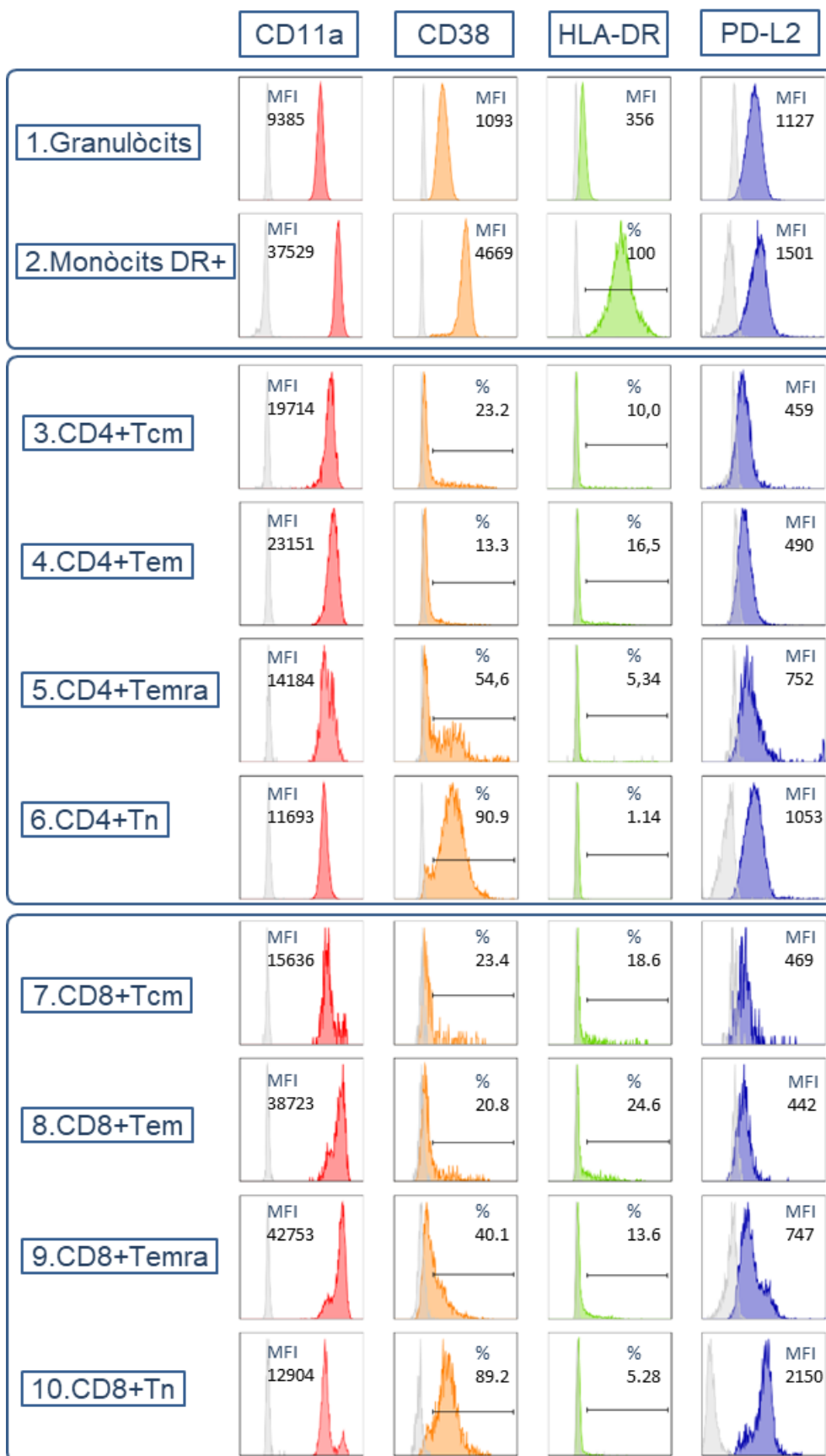
Figura 10. Anàlisi de subpoblacions en sang perifèrica

a) Taula de identificació ó de subpoblacions limfocitàries en sang.

Nº	Nom	FSC/SSC	HLA-DR	CD3	CD4	CD8	CCR7	CD45RA
1	Granulòcits	Alt/Alt						
2	Monòcits DR+	Mig/Mig	+					
	Limfòcits TCD3+	Baix/Baix		+				
	Limfòcits TCD4+			+	+	-		
	Limfòcits TCD8+			+	-	+		
3	Limfòcits TCD4+Tcm			+	+	-	+	-
4	Limfòcits TCD4+Tem			+	+	-	-	-
5	Limfòcits TCD4+Temra			+	+	-	-	+
6	Limfòcits TCD4+Tn			+	+	-	+	+
7	Limfòcits TCD8+Tcm			+	-	+	+	-
8	Limfòcits TCD8+Tem			+	-	+	-	-
9	Limfòcits TCD8+Temra			+	-	+	-	+
10	Limfòcits TCD8+Tn			+	-	+	+	+

b) Estrategia per la selecció de subpoblacions on es determinarà l'expressió de marcadors d'activació





c) Estratègia d'anàlisi dels marcadors CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2

Figura MM3. Estratègia d'anàlisi de les subpoblacions en sang perifèrica.

3.9 Obtenció i cultiu de cèl·lules mononuclears

Les cèl·lules de sang perifèrica (PBMCs de l'anglès *peripheralblood mononuclear cells*) es van obtenir per centrifugació en gradient de densitat ficoll-HyPaque PREMIUM 1.073 g/ml, mitjançant el següent procediment realitzat en campana de flux en condicions d'esterilitat: es va atemperar el Ficoll i es va diluir la sang 1:1 en sèrum fisiològic (SF). Posteriorment es va dispensar 9mL de Ficoll en un falcon de 50 mL i sobre ell 18mL de la sang diluïda poc a poc per evitar la formació de turbulències. A continuació, el tub es va centrifugar a 2000 rpm durant 20 min a 20°C en condicions de velocitat màxima d'acceleració i mínima de desceleració. A continuació es va aspirar la interfase on es troben els PBMCs amb una pipeta, minimitzant l'aspiració de Ficoll i es van rentar amb medi RPMI suplementat amb glutamina, penicil·lina i estreptomina. El pelet cèl·lular, que es va obtenir al centrifugar a 2000 rpm durant 10 min a 20°C, es va resuspendre en 2mL de RPMI complet que conté 10% de suero AB humà descomplementat (Ref. H3667, SigmaAldrich) L-glutamina, penicil·lina i estreptomina.

Pel cultiu es va ajustar la concentració de les cèl·lules a 10×10^6 PBMCs/mL. El càlcul de la concentració de PBMCs es va realitzar amb la càmera *Newbauer* i per tal de comptar cèl·lules vives es va fer servir la tinció vital amb Tripan Blue (Ref.5525-900-CI, Corning).

Prèviament a la realització dels cultius, els diferents estímuls es van reconstituir seguint les instruccions del fabricant, es van aliquotar i es van congelar a -80°C.

➔ **PepTivator SARS-CoV-2: prot-S** (PepTivator SARS-CoV-2 Prot-S. Ref.130-126-700, Miltenyi), **prot-M** (PepTivator SARS-CoV-2 Prot-M.Ref.130-126-700, Miltenyi) i **prot-N** (PepTivator SARS-CoV-2 Prot-S.Ref.130-126-698, Miltenyi) contenen polipèptids amb seqüències de 15 aminoàcids (aa) de longitud que es

solapen 11 aa i que cobreixen la seqüència immunodominant de la proteïna S, la proteïna completa M i la proteïna completa N de SARS-CoV-2.

➔ **Phytohemagglutinin PHA-M (PHA):** El PHA (Ref.L8923, Sigma-Aldrich) es un conjunt de glicoproteïnes procedents de *Phaseolous vulgaris*, que promou l'activació dels limfòcits.

Per a l'activació, es van dispensar 200µL de PBMCs a una concentració de 10×10^6 PBMCs/mL a 5 tubs i seguidament es va dispensar l'estímul corresponent a cada tub:

TubDMSO: Control negatiu d'estimulació amb 4µL de DMSO al 20%.

Tub S: 4µL de proteïna S de SARS-CoV-2 de la solució estoc a 50µg/mL. Concentració d'estímul final a 1µg/mL.

Tub M: 4µL de proteïna M de SARS-CoV-2 de la solució estoc a 50µg/mL. Concentració d'estímul final a 1µg/mL.

Tub N: 4µL de proteïna S de SARS-CoV-2 de la solució estoc a 50µg/mL. Concentració d'estímul final a 1µg/mL.

Tub PHA: 4µL de la solució estoc a 0,5mg/mL. Concentració d'estímul final a 10µg/mL.

Els cultius de PBMCs en presència dels estímuls o de DMSO, es van incubar durant 24h en una estufa a 37°C i 5% CO₂.

Al finalitzar el cultiu, es van centrifugar els tubs a 2.000rpm a T/A durant 10min. El sobrenedant es va congelar a -80°C per a la determinació de la producció de citocines. Les cèl·lules es van resuspendre en 50µL de tampó FACSFlow.

3.10 Anàlisi del fenotip de cèl·lules mononuclears del cultiu

Tinció de superfície de PBMCs i adquisició amb el citòmetre de flux, es va retolar 1 tub de citometria amb la ID per a cada pacient i condició d'estimulació, posteriorment es va dispensar al fons de cada tub 5µL de 7AAD, i els següents anticossos monoclonals: 20µL d'anticòs anti-CD3, 5µL d'anticòs anti-CD4, 5µL d'anticòs anti-CD8, 5µL d'anticòs anti-CD45RA, 5µL d'anticòs anti-CCR7, 5µL d'anticòs anti-CD38, 5µL d'anticòs anti-CD11a, 5µL d'anticòs anti-HLA-DR, 5µL d'anticòs anti-PD-L2, 20µL

d'anticòs anti-CD137 i 5µL d'anticòs anti-CD134. Es van dispensar 50µL de PBMCs i es va agitar suaument per barrejar els anticòssos i les cèl·lules. Després es van incubar 15min a T/A en condicions de foscor. Les cèl·lules es van rentar amb 2mL de tampó FACSFlow i es van centrifugar a 2000rpm 5 min a T/A, les cèl·lules es van resuspendre en 300µL de tampó FACSFlow. Posteriorment es van adquirir amb el citòmetre BD FACSlyric fent servir el protocol TPRONCOV PBMCs. Per a cada pacient es van adquirir 250.000 events totals.

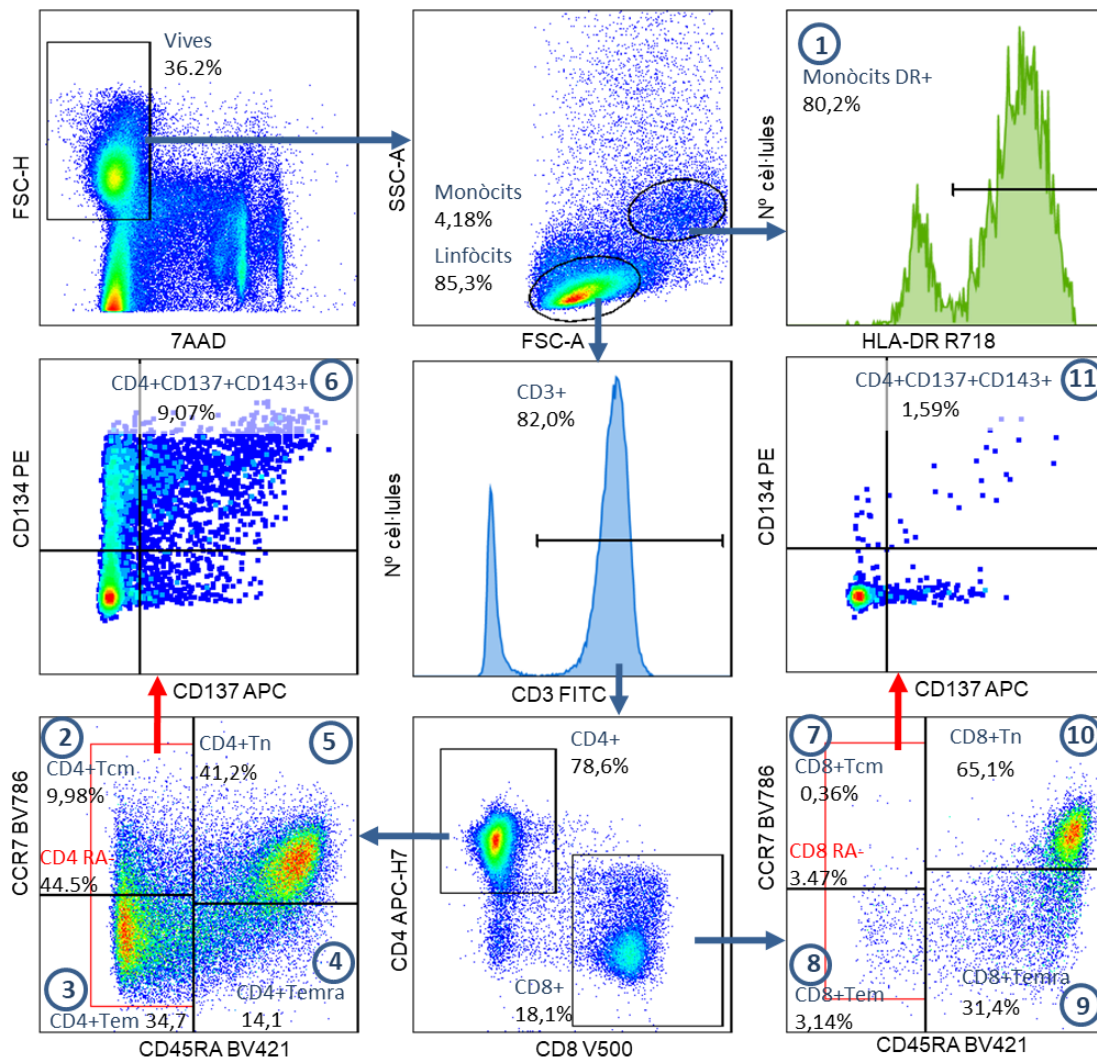
Anàlisi de les poblacions mitjançant FlowJo: Mitjançant el software FlowJo es van seleccionar les poblacions a estudi seguint la següent estratègia d'anàlisi (FIG MM5): Primerament es van excloure els dobles mitjançant un plot bidimensional amb el FS-H a l'eix de les ordenades i FS-A a l'eix de abscisses (anàlisi no mostrat), posteriorment les cèl·lules positives per a 7AAD (mortes) es van excloure de l'anàlisi, i es van seleccionar les poblacions de monòcits i limfòcits segons la seva complexitat citoplasmàtica (eix SSC-A) i el seu tamany (eix FSC-A).

L'anàlisi va ser similar al de les cèl·lules de sang perifèrica. A més a més, aquí dels limfòcits CD4+ i els CD8+ es van seleccionar els limfòcits de memòria CD45RA- i d'aquests, segons l'expressió CD134 i CD137, els activats en resposta a l'estímul durant el cultiu. (Fig 11).

a) Taula de identificació de subpoblacions limfocitàries en PBMCs.

Nº	Nom	FSC/SSC	7AAD	HLA-DR	CD3	CD4	CD8	CCR7	CD45RA	CD134	CD137
	Vives		-								
1	Monòcits DR+	Mig/Mig	-	+							
	Limfòcits TCD3+	Baix/Baix	-		+						
	Limfòcits TCD4+		-		+	+	-				
	Limfòcits TCD4+CD45RA-		-		+	+	-		-		
2	Limfòcits TCD4+Tcm		-		+	+	-	+	-		
3	Limfòcits TCD4+Tem		-		+	+	-	-	-		
4	Limfòcits TCD4+Temra		-		+	+	-	-	+		
5	Limfòcits TCD4+Tn		-		+	+	-	+	+		
6	Limfòcits TCD4+CD45RA-CD134+CD137+		-		+	+	-		-	+	+
	Limfòcits TCD8+		-		+	-	+				
	Limfòcits TCD8+CD45RA-		-		+	-	+		-		
7	Limfòcits TCD8+Tcm		-		+	-	+	+	-		
8	Limfòcits TCD8+Tem		-		+	-	+	-	-		
9	Limfòcits TCD8+Temra		-		+	-	+	-	+		
10	Limfòcits TCD8+Tn		-		+	-	+	+	+		
11	Limfòcits TCD8+CD45RA-CD134+CD137+		-		+	-	+		-	+	+

b) Estratègia d'anàlisi de les sub poblacions limfocitàries en PBMCs.



c) Anàlisi de l'expressió dels marcadors d'activació

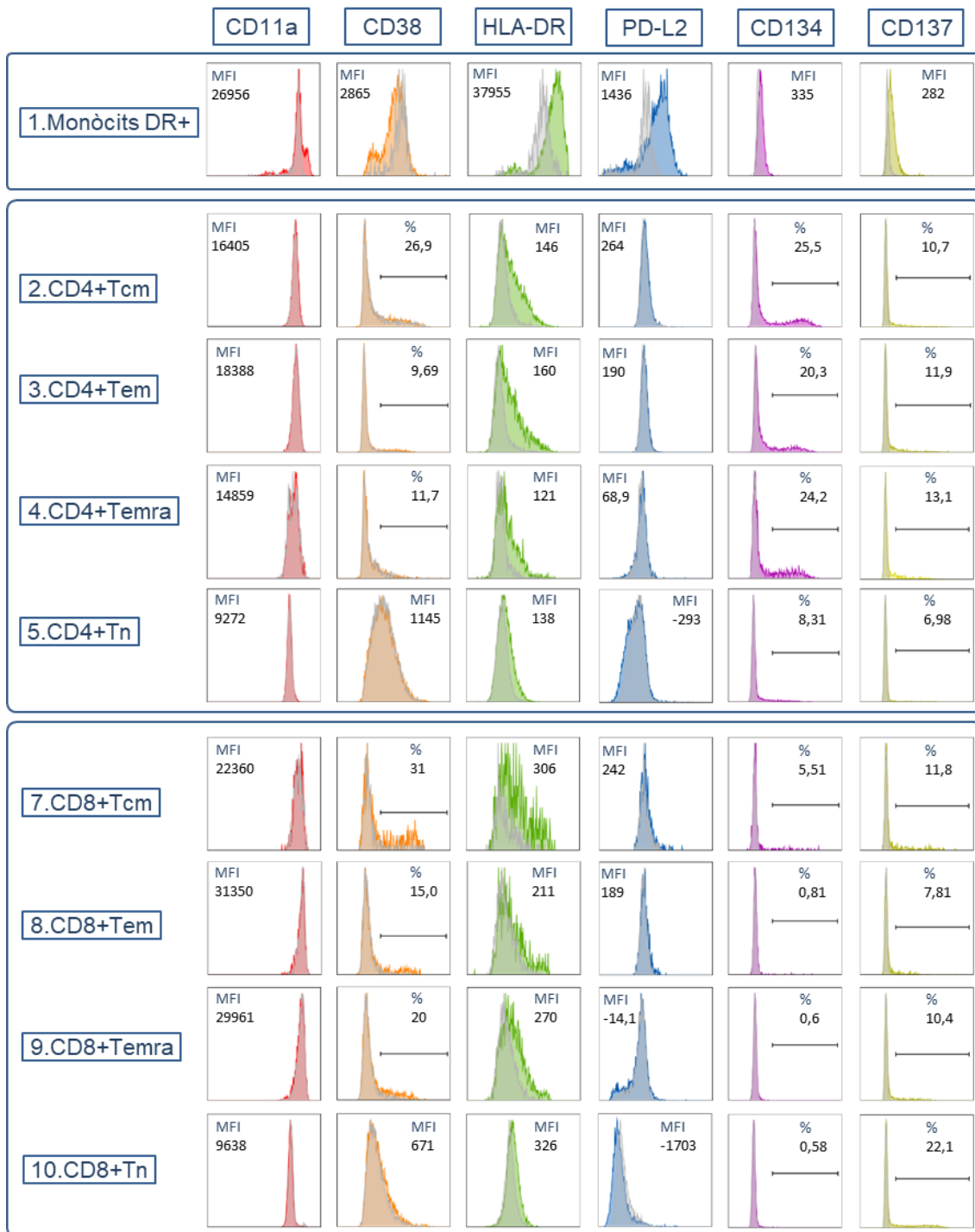


Figura 11. Anàlisi de les subpoblacions en PBMCs.

Determinació de citocines al sobredant dels cultius

Es va determinar la producció de 8 citocines als sobredant dels cultius de PBMCs en presència dels diferents estímuls. Els nivells de CD40L, IFN γ , IL-10, IL-13, Granzim B, IL-4, IL-12/23p40 i IL17/17A es van determinar mitjançant el kit *Luminex human*

discovery assay (8-plex) (Ref. LXSAHM-08, Bio techne) amb l'analitzador Luminex (*Diagnostica Longwood*).

El mètode per determinar les citocines al sobrenedant dels cultius consisteix en un ELISA sandvitx multiplex amb micropartícules magnètiques fluorescents. Les micropartícules magnètiques fluorescents específiques per a cada analit es troben recobertes d'anticossos de captura específics de l'analit, cada tipus de micropartícula presenta una intensitat de color diferent que permet la seva diferenciació de la resta.

Configuració de l'assaig al Luminex, prèviament a la realització de l'assaig es van introduir a l'analitzador la configuració de les mostres a la placa ([Taula 7.](#)), la identificació de les mostres, les regions de les micropartícules a analitzar per a cada analit i els valors de concentració dels estàndards corresponents als analits a determinar.

Taula 7. Paràmetres de la configuració de l'assaig Luminex, en la determinació de citocines al sobrenedant dels cultius

Analit	Regió	Corba estàndar (pg/mL)	Sensibilitat (pg/mL)
CD40L	74	206 - 50000	34,7
Granzim B	57	19,3 - 4700	1,42
IFN- γ	29	49,4 - 12000	0,4
IL-4	39	17,3 - 4200	9,3
IL-10	22	4,12 - 1000	1,6
IL-12/23p40	67	477 - 115000	35,2
IL-13	47	453 - 110000	36,6
IL17/17A	42	13,2 - 3200	1,8

Preparació dels reactius, calibradors i mostres, prèviament a l'inici del processament es van preparar els següents reactius: Es va temperar i posteriorment es va diluir el tampó de rentat 1:25 en dH₂O. Es va reconstituir el diluent dels calibradors RD6-52 seguint les especificacions del fabricant, per tal d'obtenir el diluent de calibrador 10x. Es va generar el mix de estàndards combinant 100 μ L de cada vial

de estàndard, finalment es van dispensar 400µL de diluent de estàndard per obtenir un volum final de estàndard 1 d'1mL. A continuació es van realitzar les dilucions seriadades dels 6 estàndards, 1:2 en diluent de calibradors (Fig 12). Es va diluir el còctel d'anticossos biotinilats afegint 5mL de Diluent RD2. Es va diluir la estreptavidina-PE afegint 5.35 mL de tampó de rentat. Es va diluir el còctel de micropartícules afegint 5mL de diluent RD2, i es van mantenir els vials de les micropartícules i la estreptavidina-PE protegits de la llum fins el seu us. Les mostres es van diluir seguint les instruccions del fabricant: 75µL de sobrenedant de cultiu en 75µL de diluent de calibrador RD6-52.

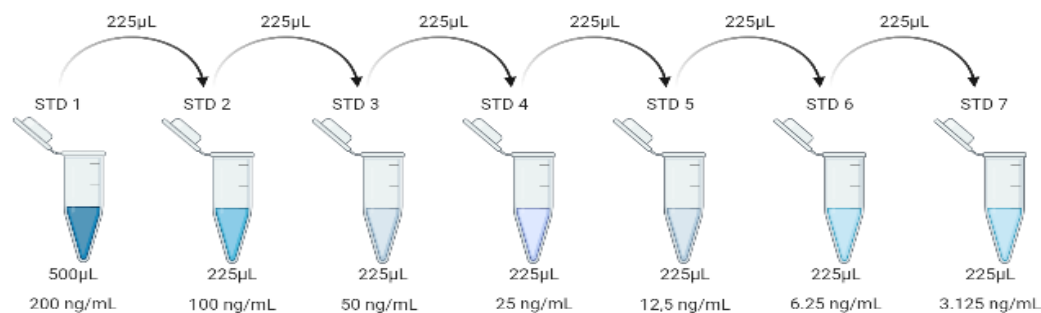


Figura 12. Dilucions seriadades per a la preparació de la corba estàndard Luminex

Procediment de l'assaig, primer es van dispensar 50µL dels estàndards i de les mostres als pouets corresponents, seguint la distribució de la placa programada al Luminex. A continuació es van dispensar 50µL del còctel de micropartícules a cada pouet de la placa. Es va tancar i incubar la placa durant 2h a T/A en un agitador orbital horitzontal. Posteriorment es va dipositar la placa en el suport magnètic durant 1min, per realitzar 3 vegades el rentat de la placa amb 100µL/pouet de tampó de rentat. Seguidament es van dispensar 50µL del còctel d'anticossos biotinilats a tots els pouets de la placa. Posteriorment es va dipositar la placa en el suport magnètic durant 1min, per realitzar 3 vegades el rentat de la placa amb 100µL/pouet de tampó de rentat. A continuació es va dipositar la placa en el suport magnètic durant 1min i es va realitzar 3 vegades el rentat de la placa amb 100µL/pouet de tampó de rentat. Després es van dispensar 50µL de estreptavidina-PE a tots els pouets de la placa. Es va tancar i

incubar la placa durant 30min a T/A en un agitador orbital horitzontal. Posteriorment es va dipositar la placa en el suport magnètic durant 1min, per realitzar 3 vegades el rentat de la placa amb 100µL/pouet de tampó de rentat. Finalment es van resuspendre les micropartícules amb 100µL de tampó de Rentat, i es van incubar 2min a T/A en un agitador orbital horitzontal. Per finalitzar, es va realitzar la lectura en el Luminex dintre dels següents 90min.

Càlcul dels resultats, A les lectures dels estàndards i les mostres es van restar la MFI obtinguda del blanc. Es van analitzar els analits que contenien almenys 50 micropartícules a la regió corresponent. Posteriorment amb els resultats de la fluorescència dels estàndards S1 a S6 per duplicat, es va generar una corba patró mitjançant el mètode de 5 paràmetres logístics (5-PL). La quantificació de les mostres es va realitzar mitjançant la extrapolació de la fluorescència obtinguda a la corba patró al software del Luminex, el resultat calculat es va multiplicar per el factor de dilució per obtenir el resultat de cada analit.

3.5 Anàlisi estadística.

3.5.1 Anàlisi univariant

Es va realitzar un anàlisi estadístic univariant de les dades demogràfiques i els paràmetres clínics. Per a les variables qualitatives es va fer servir la prova de khi-quadrat (χ^2) de Pearson considerant significatius p-valors < 0.05. Per a les variables quantitatives es va fer servir el test-t de Student, considerant significatius p-valors < 0.05. En els casos en que les variables no complien criteris de normalitat, el test no paramètric utilitzat va ser U-Mann Withney, considerant significatius p-valors < 0.05.

Per a les comparacions entre mitjanes de les variables quantitatives contínues es va fer servir el test-t de Student, considerant significatius p-valors < 0.05. En els casos en que les variables no complien criteris de normalitat, el test no paramètric utilitzat va ser U-Mann Withney, considerant significatius p-valors < 0.05. En el cas de les variables

aparellades, es va fer servir el test-t de Student per a mostres aparellades, considerant significatius p-valors < 0.05 . Mitjançant el programari estadístic *IBM SPSS Statistics for windows* (versió XXX. Armonk, New York: IBM Corp)

Per a l'estudi de la associació entre de dues variables, una variable quantitativa discreta i una variable qualitativa o de dos variables qualitatives, es va representar mitjançant taules creuades i es va fer servir la prova χ^2 considerant significatius p-valors < 0.05 . En els casos que una o mes freqüències esperades fossin inferior a 5, es va fer servir la prova de Fisher, considerant significatius p-valors < 0.05 .

Per a les comparacions de les mitjanes de variables quantitatives contínues entre 3 o mes grups, es va fer servir l'anàlisi ANOVA (de l'anglès *ANalysis Of VAriance*), considerant significatius p-valors < 0.05 . En els casos on les diferències entre els grups van ser significatives, addicionalment es van analitzar les comparacions post-hoc mitjançant el mètode Bonferroni, considerant significatius p-valors < 0.05 .

3.5.1 Anàlisi multivariant

Per a l'estudi de la correlació de diverses variables quantitatives entre dos grups, es va representar la relació mitjançant correlogrames fent servir l'anàlisi R (*cran.r-project.org*). Amb les matrius de correlació es va realitzar el test de Mantel per comparar la quantitat de diferències entre dos grups, considerant significatius p-valors < 0.05 .

Per a la identificació dels factors pronòstics dels pacients COVID-19 moderats o greus, es va fer servir el model de regressió de Cox. Primer es va determinar la Hazard Ratio (HR), per a cada factor sense ajustar, dels paràmetres paraclínic inflamatoris i immunològics a T0. Es van incloure els paràmetres serològics, poblacions hematològiques, subpoblacions limfocitàries, marcadors de leucòcits, marcadors de subpoblacions CD4 i els marcadors de subpoblacions CD8 a T0. Després, mitjançant l'anàlisi ajustat i seguint la metodologia pas a pas, es van seleccionar les variables

mitjançant exclusió seqüencial. Finalment, per quantificar el risc en el temps associat a la presència d'una variable es van calcular les HR amb un interval de confiança del 95%. A continuació, es va estudiar la implicació de les variables sobre desenvolupar una malaltia COVID-19 moderada o greu, amb arbres de decisió mitjançant el mètode CHAID (de l'anglès *Chi-square automatic interaction detector*), que permet la detecció automàtica de les interaccions mitjançant χ^2 , fent servir a cada pas la variable independent, o predictora, que presenta la interacció més forta amb la variable dependent (gravetat). El model exclou de forma automàtica les variables que no contribueixin significativament sobre la variable dependent, i amb el que es va obtenir un arbre de decisions. Considerant significatius p-valors < 0.05.

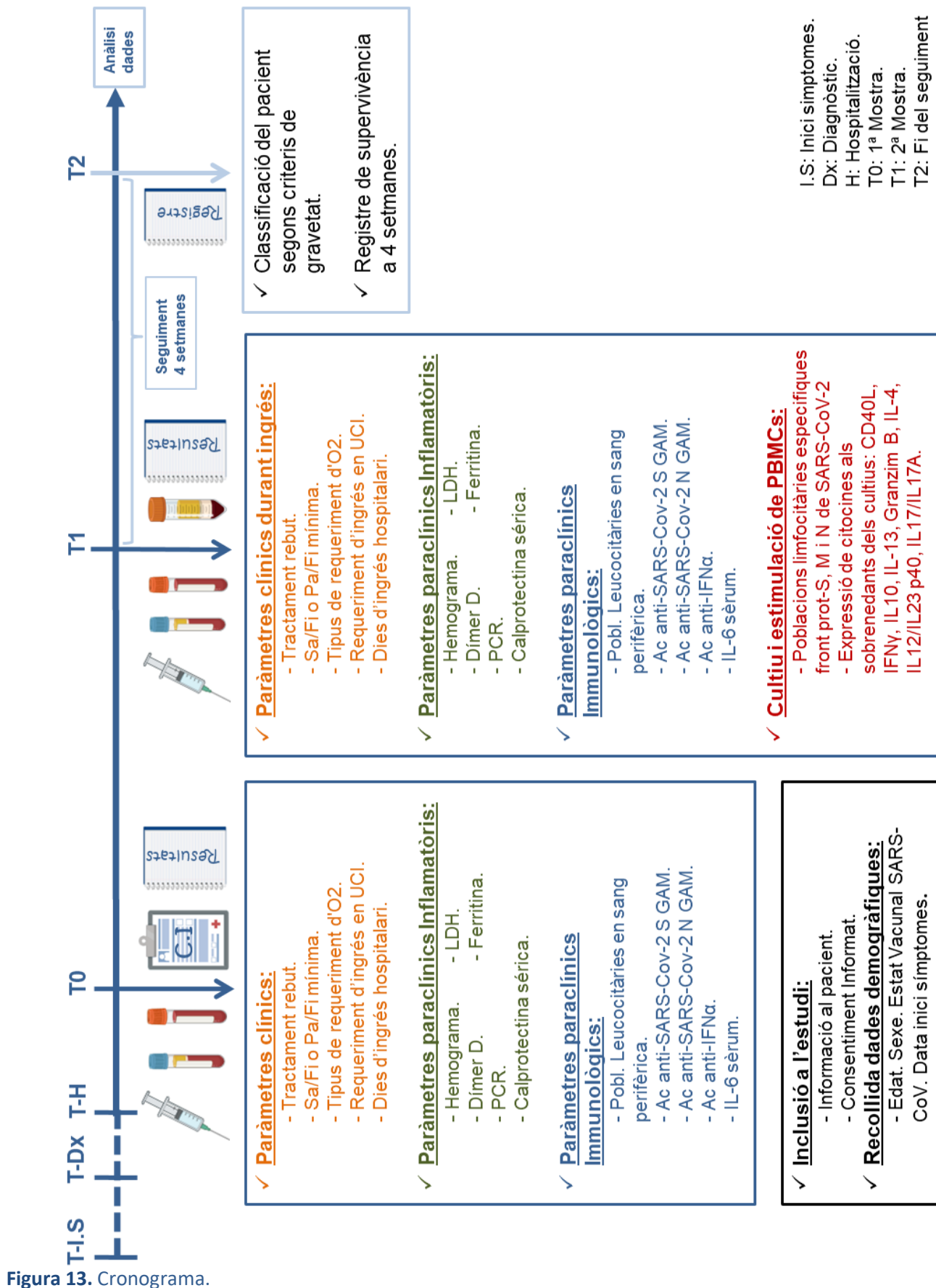
3.6 Pla de treball, cronograma

A l'estudi es van incloure 47 pacients hospitalitzats a l'hospital universitari ParcTaulí a causa de la infecció per SARS-CoV-2. La inclusió de pacients va tenir lloc durant el període comprès entre Abril i Novembre de 2021. Prèviament a la seva inclusió, es va informar els pacients i van signar voluntàriament el consentiment informat. Posteriorment es van recollir i registrar les dades demogràfiques i els paràmetres clínics a l'ingrés. Als pacients se'ls hi van realitzar dues extraccions de sang perifèrica, el dia 1 (T0) i el dia 11 post inclusió de l'estudi (T1) (Figura MM8). Es van incloure un màxim de 4 pacients per dia. Les mostres van ser enviades el mateix dia de l'extracció al laboratori d'Immunologia i es va iniciar el seu processament dintre de les 6 hores posteriors a la seva extracció. Les determinacions incloses en el catàleg de rutina del laboratori, es van analitzar el mateix dia de l'extracció. Per a l'anàlisi de la resta de paràmetres, es van realitzar alíquotes de sèrum i es van mantenir a -80°C fins ser analitzades. A les mostres T0 es van analitzar els paràmetres paraclítics inflamatoris i paraclítics immunològics. A les mostres T1, a més, es va realitzar el cultiu i l'estímul dels PBMCs per a l'estudi de les poblacions limfocitàries específiques front les proteïnes S, M, i N de SARS-Cov-2. En tots els casos, el cultiu dels PBMCs es va

realitzar el mateix dia de la extracció T1, dintre de les 6 hores posteriors a la extracció de la mostra. Durant el temps que els pacients van requerir hospitalització, es van registrar els paràmetres clínics rellevants. Es va fer un seguiment durant 4 setmanes de la evolució dels pacients després de rebre l'alta hospitalària. Una vegada finalitzat el període de seguiment, es va registrar la supervivència i es van classificar als pacients segons els criteris de gravetat com pacient d'evolució moderada de la infecció per SARS-CoV-2 o com pacient d'evolució greu de la infecció per SARS-CoV-2.

A l'estudi es van incloure 16 controls sans. Prèviament a la seva inclusió, es va informar els participants i van signar voluntàriament el consentiment informat. D'aquests es va obtenir una mostra de sang perifèrica en el moment de la inclusió a l'estudi (T0). El processament i anàlisi de les mostres es va realitzar de la mateixa manera que els pacients.

Finalment, quan es van registrar totes les dades clíniques i paraclíniques dels pacients i dels controls es van analitzar les dades obtingudes.



4. RESULTATS

Descripció dels pacients COVID-19 i grup control

Primer de tot, es van recollir variables descriptores amb les característiques rellevants dels pacients. En conjunt, descriuen la cohort d'estudi, formada per 47 pacients infectats per SARS-CoV-2 i hospitalitzats al HUPT(Taula R1). Les variables descriptores es van agrupar en tres categories:

- a) La primera inclou els demogràfics i característiques dels pacients prèvies a la hospitalització: edat, sexe, antecedents previs, tractament immunosupressor previ i estat vacunal previ a la hospitalització.
- b) A banda de l'evolució moderada o greu de la COVID-19, variable dependent del nostre estudi, aquesta segona categoria inclou les característiques descriptives del evolució de la COVID-19 durant la hospitalització: símptomes pre-hospitalització, Índex de risc a l'ingrés, SaFimínima observada, requeriment d'oxigen, tractament rebut, requeriment UCI.
- c) La tercera inclou les característiques relatives als períodes de temps rellevants del evolució de la COVID-19, de l'hospitalització de la línia temporal de l'estudi.

A més a més de la durada hospitalització i UCI, conté temps des de:

- l'inici de símptomes fins al diagnòstic
- l'inici de símptomes fins la hospitalització
- l'inici de símptomes fins la inclusió a l'estudi
- la inclusió a l'estudi fins la primera extracció
- la primera extracció fins la segona extracció
- l'inici de símptomes fins la primera extracció
- l'inici de símptomes fins la segona extracció
- hospitalització fins la primera extracció
- diagnòstic fins la primera extracció
- hospitalització fins l'ingrés en UCI
- la segona extracció fins l'alta hospitalària.

El 72% dels pacients inclosos son majors de 45 anys. La proporció de sexes es de 0.96. Dotze pacients presenten antecedents patològics previs diferents dels

considerats com criteris d'exclusió de l'estudi, i d'aquests, dos pacients presenten més d'un antecedent patològic (un pacient presenta ETC i DM, i l'altre CI i DM). L'antecedent patològic més freqüent es la DM, i el 14.9% dels pacients inclosos són diabètics. Els dos pacients amb antecedents ETC presenten tractament immunosupressor previ amb corticoides. Nou pacients han rebut vacuna basada en adenovirus i 11 vacuna basada en mRNA.

Dels símptomes més freqüents durant l'evolució de la COVID-19, més del 85% dels pacients presenten tos, febre o dispnea. Mentre que els símptomes que presenten menys del 25% dels pacients són: diarrea, anòsmia o agèusia. El perfil de comorbiditat dels pacients a l'ingrés es majoritàriament baix. Un terç dels pacients inclosos va presentar una COVID-19 greu. Entre els pacients greus, s'observa que únicament un pacient no va requerir UCI, tot i rebre oxigenoteràpia d'alt flux OAF. El 77% dels pacients moderats va requerir oxigenoteràpia de baix flux (UN o VMK). Tots els pacients van rebre tractament amb corticoides. Dos terços dels pacients ja havien rebut l'alta hospitalària en el moment de realitzar la segona extracció de sang (T1), dels que set van rebre l'alta el mateix dia de la segona extracció.

Es va incloure un grup control, format per 16 voluntaris sans, amb característiques demogràfiques similars als pacients. En conseqüència, la distribució per sexe entre pacients i controls era comparable. També, era similar la distribució per sexes del grup control i el grup de pacients amb evolució greu de la COVID-19 (7 dones, 9 homes) i el grup de pacients amb evolució moderada de la COVID-19 (17 dones, 14 homes).

No s'observen diferències significatives entre la mitjana d'edat del grup control (53.94 ± 4.58) i la del grup de pacients COVID-19 (50.08 ± 2.11). No s'observen diferències significatives entre la mitjana d'edat del grup control respecte de la mitjana d'edat del grup de pacients amb una evolució greu (53.57 ± 3.96) i el de moderada de la COVID-19 (48.27 , $EEM \pm 2.44$).

Taula 8. Característiques rellevants dels pacients.

		Nº Pacients	% Pacients
Edat (50.8 ± 2.11)	< 45 anys	13	27.66
	45 a 65 anys	25	53.19
	> 65 anys	9	19.15
Sexe	Home	23	48.94
	Dona	24	51.06
Antecedents	No antecedents patològics	36	76.60
	Si antecedents patològics	11	23.40
	Cardiopatia Isquèmica	2	4.26
	MPOC	1	2.13
	Malaltia teixit conjuntiu	3	6.38
	Diabetes Mellitus Controlada	4	8.51
Immunosupressor previ	No timent	45	95.74
	Cortis	2	4.26
	Diabetes Mellitus lesió orgànica	3	6.38
Estat vacunal	No Vacunats	27	57.45
	Si Vacunats	20	42.55
	Janssen	3	6.38
	Astra Zeneca	6	12.77
	Pfizer	11	23.40

		Nº Pacients	% Pacients
Síntomes previs a hospitalització	Tos	43	91.49
	Febre	47	100.00
	Dispnea	40	85.11
	Diarrea	11	23.40
	Anòsmia	8	17.02
	Ageusia	6	12.77
Índex de risc a l'ingrés	Índex Comorbilitat Baix (0 a 2)	38	80.85
	I. Charlson modificat =0	27	57.45
	I. Charlson modificat =1	7	14.89
	I. Charlson modificat =2	4	8.51
	Índex Comorbilitat Alt (3 a 6)	9	19.15
	I. Charlson modificat =3	5	10.64
	I. Charlson modificat =4	0	0.00
	I. Charlson modificat =5	3	6.38
Gravetat	COV-Moderat	31	65.96
	COV-Greu	16	34.04
PaO ₂ /FiO ₂ mín (mmHg) (298.87 ± 17.87)			
Requeriment d'oxigenoteràpia	No requeriment de O ₂	7	14.89
	Si requeriment de O ₂	40	85.11
	Ulleres Nasals (UN)	9	19.15
	Ventimask (VMK)	15	31.91
	Ulleres d'alt fluxe (OAF)	13	27.66
Tractament hospitalització	Ventilació Mecànica (VM)	3	6.38
	Corticoids	26	55.32
	Corticoids +Tocilizumab	21	44.68
	Antivíric (Remdesivir)	9	19.15
Requeriment de UCI	Antibiotic	23	48.94
	Si	15	31.91
Condicions de la Mostra T1	No	32	68.09
	Mostra T1 Hospitalitzat	12	30.77
Seguiment (4setmanes)	Mostra T1 post ALTA	27	69.23
	Favorable	46	97.87
	Exitus	1	2.13

		Nº Pacients	% Pacients
Temps de TIs a TDx (dies)		2.51	0.45
Temps de TIs a TH (dies)		6.64	0.44
Temps de TIs a Tinc (dies)		8.04	0.39
Temps de Tinc a T0 (dies)		0.66	0.10
Temps de T0 a T1 (dies)		11.54	0.52
Temps de TIs a T0 (dies)		8.70	0.41
Temps de TIs a T1 (dies)		20.49	0.33
Temps de TH a T0 (dies)		2.06	0.19
Temps de TDx a T0 (dies)		6.19	0.47
Temps de TH a ingrés UCI (dies)		3.13	0.49
Durada hospitalització (dies)		11.55	1.53
Durada ingrés en UCI (dies)		3.70	1.00
Temps de T1 a Alta (dies)		-0.74	1.76

a) *Demogràfics i característiques dels pacients prèvies a la hospitalització.* b) *Característiques descriptives del evolució de la COVID-19.* c) *Característiques relatives als períodes de temps rellevants.* ^A*Mitjana en anys,* ^B*EEM error estandard de la mitjana,* ^C*SaFiminima observada durant el periode d'hospitalització.* *MPOC malaltia pulmonar obstructiva crònica. TIs Inici de símptomes, TDx diagnòstic, TH hospitalització, Tinc inclusió, T0 primera extracció, T1 segona extracció, UCI unitat cures intenses.*

Relació entre les característiques dels pacients

Primer de tot, no s'observa diferències a nivell de sexes en cap de les variables descriptores. En canvi, tal i com era esperable, els pacients amb antecedents previs tenen una edat mitjana significativament superior respecte als que no presenten antecedents previs (45.35 ± 1.97 i 65.55 ± 3.39 respectivament. $p < 0.001$). Els pacients vacunats presenten una mitjana d'edat significativament superior als que no han rebut cap dosi de la vacuna (56.58 ± 2.82 i 45.25 ± 2.69 respectivament. $p = 0.003$). La proporció de pacients amb antecedents previs que han estat vacunats es major que els pacients sense antecedents previs ($p = 0.035$). La proporció de pacients amb antecedents previs que presenten un índex de risc a l'ingrés elevat es major que els pacients sense antecedents previs ($p < 0.001$).

Les característiques prèvies a l'hospitalització poden tenir influència sobre dels paràmetres clínics o de resposta immunològica, i modificar la història natural de la COVID-19 als pacients hospitalitzats. Per tant, es va analitzar la relació existent entre les característiques prèvies i les variables de l'evolució de la COVID-19, i els períodes de temps de l'evolució ([Taula 9](#)).

A banda dels resultats recollits a la taula 9, es va trobar que els pacients amb tractament corticosteroide combinat amb tocilizumab presenten una mitjana d'edat significativament superior als que sols han rebut corticosteroides durant la hospitalització (54.27 ± 3.6 vs 46.69 ± 2.31 , $p = 0.043$). Els pacients sense antecedents

prèvis presenten majoritàriament index de risc baix mentre que els pacients amb antecedents previs presenten un index de risc alt ($p < 0.001$).

Taula 9. Relació entre les característiques rellevants dels pacients greus i moderats

a)

		Antecedents		XiQ
		No AP	Si AP	p
Edat	<45	13	0	<0.001
	45-65	21	4	
	>65	2	7	
Estat Vacunal	No Vacunat	24	3	0.035
	Si Vacunat	12	8	
Index de risc a l'ingrés	Index Charlson Baix (0 a 2)	35	3	<0.001
	Index Charlson Alt (3 a 6)	1	8	

	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t
	Antecedents						Test-t
	NO			SI			p
Edat	36	45.35	1.97	11	65.55	3.39	<0.001
	Estat Vacunal						Test-t
	NO			SI			p
Edat	27	45.25	2.69	20	56.58	2.82	0.003
	Tractament hospitalització						Test-t
	C			C+T			p
Edat	26	46.69	2.31	21	54.27	3.60	0.043*

b)

		Gravetat		XiQ
		COV-Mod	COV-Gre	p
Index de risc a l'ingrés	Index Charlson Baix (0 a 2)	28	10	0.045
	Index Charlson Alt (3 a 6)	3	6	
Requeriment de UCI	No	31	1	<0.001
	Si	0	15	
Requeriment O2	UN o VMK	24	0	<0.001
	OAF o VM	0	16	
Tractament Hospitalització	Corticoids	24	2	<0.001
	Corticoids+Tocilizumab	7	14	
	Tocilizumab No	24	2	
	Tocilizumab Si	7	14	
	Antibiotic No	22	2	
	Antibiotic Si	9	14	
	Tractament Hospitalització			XiQ
	C		C+T	p
Index de risc a l'ingrés	Index Charlson Baix (0a2)	25	13	0.006
	Index Charlson Alt (3a6)	1	8	
Requeriment de UCI	No	24	8	<0.001
	Si	2	13	
Requeriment O2	No	7	0	0.012
	Si	19	21	
	UN o VMK	17	7	
	OAF o VM	2	14	
Tractament Hospitalització	Tocilizumab No	26	0	<0.001
	Tocilizumab Si	0	21	
	Antibiotic No	20	4	
	Antibiotic Si	6	17	
Gravetat	Moderat	24	7	<0.001
	Greu	2	14	

	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t
	Gravetat						p
	COV-Mod			COV-Gre			
SAFPAFMIN	31	374.16	12.63	16	153.00	10.42	<0.001*
	Tractament hospitalització						p
	C			C+T			
SAFPAFMIN	26	377.12	19.18	21	202.00	15.07	<0.001

	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t
	Antecedents						p
	No AP			Si AP			
Temps de Tinc a T0	36	0.75	0.12	11	0.36	0.15	0.047
Temps de TDx a T0	36	6.72	0.50	11	4.45	1.02	0.019
	Gravetat						p
	COV-Mod			COV-Gre			
Temps de Tinc a T0	31	0.90	0.12	16	0.19	0.10	<0.001
Durada ingrés hospitalari	31	6.23	0.60	16	21.88	2.98	<0.001*
Durada ingrés en UCI	31	0.00	0.00	16	10.88	1.96	<0.001*
Temps de T1 a Alta	24	-6.71	0.97	15	8.80	2.99	<0.001*
	Tractament hospitalització						p
	C			C+T			
Temps de TIs a TDx	26	1.73	0.41	21	3.48	0.84	0.036*
Durada ingrés hospitalari	26	7.04	1.20	21	17.14	2.64	0.001*
Durada ingrés en UCI	26	1.42	0.99	21	6.52	1.71	0.007*
Temps de TH a ingrés UCI	2	6.00	0.00	13	2.69	0.44	<0.001*
Temps de T1 a Alta	20	-6.05	1.56	19	4.84	2.73	<0.001

a) Relació entre les variables de interès i els descriptors de la població de pacients. b) Relació entre les variables de interès i els descriptors del evolució de la malaltia. c) Relació entre les variables de interès i els diferents períodes de temps o les variables quantitatives que s'analitzen amb l'estadístic test-t de student. XiQ: test estadístic Xi-Quadrat. p: p-valor. En les taules amb un o mes valors inferiors a 5, el test estadístic utilitzat ha estat la prova exacta de Fisher. AP: antecedents patològics. VAC: vacunat. COV-Mod: pacient COVID-19 amb evolució lleu. COV-Gre: pacient COVID-19 amb evolució greu de la COVID-19. C: Corticoids. C+T: Corticoids i Tocilizumab. TIs: Inici de símptomes. TH: hospitalització. Tinc: inclusió. T0: primera extracció. T1: segona extracció. UCI: unitat cures intensives. Només es mostren els resultats significatius.

No s'observen diferències en la distribució de la gravetat de la COVID-19 segons les característiques prèvies (edat, sexe, antecedents, i estat vacunal). La proporció de pacients amb malaltia greu que presenten un índex de risc a l'ingrés elevat es major que a la malaltia moderada (p=0.045). Cap dels pacients amb malaltia moderada va requerir atenció a la unitat de crítics, OAF o VM durant la seva hospitalització. La

proporció de pacients greus que reben tractament corticosteroid combinat amb tocilizumabo que reben antibiòtics superior significativament a la dels moderats ($p < 0.001$). La mitjana de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ mínima observada durant l'hospitalització dels pacients greus es significativament menor que la dels pacient moderats ($p < 0.001$).

Cap temps analitzat es diferent entre homes i dones. Els pacients amb antecedents previs presenten menys dies entre la inclusió a l'estudi i el diagnòstic fins la primera extracció que els pacients sense antecedents previs ($p = 0.047$ i $p = 0.019$ respectivament).

A l'anàlisi de la relació existent entre les variables de l'evolució de la COVID-19 i els períodes de temps de l'evolució, s'observa que els pacients amb evolució greu de la COVID-19 presenten menys dies entre la inclusió a l'estudi fins la primera extracció i requereixen mes dies d'hospitalització que els pacients amb una evolució moderada de la COVID-19 ($p < 0.001$). Els pacients greus presenten una estada a la unitat de crítics de 10.9 dies mentre que els pacients amb una evolució moderada no han requerit atenció a la unitat de crítics ($p < 0.001$). Als pacients amb una evolució greu de la COVID-19, la segona extracció s'ha realitzat 8.8 dies abans de rebre l'alta hospitalària, mentre que als pacients amb una evolució moderada als 6.7 dies després de l'alta hospitalària ($p < 0.001$). Cap altre període de temps analitzat, es significativament diferent entre els pacients amb evolució greu i els pacients amb evolució moderada de la COVID-19.

A l'anàlisi de la relació existent entre el tipus de tractament rebut durant la hospitalització i els períodes de temps de l'evolució, s'observa que als pacients que han rebut tractament corticosteroid combinat amb tocilizumab el temps entre l'inici de símptomes i el diagnòstic es major que els que han rebut tractament corticosteroid (3.48 ± 0.84 vs 1.73 ± 0.41 , $p = 0.036$). Els pacients que han rebut tractament corticosteroid combinat amb tocilizumabhan estat hospitalitzats i han requerit d'una

atenció en la unitat de crítics durant més temps que els que han rebut tractament corticosteroid (17.14±2.64 vs 7.04±1.20, p=0.001 i 6.52±1.71 vs 1.42±0.99, p=0.007). I han trigat menys dies a requerir atenció en la unitat de crítics que els que han rebut corticosteroid en monoteràpia (2.69±0.44 vs 6.00±0.00, p<0.001). Als pacients tractats amb corticosteroids i tozilizumab, la segona extracció s'ha realitzat 4.84 dies abans de rebre l'alta hospitalària, mentre que als pacients tractats únicament amb corticosteroids es va realitzar 6.7 dies després de l'alta hospitalària (p<0.001).

Comparació pacients greus i moderats al T0(T0)

Després de la inclusió a l'estudi, dintre dels 2 primers dies des de l'hospitalització dels pacients COVID-19, es van determinar:

- a) Paràmetres paraclítics inflamatoris en sèrum. Es van determinar els nivells de les següents variables d'estudi: DD, LDH, PCR, IL-6, CALPS, FerrDones, FerrHomes, Ac anti-IFNs, Ac anti-N i Acanti-S.
- b) Diferents poblacions hematològiques en sang total, tant en percentatge com en nombre absolut en sang total: LEU, NEU, LIM, EOS, BAS, MON.
- c) Subpoblacions leucocitàries i limfocitàries en sang total, tant en percentatge com el seu nombre absolut: CD3, CD4, CD8, CD4Tcm, CD4Tem, CD4Temra, CD4Tn, CD8Tcm, CD8Tem, CD8Temra, CD8Tn.

Les diferències entre el grup de controls sans i el de pacients COVID-19, i entre els pacients amb evolució greu i moderada es van comparar amb el test t de student (Taula 10). També es van comparar els mateixos paràmetres entre el grup de controls sans, el grup de pacients amb evolució greu i el d'evolució moderada mitjançant l'anàlisi ANOVA. Les comparacions múltiples per parelles post-hoc es van analitzar amb el mètode Bonferroni.

Paràmetres serològics

LDH es més elevada en pacients que en controls, i més en pacients greus que en moderats. L'anàlisi dels 3 grups per ANOVA confirma els resultats. També IL-6 es més

elevada en pacients que en controls, però la comparació amb ANOVA i post-hoc mostra que només hi ha diferència entre pacients greus i els altres dos grups. PCR, CALPS, Ferr Dones i Ferr Homes són més elevades en els pacients que en els controls, però comparables entre els greus i els moderats. Es confirmen els resultats per les respectives ANOVAs, donant diferències només entre els dos grups de malalts i els controls. Tot i que els nivells Ac anti-N entre controls i pacients es comparable, els pacients amb COVID-19 moderada presenten nivells més alts que els greus sense que es confirmi per ANOVA. No s'observen diferències significatives dels nivells de DD, Ac anti-IFNs, i Ac anti-S entre el grup de pacients amb evolució greu de la COVID-19 i el d'evolució moderada. Els nivells de DD Ac anti-IFNs, i Ac anti-S no es van determinar en el grup control

Taula 10. Diferències entre controls sans i pacients moderats i greus al T0

a)

Variable d'estudi	Control			COVID			Test-t p	COV-Mod			COV-Gre			p
	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	
Paràmetres serològics														
LDH (U/L)	15	165.27	6.59	47	330.04	12.50	<0.001*	31	306.29	15.54	16	376.06	16.02	0.003
PCR (mg/dl)	16	0.26	0.08	47	6.89	0.82	<0.001*	31	5.74	0.79	16	9.12	1.80	0.050
IL-6 (pg/ml)	16	2.18	0.37	46	74.07	16.91	<0.001*	31	34.47	7.52	15	155.90	43.13	0.007*
CALPS (pg/ml)	16	1.55	0.20	47	6.28	0.45	<0.001*	31	6.33	0.61	16	6.18	0.61	n.s
Ferr Dones (ng/ml)	8	79.81	21.73	24	861.49	145.70	<0.001*	17	760.00	170.24	7	1107.97	277.51	n.s
Ferr Homes (ng/ml)	8	174.54	33.92	23	1244.42	136.10	<0.001*	14	1166.44	160.62	9	1365.73	248.90	n.s
Ac anti-N (Índex)				47	8.99	2.63		31	12.68	3.81	16	1.82	1.04	0.005*
Poblacions Hematològiques														
LEU (x109 cels/L)	10	7.43	0.67	47	8.69	0.50	n.s	31	9.33	0.56	16	7.46	0.91	0.037
NEU (x109 cels/L)	10	3.94	0.47	47	7.07	0.45	0.001	31	7.49	0.52	16	6.27	0.84	n.s
LIM (x109 cels/L)	10	2.67	0.25	47	1.08	0.07	<0.001*	31	1.21	0.08	16	0.82	0.07	<0.001
EOS (x109 cels/L)	10	0.13	0.03	47	0.01	0.00	<0.001*	31	0.01	0.00	16	0.00	0.00	n.s
BAS (x109 cels/L)	10	0.04	0.01	47	0.01	0.00	0.003	31	0.02	0.00	16	0.01	0.00	0.001*
MON (x109 cels/L)	10	0.65	0.03	47	0.52	0.04	0.013	31	0.60	0.05	16	0.36	0.06	0.003
NEU (%)	10	52.30	2.25	47	80.05	1.13	<0.001	31	79.18	1.33	16	81.74	2.07	n.s
LIM (%)	10	36.56	1.95	47	13.66	0.95	<0.001	31	13.99	1.12	16	13.02	1.79	n.s
EOS (%)	10	1.82	0.30	47	0.11	0.04	<0.001*	31	0.14	0.06	16	0.06	0.04	n.s
BAS (%)	10	0.60	0.09	47	0.17	0.02	<0.001	31	0.19	0.03	16	0.13	0.03	n.s
MON (%)	10	9.02	0.59	47	6.01	0.36	<0.001	31	6.50	0.39	16	5.06	0.69	0.028
Subpoblacions Limfocitàries														
CD3 (x109 cels/L)	10	1.78	0.14	47	0.55	0.05	<0.001	31	0.63	0.06	16	0.39	0.06	0.007
CD3 (%)	16	65.72	2.34	47	48.49	1.81	<0.001	31	50.09	1.90	16	45.38	3.82	n.s
CD4 (x109 cels/L)	10	1.16	0.11	47	0.34	0.03	<0.001	31	0.40	0.05	16	0.24	0.04	0.013
CD8 (x109 cels/L)	10	0.54	0.05	47	0.18	0.01	<0.001*	31	0.20	0.02	16	0.14	0.02	0.018
CD4 Tcm (%)	15	12.61	1.12	47	21.86	1.14	<0.001*	31	22.87	1.45	16	19.92	1.77	n.s

b)

	Variable d'estudi	ANOVA p	Bonferroni		
			COV-Mod		COV-Gre
			COV-Gre	Control	Control
Paràmetres serològics	LDH (U/L)	<0.001	0.009	<0.001	<0.001
	PCR (mg/dl)	<0.001	n.s	0.001	<0.001
	IL-6 (pg/ml)	<0.001	<0.001	n.s	<0.001
	CALPS (pg/ml)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	Ferr Dones (ng/ml)	0.009	n.s	0.048	0.010
	Ferr Homes (ng/ml)	<0.001	n.s	0.002	<0.001

Subpoblacions Limfocitàries	CD3 (x109 cels/L)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	CD3 (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	CD4 (x109 cels/L)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	CD8 (x109 cels/L)	<0.001	n.s	<0.001	0.017
	CD4 Temra (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001

	Variable d'estudi	ANOVA p	Bonferroni		
			COV-Mod		COV-Gre
			COV-Gre	Control	Control
Poblacions Hematològiques	NEU (x109 cels/L)	0.005	n.s	0.004	n.s
	LIM (x109 cels/L)	<0.001	0.043	<0.001	<0.001
	EOS (x109 cels/L)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	BAS (x109 cels/L)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	MON (x109 cels/L)	0.005	0.009	n.s	0.021
	NEU (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	LIM (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	EOS (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	BAS (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	MON (%)	<0.001	n.s	0.012	<0.001

*(test no parametric). n/d (no determinat). n/a (no aplica). n.s (resultat no significatiu) El n° de pacients es diferent perquè hi ha determinacions que no s'han pogut realitzar.

Anàlisi de les poblacions hematològiques:

El recompte LEU/L era major en els pacients que en els controls i major en els greus que en els moderats, confirmant-se totes les diferències per ANOVA i post-hoc. Els percentatges de LIM, EOS i BAS, i el recompte EOS/L en els pacients COVID-19 són inferiors als de controls. En canvi el percentatge de NEU i NEU/L en els pacients és superior als controls. Tots aquests valors són comparables entre els pacients d'evolució greu i moderada. L'anàlisi post-hoc de l'ANOVA va confirmar que eren diferents els dos tipus de pacients respecte als controls, però no entre ells. El percentatge de MON i MON/L en els pacients eren inferiors als dels controls i menor en els pacients greus que en els moderats, destacant per post-hoc la diferència entre els pacients greus i els controls. El recompte BAS/L en els pacients eren inferiors als dels controls i menor en els pacients greus que en els moderats, destacant per post-hoc la diferència entre els dos tipus de pacients i els controls, però no entre ells. El recompte LIM/L era menor en els pacients que en els controls i menor en els greus que en els moderats, confirmant-se totes les diferències per ANOVA i post-hoc.

Anàlisi de les subpoblacions limfocitàries

Els pacients amb COVID-19 presenten menys CD3/L, CD4/L i CD8/L i % CD3 que els controls. A més a més, els recomptes absoluts de les tres poblacions són menors en

els pacients greus que en els moderats. Tot i que l'ANOVA confirma les diferències dels recomptes entre controls i els 2 grups de pacients, l'anàlisi post-hoc només confirma que els recomptes absoluts i els % de CD3 dels controls són diferents de pacients greus i de pacients moderats, però no entre ells.

S'observen diferències significatives del percentatge de CD4 Temra entre els controls, pacients greus i moderats, però no entre moderats i greus. En canvi, s'observen diferències del percentatge de CD4Tcm entre pacients i controls, però no entre els dos grups de pacients. L'ANOVA entre els 3 grups no va sortir significativa.

Comparació de l'expressió CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2

Es va determinar l'expressió en membrana dels marcadors CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 als granulòcits i monòcits, així com subpoblacions de limfòcits CD4 i CD8 de memòria en sang perifèrica. Per l'estudi, es va avaluar el percentatge de cèl·lules positives o la MFI (de l'anglès *mean fluorescence intensity*), segons:

a) Si a l'anàlisi de les poblacions mitjançant citometria es diferenciaven dos poblacions, una positiva i una negativa, els marcadors s'expressen com percentatge de la població positiva respecte de la total.

b) Si la majoria de la població (>80%) expressava el marcador, llavors s'expressava com a MFI. Per facilitar la comprensió, les poblacions es van agrupar en tres categories: leucòcits (no limfòcits), subpoblacions de CD4 i subpoblacions CD8.

L'expressió de CD11a està disminuïda en granulòcits, limfòcits CD4 Tcm i Tem i augmentada en els limfòcits CD4 Tn dels pacients COVID-19 respecte als controls. També està disminuïda en limfòcits CD4 Tcm i Tn i els limfòcits CD8 Tcm i Tem dels pacients greus respecte als moderats. L'expressió de CD38 està augmentada en els granulòcits, monòcits, limfòcits CD4 Tcm i Tem i limfòcits CD8Tcm, Tem i Temra, però disminuïda en els limfòcits CD4 Tn dels pacients COVID-19 respecte als controls. En la comparació entre pacients, només l'expressió de CD38 està augmentada en els

monòcits dels greus respecte als moderats. En quant a l'expressió de PD-L2, només es va trobar augmentada a la subpoblació de limfòcits CD4 i CD8 Tcm, Temra i els CD4 Tn dels pacients respecte als controls. No es va trobar cap diferència entre els pacients greus i moderats. Finalment, l'expressió HLA-DR està disminuïda als granulòcits, però augmentada als limfòcits CD4 Tem i CD8 Temra dels pacients respecte als controls. No es va trobar cap diferència entre els pacients greus i moderats.

Taula 11. Diferències de marcadors entre controls sans i pacients moderats i greus a T0

a)

	Variable d'estudi	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t	Control		COVID		Test-t	COV-Mod		COV-Gre		p
									p		p			p				
Leucòcits	GRAN CD11a (MFI)	16	10973.81	419.60	47	9931.74	285.91	0.031	31	10198.77	374.95	16	9414.38	405.66	n.s			
	GRAN CD38 (MFI)	16	904.56	39.92	47	1413.98	54.89	<0.001*	31	1396.39	69.86	16	1448.06	90.09	n.s			
	GRAN HLA-DR+ (MFI)	16	323.82	21.09	35	206.33	14.29	<0.001*	23	220.03	20.29	12	180.08	12.96	n.s			
	MON CD38 (MFI)	16	4798.06	157.67	47	9529.55	316.81	<0.001*	31	9086.94	398.83	16	10387.13	461.98	0.025			
	MON PDL-2 (MFI)	16	1684.88	72.64	47	2314.51	136.40	<0.001*	31	2261.87	175.98	16	2416.50	215.70	n.s			
Subpoblacions CD4	Tcm CD11a (MFI)	16	21057.50	647.60	47	17822.77	534.98	0.001	31	18851.13	663.22	16	15830.31	687.35	0.003			
	Tcm CD38+ (%)	15	30.48	2.73	47	35.67	1.40	0.040	31	34.64	1.65	16	37.66	2.60	n.s			
	Tcm PDL-2 (MFI)	16	523.69	23.39	47	656.74	23.83	<0.001*	31	644.19	31.78	16	681.06	33.81	n.s			
	Tem CD11a (MFI)	15	25832.13	1372.81	47	21557.74	713.76	0.003	31	22327.61	897.45	16	20066.13	1115.10	n.s			
	Tem CD38+ (%)	15	16.48	1.26	47	26.91	1.36	<0.001*	31	26.47	1.67	16	27.76	2.40	n.s			
	Tem HLA-DR+ (%)	15	13.85	1.14	35	20.03	1.92	0.004*	23	21.17	2.63	12	17.84	2.45	n.s			
	Temra CD38+ (%)	16	42.84	2.94	47	52.30	3.26	0.018*	31	50.25	4.24	16	56.29	4.96	n.s			
	Temra PDL-2 (MFI)	16	773.94	39.96	47	1246.87	196.23	0.011*	31	1384.97	292.33	16	979.31	92.15	n.s*			
	Tn CD11a (MFI)	16	13242.06	484.34	47	10848.06	436.86	0.002	31	11407.52	567.50	16	9764.13	593.70	0.037			
	Tn CD38 (MFI)	16	2217.25	149.27	47	1853.68	55.99	0.003	31	1891.77	75.58	16	1779.88	74.52	n.s			
Tn PDL-2 (MFI)	16	1127.94	85.94	47	1650.81	144.68	0.001*	31	1662.16	210.41	16	1628.81	130.29	n.s*				
Subpoblacions CD8	Tcm CD11a (MFI)	16	26854.44	1870.75	47	28294.60	1456.32	n.s	31	30842.23	1881.60	16	23358.56	1709.87	0.003*			
	Tcm CD38+ (%)	16	26.74	5.39	47	41.52	2.39	0.003	31	42.05	3.00	16	40.50	4.03	n.s			
	Tcm PDL-2 (MFI)	16	424.50	26.72	47	559.60	25.47	0.003	31	563.71	31.75	16	551.63	43.93	n.s			
	Tem CD11a (MFI)	16	40699.81	1498.86	47	38752.55	1169.00	n.s*	31	40441.48	1467.39	16	35480.25	1698.36	0.021			
	Tem CD38+ (%)	15	18.29	1.65	47	53.00	2.48	<0.001*	31	51.74	2.80	16	55.44	4.92	n.s			
	Tem PDL-2 (MFI)	16	486.44	20.66	47	752.09	95.34	0.004*	31	691.94	82.30	16	868.63	232.94	n.s*			
	Temra CD38+ (%)	16	39.11	3.37	47	69.55	2.30	<0.001*	31	66.96	2.89	16	74.56	3.60	n.s			
	Temra HLA-DR+ (%)	15	17.71	2.99	35	23.49	1.82	0.047	23	25.03	2.29	12	20.54	2.89	n.s			
Temra PDL-2 (MFI)	16	984.75	111.70	47	1871.77	276.71	0.002*	31	1875.23	388.05	16	1865.06	325.92	n.s				

b)

	Variable d'estudi	ANOVA p	Bonferroni		
			COV-Mod		COV-Gre
			COV-Gre	Control	Control
Leucòcits	GRAN CD11a (MFI)	n.s	n.s	n.s	n.s
	GRAN CD38 (MFI)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	GRAN HLA-DR+ (MFI)	<0.001	n.s	0.001	<0.001
	MON CD38 (MFI)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	MON PDL-2 (MFI)	0.033	n.s	n.s	0.046

	Variable d'estudi	ANOVA p	Bonferroni		
			COV-Mod		COV-Gre
			COV-Gre	Control	Control
Subpoblacions CD8	Tcm CD11a (MFI)	0.027	0.026	n.s	n.s
	Tcm CD38+ (%)	0.021	n.s	0.022	n.s
	Tcm PDL-2 (MFI)	0.020	n.s	0.021	n.s
	Tem CD11a (MFI)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Tem CD38+ (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	Tem PDL-2 (MFI)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Temra CD38+ (%)	<0.001	n.s	<0.001	<0.001
	Temra HLA-DR+ (%)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Temra PDL-2 (MFI)	n.s	n.s	n.s	n.s

	Variable d'estudi	ANOVA p	Bonferroni		
			COV-Mod		COV-Gre
			COV-Gre	Control	Control
Subpoblacions CD4	Tcm CD11a (MFI)	<0.001	0.010	n.s	<0.001
	Tcm CD38+ (%)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Tcm PDL-2 (MFI)	0.010	n.s	0.034	0.013
	Tem CD11a (MFI)	0.007	n.s	n.s	0.006
	Tem CD38+ (%)	0.001	n.s	0.001	0.002
	Tem HLA-DR+ (%)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Temra CD38+ (%)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Temra PDL-2 (MFI)	n.s	n.s	n.s	n.s
	Tn CD11a (MFI)	0.003	n.s	0.095	0.002
	Tn CD38 (MFI)	0.018	n.s	0.064	0.023
	Tn PDL-2 (MFI)	n.s	n.s	n.s	n.s

*(test no parametric).n.s (resultat no significatiu)

Arbre decisió per pronòstic evolució greu en pacients hospitalitzats

Dels pacients ingressats per COVID-19, al voltant d'un 10 -15% poden desenvolupar una malaltia greu, i requeriràn d'oxigenoteràpia i atenció a la unitat de crítics. Amb la finalitat de realitzar un pronòstic de la evolució a partir de les dades dels paràmetres paraclítics inflamatoris i paraclítics immunològics obtingudes durant els dos primers dies de la hospitalització, es va realitzar un arbre de decisió mitjançant el mètode GINI. Prenent com a variable dependent, la classificació del pacient com a greu (FIG R1). Dels 47 pacients inclosos, l'anàlisi de l'arbre s'ha realitzat en 46 degut a que en un pacient no es va determinar la IL-6.

Les variables independents incloses en el model van ser les que presentaven diferències significatives entre els grups moderat i greu al T0, i alhora eren significativament diferents entre controls i pacients COVID: LDH, IL-6, Ac anti-N, LIM/L, MON/L, CD4/L, CD8/L, CD4Tcm CD11a (MFI), MON CD38 (MFI) i CD4Tn CD11a.

A l'arbre de decisió generat, s'observa que la variable independent gravetat es pot ramificar en dos nodes: node 1 i node 2, atenent a la variable principal directora IL-6. Al node 1 s'observa que del 91% que presenten la IL-6 igual o inferior a 201.6 pg/ml, el 70% son moderats ($p=0.016$). A continuació, el node 1 es ramifica en els nodes 3 i 4 segons la variable LIM/L. Al node 4 s'observa que del 56.5% de pacients que presenten valors superiors a 0.86×10^9 cel/L de limfòcits el 52% son moderats ($p=0.023$). Tot seguit, el node 4 es ramifica en el node 5 i node 6 atenent a la variable LDH. Al node 5 s'observa que del 45.7% dels pacients que presentaven valors de LDH inferiors o iguals a 380 U/L tots, el 46%, son moderats. Per tant el model classifica correctament al 45.7% dels pacients moderats.

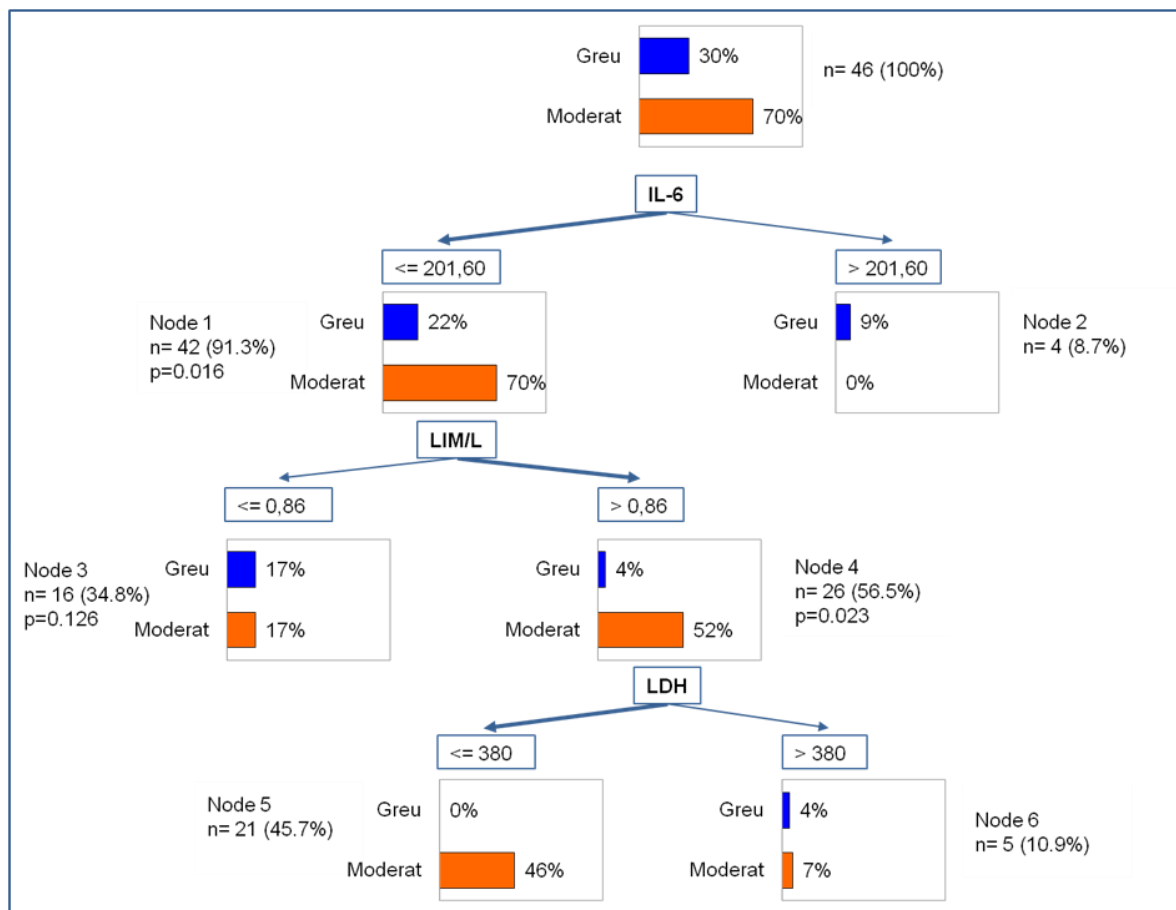


Figura 14. Arbre de decisió per al pronòstic de evolució greu en pacients COVID hospitalitzats.

Correlacions entre paràmetres a controls i pacients greus i moderats

A continuació, es van obtenir les matrius de correlació per a les variables DD, Ferr, PCR, IL-6, CALPS, NEU/L, EOS/L, BAS/L, MON/L, CD4/L, CD8/L, CD4Tcm, CD4Tem, CD4Temra, CD4Tn, CD8Tcm, CD8Tem, CD8Temra i CD8Tn dels controls, i els pacients COVID-19 en el moment de la inclusió (T0) i els títols d'anticossos dels pacients (Fig 15.).

De les correlacions observades a les matrius de correlacions dels controls i pacients, a tots dos grups destaca una correlació positiva entre CD4 i CD8. També es va trobar a tots dos grups correlacions positives entre les poblacions de memòria CD4Tcm i CD8Tcm i entre CD4Tn i CD8Tn.

Nomes als pacients s'observa una positiva entre CALPS i NEU/L i entre Ferr i LDH. També nomes als pacients es va observar una forta correlació positiva entre MON/L i NEU/L, BAS/L i CD4/L. Es interessant que mentre els pacients hi havia una correlació negativa entre Ferr i CD4Tcm als controls era positiva.

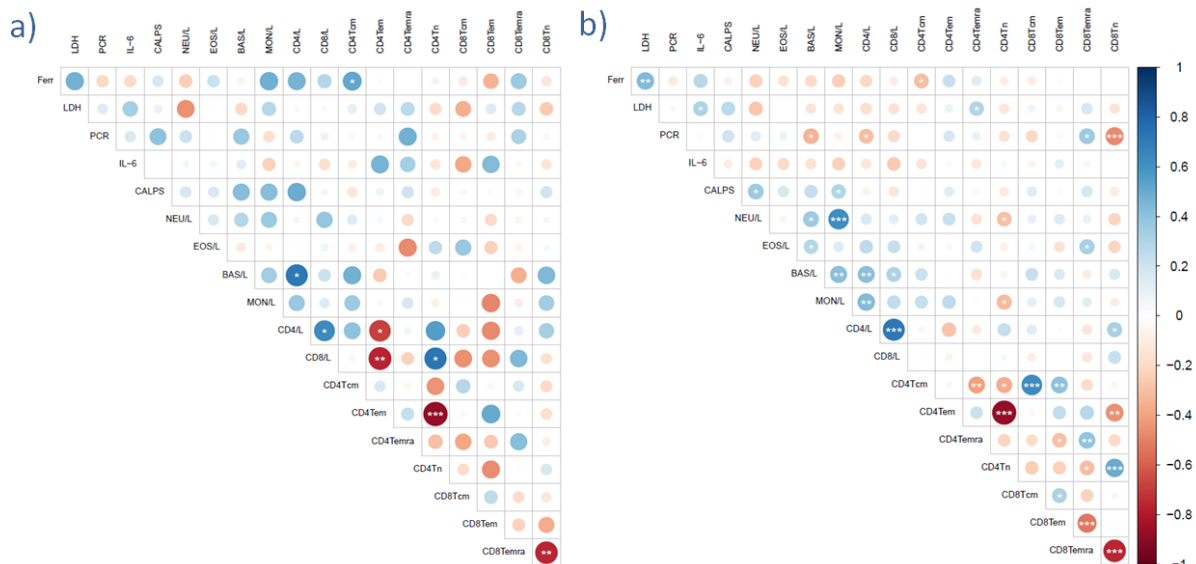
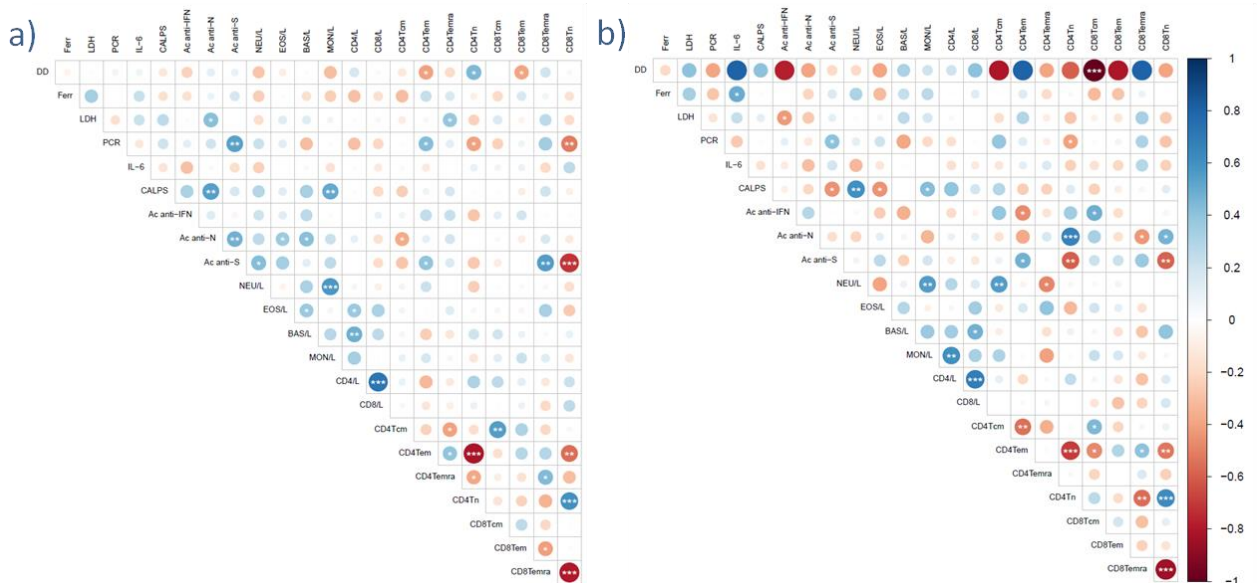


Fig 15: Matrius de correlació entre els paràmetres serològics, poblacions hematològiques i subpoblacions limfocitàries de sèrum i sang perifèrica de a) Controls. b) Pacients COVID a T0. Les correlacions positives es representen de color blau i les correlacions negatives de color vermell. La significació estadística es representa per (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$ i (***) $p < 0,0001$. Els paràmetres representats son de esquerra a dreta i de la part superior a la inferior:

DD, Ferr, PCR, IL-6, CALPS, NEU/L, EOS/L, BAS/L, MON/L, CD4/L, CD8/L, CD4Tcm, CD4Tem, CD4Temra, CD4Tn, CD8Tcm, CD8Tem, CD8Temra, CD8Tn.

De la comparació de les matrius de correlació entre els pacients moderats i greus al T0, es va observar als dos grups de pacients unes correlacions positives entre CD4/L i CD8/L, CD4Tcm i CD8Tcm. En canvi, als dos grups es van trobar correlacions negatives entre CD4Tem i CD4Tn i entre CD8Temra i CD8Tn. Addicionalment, es van observar correlacions positives tant als moderats com als greus entre, AcAnti-S i NEU/L, NEU/L i MON/L. En canvi es van trobar correlacions negatives entre CD8Tem i CD8Temra i entre CD8Temra i CD8Tn.

A les matrius de correlació dels pacients moderats al T0 es va observar una correlació negativa entre Ac anti-S i CD8Tn i positiva entre cd4Tn i CD8Tn. Al grup de pacients moderats ambé es van observar correlacions positives entre PCR i Ac anti-S, CALPS i Ac anti-N i MON/L, Ac anti-N i Ac anti-S, Ac anti-S i CD8Temra i entre BAS/L i CD4/L. En canvi es van observar correlacions negatives entre PCR i CD8Tn i entre CD4Tem i CD8Tn. En canvi a les matrius de correlació dels pacients greus en el T0 es va observar una correlació negativa entre CD4Tcm i CD4Tn. Una correlació positiva entre Ac anti-S i MON/L. Es van observar correlacions positives entre Ferr i LDH, entre



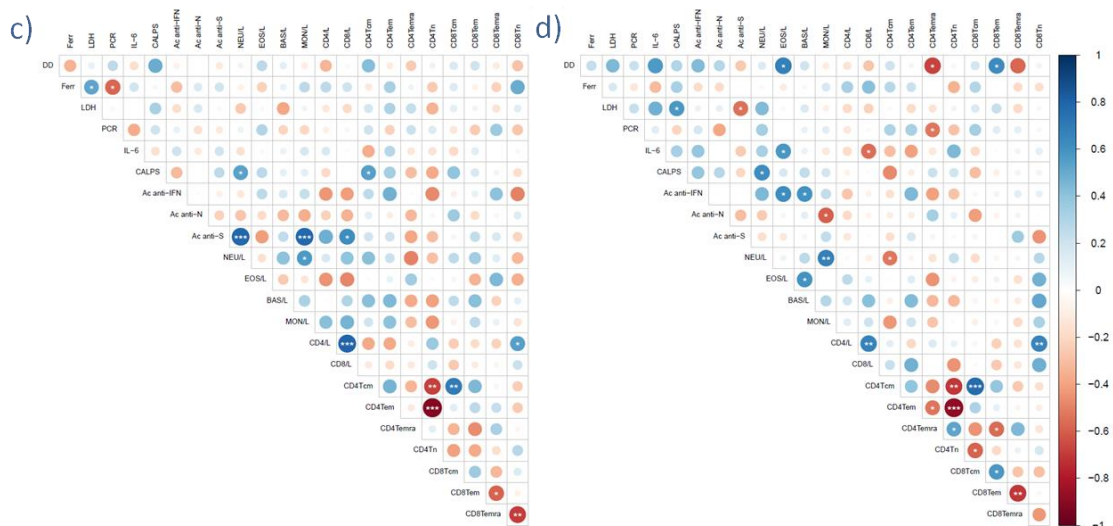


Figura 16. Matrius de correlació entre els paràmetres serològics, poblacions hematològiques i subpoblacions limfocitàries de sèrum i sang perifèrica de pacients COVID-19. a) COV-Mod a T0. b) COV-Mod a T1. c) COV-Gre T0. d) COV-Gre T1. Les correlacions positives es representen de color blau i les correlacions negatives de color vermell. La significació estadística es representa per (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$ i (***) $p < 0,0001$. Els paràmetres representats són de esquerra a dreta i de la part superior a la inferior: DD, Ferr, PCR, IL-6, CALPS, Ac anti-IFN, Ac anti-N, Ac anti-S, NEU/L, EOS/L, BAS/L, MON/L, CD4/L, CD8/L, CD4Tcm, CD4Tem, CD4Temra, CD4Tn, CD8Tcm, CD8Tem, CD8Temra, CD8Tn.

CALPS i NEU/L i CD4Tcm, i entre Ac anti-S i CD8/L. Finalment es van observar correlacions negatives entre Ferr i PCR als pacients greus.

A les matrius de correlacions dels pacients moderats al T1 respecte del T0, es va observar que es mantienien les correlacions positives entre PCR i Ac antiS, CALPS i MON/L, NEU/L i MON/L, CD4/L i CD8/L, CD4Tcm i CD8Tcm, CD4Tn i CD8Tn. També es mantenen les correlacions negatives entre PCR i CD4Tn, Ac anti-S i CD8Tn, CD4Tem i CD4Tn, cd4Tem i CD8Tn i entre CD8Temra i CD8Tn. En canvi, la dèbil correlació positiva que es va observar al T0 entre LDH i Ac anti-N, al T1 es correlacionen negativament.

Es va observar que a les matrius de correlacions dels pacients moderats a T1 hi havia una correlació positiva entre els AC anti-N i CD4Tn. I una correlació negativa entre DD i CD8Tcm. A més es van trobar correlacions positives entre CALP i NEU/L i entre MON/L i CD4/L. En canvi les correlacions van ser negatives entre Ac anti-S i CD4Tn,

entre NEU/L i CD4Tcm, CD4Tcm i CD4Tem així com entre CD4Tcm i CD8Temra. Addicionalment les correlacions dèbils positives es van observar entre Ferr i IL-6, Ac anti-IFN i CD8Tcm, Ac anti-N i CD8Tn, Ac anti-S i CD4Tem, així com entre CD4Tem i CD4Temra. Finalment es van observar correlacions dèbils negatives entre CALPs i Ac anti-S, entre CLPs i EOS/L, Ac anti-IFN i CD4Tem, Ac anti-N i CD8Temra, NEU/L i CD4Temra, i entre CD4Tem i CD8Tcm.

A les matrius de correlacions dels pacients greus al T1 respecte del T0, d'una banda es va observar que no es mantenia la correlació negativa entre CD8Temra i CD8Tn, a diferència del que s'havia observat als pacients moderats i greus al T0 i als pacients moderats al T1. D'altra banda, es mantenien igual que al T0 les correlacions positives entre CALP i NEU/L, NEU/L i MON/L, CD4/L i CD8/L, i entre CD4Tcm i CD8Tcm. També es va observar que es mantenien les correlacions negatives observades als pacients greus al T0 entre CD4Tn i CD4Tcm i CD4Tem.

Addicionalment, a les matrius de correlacions dels pacients greus al T1 es van observar fortes correlacions positives entre DD i EOS/L i CD8Tem. En canvi es van trobar fortes correlacions negatives entre DD i CD4Temra, i entre CD8Tem i CD8Temra. A banda, es van observar correlacions positives entre LDH i CALPS, IL-6 i EOS/L, Ac anti-IFN i BAS/L, entre EOS/L i BAS/L, CD4/L i CD8Tn. A més, es van observar correlacions negatives entre LDH i Ac anti-S, PCR i CD4Temra, IL-6 i CD8/L, Ac anti-IFN i EOS/L, Ac anti-N i MON/L, NEU/L i CD4Tcm. També es van observar correlacions dèbils positives entre CD4Temra i CD4Tn, i entre CD8Tcm i CD8Temra. Finalment les correlacions dèbils observades als pacients greus al T1 van ser entre CD4Tem i CD4Temra, CD4Temra i CD8Tem i entre CD4Tn i CD8Tcm.

Evolució dels paràmetres als pacients greus i moderats (T0→T1)

Es van incloure 24 pacients amb evolució moderada de la COVID-19, i 15 pacients amb evolució greu de la COVID-19, dels que teniem mostres tant a T0 com a T1. De 8 pacients inclosos a l'estudi no es va poder obtenir la mostra a T1 per baixa de l'estudi.

A tots els pacients inclosos en el subgrup aparellat, es van analitzar les variables incloses als paràmetres paraclínic inflamatoris i immunològics. La ferritina es va analitzar per grups de sexe dintre de cada grup. Per a l'anàlisi de les diferències existents en els paràmetres paraclínic inflamatoris i immunològics entre el temps T0 i T1 als pacients amb una evolució greu i una evolució moderada de la COVID-19, es van comparar les mitjanes de cada paràmetre entre els dos grups mitjançant el test t de student aparellat. (Taula 12). En el T1 van disminuir LDH, PCR, CALPs, Ferr Homes tant del grup de pacients amb evolució greu com moderada. La disminució de Ferr Dones només va ser significativa al grup moderat. Respecte al nivell d'anticossos, va augmentar significativament els anti-N en greus i moderats, i els anti-S només en els greus. Respecte a les poblacions leucocitàries, només el percentatge de NEU va disminuir significativament al T1 dels pacients moderats i dels greus. En canvi, els percentatges de LIM, EOS, BAS i MON van augmentar en tots dos grups de pacients al T1. Els recomptes de LIM/L, EOS/L, BAS/L i MON/L també van augmentar als dos grups de pacients al T1. Respecte a les subpoblacions limfocitàries, els recomptes de CD3/L, CD4/L i CD8/L i els percentatges de CD3 van augmentar al T1 de tots els pacients. En canvi, el percentatge de CD4 va augmentar i el de CD8 va disminuir al T1 en els pacients greus. El percentatge de CD4 Tcm va disminuir i el de CD4 Tem va augmentar al T1 en els dos grups de pacients. A més a més, només en el grup de moderats va disminuir el percentatge de CD4 Tn i va augmentar el de CD8 Tem, i en el grup de greus va disminuir el CD8 Tn.

	Variable d'estudi (unitat de mesura)	N	Mitjana	EEM	Mitjana	EEM	Test-t	N	Mitjana	EEM	Mitjana	EEM	Test-t										
														COV-Mod (T0)		COV-Mod (T1)		p	COV-Gre (T0)		COV-Gre (T1)		p
Paràmetres serològics	LDH (U/L)	24	314.00	18.88	235.38	10.99	<0.001	15	381.67	16.05	252.93	20.14	<0.001										
	PCR (mg/dl)	24	6.43	0.95	0.30	0.10	<0.001	15	9.48	1.89	0.13	0.04	<0.001										
	CALPS (pg/ml)	24	6.65	0.77	4.28	0.60	0.014	15	6.33	0.63	3.88	0.54	0.012										
	Ferr Dones (ng/ml)	14	766.01	175.99	466.64	144.78	0.013	6	1061.25	323.67	604.02	159.06	n.s										
	Ferr Homes (ng/ml)	10	1166.34	190.24	816.87	195.05	0.022	9	1365.73	248.90	881.57	130.30	0.015										
	Ac anti-N (Índex)	24	15.91	4.73	40.67	6.08	<0.001	15	1.94	1.10	20.75	5.70	0.003										
	Ac anti-S (Índex)	24	2779.76	1480.57	4782.83	1853.87	n.s	15	3057.97	1708.09	6761.53	2939.57	0.036										

Poblacions Hematològiques	LIM (x109 cels/L)	22	1.16	0.10	1.95	0.18	<0.001	15	0.83	0.08	1.84	0.18	<0.001
	EOS (x109 cels/L)	22	0.01	0.01	0.08	0.02	0.001	15	0.00	0.00	0.12	0.03	<0.001
	BAS (x109 cels/L)	22	0.02	0.00	0.03	0.00	0.013	15	0.01	0.00	0.03	0.01	<0.001
	MON (x109 cels/L)	22	0.61	0.06	0.74	0.07	0.043	15	0.38	0.07	0.74	0.07	<0.001
	NEU (%)	22	79.04	1.70	65.59	2.89	<0.001	15	81.66	2.21	66.06	3.09	<0.001
	LIM (%)	22	13.82	1.43	23.75	2.19	<0.001	15	12.97	1.91	23.51	2.65	<0.001
	EOS (%)	22	0.18	0.09	1.22	0.34	0.003	15	0.06	0.05	1.47	0.24	<0.001
	BAS (%)	22	0.20	0.04	0.38	0.06	0.004	15	0.13	0.03	0.37	0.06	0.001
	MON (%)	22	6.77	0.47	9.07	0.77	0.005	15	5.19	0.72	8.59	0.61	0.001

Subpoblacions Limfocitàries	CD3 (x109 cels/L)	22	0.60	0.07	1.21	0.13	<0.001	15	0.39	0.06	1.17	0.17	<0.001
	CD3 (%)	24	49.58	2.17	60.67	1.85	<0.001	15	44.07	3.84	60.68	2.81	<0.001
	CD4 (x109 cels/L)	22	0.39	0.06	0.77	0.10	<0.001	15	0.23	0.04	0.77	0.10	<0.001
	CD4 (%)	24	60.91	2.49	62.08	2.17	n.s	15	58.20	2.73	66.58	2.48	0.001
	CD8 (x109 cels/L)	22	0.18	0.02	0.38	0.04	<0.001	15	0.14	0.02	0.36	0.07	0.001
	CD8 (%)	24	33.20	2.20	33.00	1.93	n.s	15	36.86	2.58	30.03	2.22	0.004
	CD4 Tcm (%)	24	21.63	1.63	17.88	2.21	0.009	15	20.28	1.85	14.44	1.78	0.003
	CD4 Tem (%)	24	33.71	2.93	41.61	3.59	<0.001	15	32.14	3.89	37.42	3.71	0.004
	CD4 Tn (%)	24	37.50	2.91	34.41	2.76	0.043	15	42.09	4.81	41.44	4.39	n.s
	CD8 Tem (%)	24	14.43	1.37	17.92	1.78	0.017	15	19.14	3.62	21.35	3.56	n.s
	CD8 Tn (%)	24	24.32	3.98	20.17	3.27	n.s	15	19.22	4.47	11.89	3.63	0.023

Taula 12. Evolució dels paràmetres dels pacients moderats i greus entre T0 i T1 n.s (resultat no significatiu)

Canvis en els marcadors d'activació al T1

Tal i com vam fer en el punt anterior, a tots els pacients inclosos en el subgrup aparellat, es va determinar l'expressió dels marcadors CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 en la superfície dels leucòcits i subpoblacions limfocitàries CD4 i CD8 de memòria en sang perifèrica. Es va comparar l'evolució entre el temps T0 i T1 als pacients amb una

evolució greu i amb una evolució moderada de la COVID-19 mitjançant el test t de student aparellat. (Taula 13).

Taula 13. Evolució dels marcadors i subpoblacions de memòria en pacients moderats i greus.

	Variable d'estudi (unitat de mesura)	N	Mitjana	EEM	Mitjana	EEM	Test-t	N	Mitjana	EEM	Mitjana	EEM	Test-t										
														COV-Mod (T0)		COV-Mod (T1)		p	COV-Gre (T0)		COV-Gre (T1)		p
Leucòcits	GRAN CD11a (MFI)	24	10640.17	411.18	11075.33	460.50	n.s	15	9290.47	412.95	10447.33	553.17	0.020										
	GRAN CD38 (MFI)	24	1388.79	83.36	1229.75	43.07	0.016	15	1429.80	94.31	1347.07	89.45	n.s										
	GRAN HLA-DR+ (%)	16	212.24	25.05	183.41	28.35	n.s	5	181.00	18.78	154.40	10.64	0.037										
	MON CD11a (MFI)	24	38039.21	1864.59	31103.17	1882.86	0.001	15	34155.47	2188.47	28031.53	1547.05	0.014										
	MON CD38 (MFI)	24	9002.67	467.01	5981.29	183.22	<0.001	15	10109.60	394.83	6414.53	277.79	<0.001										
	MON PDL-2 (MFI)	24	2389.29	214.25	2083.25	129.26	n.s	15	2402.00	230.07	1897.53	135.81	0.011										
Subpoblacions CD4	Tcm CD11a (MFI)	24	19898.71	612.47	21802.96	949.71	0.034	15	15716.93	724.74	18499.00	1206.40	0.013										
	Tcm CD38+ (%)	24	34.28	1.72	34.28	2.45	n.s	15	36.99	2.69	26.85	2.84	<0.001										
	Tcm PDL-2 (MFI)	24	660.71	38.81	636.75	42.39	n.s	15	684.40	35.97	486.27	29.29	<0.001										
	Tem CD11a (MFI)	24	23185.58	903.99	25605.50	1173.58	0.022	15	20155.87	1188.22	21649.60	1149.94	n.s										
	Tem CD38+ (%)	24	27.00	1.99	23.55	1.62	n.s	15	27.09	2.47	22.45	1.71	0.038										
	Tem HLA-DR+ (%)	16	22.26	3.41	19.69	1.65	n.s	5	25.12	3.41	16.68	3.38	0.040										
	Temra CD11a (MFI)	24	24790.04	2315.93	22581.46	2319.68	n.s	15	21115.60	2434.25	13115.80	837.37	0.003										
	Temra CD38+ (%)	24	51.70	4.70	55.23	4.90	n.s	15	55.22	5.18	69.09	4.82	0.005										
	Temra HLA-DR+ (%)	16	13.99	2.12	9.32	1.49	0.016	5	20.25	9.54	7.12	3.10	n.s										
	Temra PDL-2 (MFI)	24	1553.21	363.75	1850.08	325.77	n.s	15	975.67	98.44	1808.20	342.56	0.013										
	Tn CD11a (MFI)	24	12194.83	595.58	13394.42	745.07	0.026	15	9615.73	614.55	11317.80	735.13	0.009										
	Tn CD38 (MFI)	24	1865.58	91.75	1741.25	89.92	0.045	15	1745.73	70.82	1509.67	74.78	<0.001										
Tn HLA-DR+ (%)	16	2.21	1.01	1.41	0.39	n.s	5	1.38	0.44	0.30	0.06	0.038											
Subpoblacions CD8	Tcm CD11a (MFI)	24	33302.08	2142.71	39236.54	3150.11	0.030	15	23511.80	1820.57	31393.87	2909.70	0.003										
	Tcm CD38+ (%)	24	43.64	3.55	37.93	3.37	n.s	15	39.87	4.25	33.27	3.36	0.042										
	Tcm HLA-DR+ (%)	16	24.84	2.93	32.05	3.32	0.040	5	20.90	5.78	24.79	8.33	n.s										
	Tcm PDL-2 (MFI)	24	584.75	39.08	523.79	37.10	n.s	15	525.93	38.09	397.13	25.17	0.004										
	Tem CD11a (MFI)	24	42253.54	1509.96	48317.54	2656.39	0.009	15	34444.00	1438.50	38484.33	2424.03	0.035										
	Tem CD38+ (%)	24	51.98	3.21	43.91	2.98	0.013	15	53.65	4.90	36.88	3.97	0.001										
	Temra CD38+ (%)	24	68.25	3.30	60.76	3.62	0.034	15	74.13	3.82	62.92	4.31	0.001										
	Temra HLA-DR+ (%)	16	22.04	2.41	30.81	3.40	0.008	5	26.92	4.02	29.32	4.43	n.s										
	Tn CD11a (MFI)	24	15934.46	2531.56	19312.54	3546.86	0.009	15	11187.00	689.35	14093.80	1161.11	0.002										
	Tn HLA-DR+ (%)	16	5.57	2.43	10.03	3.40	0.032	5	2.98	1.02	5.95	1.38	0.011										

Anàlisi de l'expressió de CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 als leucòcits

L'expressió de CD11a i CD38 als MON va disminuir al T1 tant als pacients amb evolució moderada com a greu. En canvi, CD11a als GRA només va augmentar als pacients amb evolució greu, i el HLA-DR als GRA i PD-L2 als MON va disminuir als pacients amb evolució greu. El CD38 als GRA va disminuir als pacients amb evolució moderada.

Anàlisi de l'expressió de CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 a subpoblacions de limfòcits de memòria

Tant als pacients amb evolució greu com als de moderada, l'expressió del CD11a als Tcm, Tn i als CD8 Tem va augmentar al T1. També a tots dos grups, l'expressió de CD38 als CD4Tn i CD8Tem va disminuir al T1. En canvi, només van disminuir als pacients d'evolució greu: l'expressió de CD38 i PD-L2 als Tcm, CD38 i HLA-DR a CD4Tem i CD11 a CD4Temra. Per altra banda, només van augmentar als pacients d'evolució moderada el HLA-DR als CD8Tcm i CD8Temra, el CD11 al CD4Tem i van disminuir el HLA-DR al CD4Temra.

Comparació de l'evolució de paràmetres entre pacients greus i moderats

Per tal d'avaluar comparativament l'evolució de cada paràmetre entre els dos grups de pacients es va calcular la ràtio dels paràmetres paraclítics inflamatoris i paraclítics immunològics segons la fórmula:

$$\text{Ràtio} = \text{resultat T1} / \text{resultat T0}$$

Aquesta ràtio permet avaluar el sentit en el que es produeix el canvi. Si el valor obtingut de la ràtio es igual a 1, es considera que el paràmetre es manté estable en el temps. S'interpreta que el paràmetre no canvia durant l'evolució de la COVID-19 o en els altres casos, pot interpretar-se que el paràmetre ha canviat durant l'evolució de la

COVID-19 i per tant pot haver intervingut de la resposta immunològica o haver-se vist afectat per la resposta immunològica.

La finalitat es avaluar el canvi que s'observa era diferent segons sigui una evolució greu o moderada. mitjançant el test t de student ([Taula 14](#)).

Anàlisi ràtio T1/T0:

Cal destacar que els paràmetres es comporten de forma similar en els pacients amb evolució greu i amb evolució severa. Però, l'increment IL-6, LIM/L, MON/L, i percentatges de CD3 i CD4 es mes gran en el grup de pacients amb evolució greu. Mentre que l'increment de percentatge de CD8, i l'expressió de CD38 i PD-L2 en CD4Tcm es mes gran en els d'evolució moderada. En canvi, la disminució de PCR i expressió de CD11a en CD4Temra i CD38 en CD4Tn es mes gran en l'evolució greu.

***Taula 14:** Ratio T1/T0 dels paràmetres pacients i Greu*

	Variable d'estudi (Ratio T1/T0)	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t
		COV-Mod			COV-Gre			p
Paràmetres serològics	PCR	24	0.04	0.01	15	0.02	0.00	0,013*

Poblacions Hematològiques	LIM (x109 cels/L)	22	1.87	0.19	15	2.40	0.25	0.048
	MON (x109 cels/L)	22	1.43	0.16	15	2.57	0.36	0,005*
	MON (%)	22	1.46	0.14	15	2.22	0.41	0,046*

Subpoblacions Limfocitàries	CD3 (x109 cels/L)	22	2.59	0.37	15	3.68	0.49	0.040
	CD3 (x109 cels/L)	24	1.27	0.06	15	1.49	0.11	0.033
	CD4 (x109 cels/L)	22	2.87	0.48	15	4.32	0.64	0.038
	CD4+ (%)	24	1.04	0.03	15	1.16	0.05	0.013
	CD8+ (%)	24	1.01	0.04	15	0.83	0.05	0.002

Subpoblacions CD4	Tcm CD38+ (%)	24	1.01	0.06	15	0.72	0.06	0.001
	Tcm PDL-2 (MFI)	24	1.03	0.08	15	0.74	0.06	0.006
	Temra CD11a (MFI)	24	0.95	0.07	15	0.73	0.08	0.022
	Tn CD38 (MFI)	24	0.95	0.03	15	0.87	0.02	0.035

. n.s (resultat no significatiu)

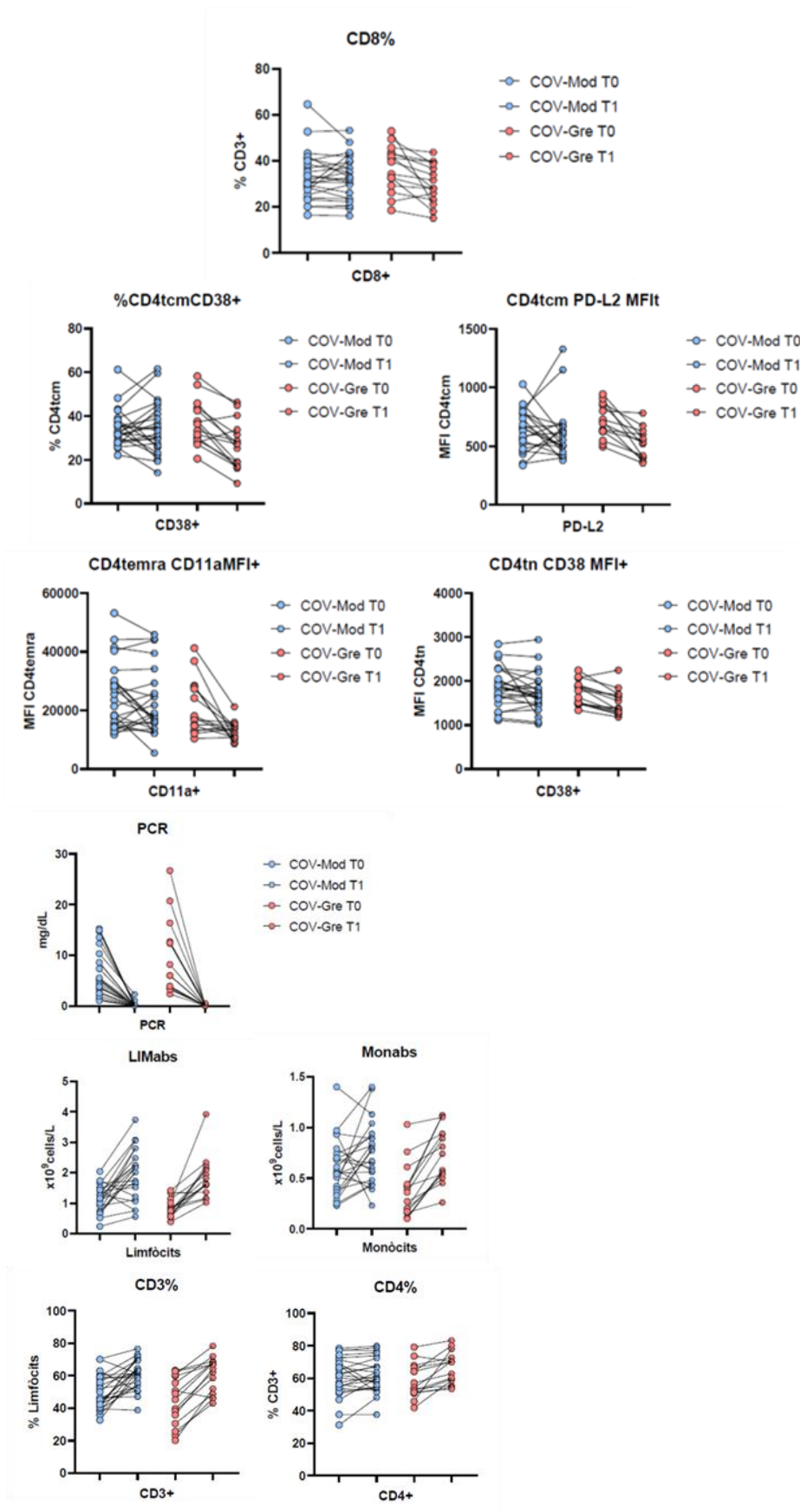


Figura 17: Evolució dels paràmetres entre T0 i T1 als pacients Moderats i Greus

Activació in vitro dels leucocits de sang perifèrica de pacients greus i moderats al T1

Fenotip dels leucocits després d'activació policlonal (PHA)

Dels pacients dels que es van obtenir la mostra T1, es van cultivar PBMCs amb PHA (activador) o DMSO (control negatiu d'activació). Dels 35 pacients que es va disposar mostra pel cultiu, 22 pacients tenien una evolució moderada i 13 pacients una evolució greu de la COVID-19. Després el cultiu, es va determinar l'expressió en membrana dels marcadors CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 als monòcits i subpoblacions CD4 i CD8 de memòria. i es van comparar les mitjanes de cada paràmetre entre els dos grups de pacients en cada condició (PHA o DMSO) mitjançant el test t de student. (Taula 14 i 15). També, es van comparar les mitjanes de cada paràmetre en els pacients d'evolució moderada o dels de greu i per últim, es van calcular les ràtios PHA/DMSO de cada paràmetre i es van comparar les mitjanes entre els dos grups de gravetat mitjançant el test t de student.

L'activació va augmentar a tots dos grups de pacients: %MON, %CD4Tcm i l'expressió de PD-L2 en MON, CD4Tcm, de CD137 en MON i CD8Tcm, CD8Tem, CD8Temra i CD8Tn, de CD38 en Tem,Tem i CD8Temra.

En canvi, l'activació només va augmentar al grup dels moderats: % CD4Tem i CD8Tcm, l'expressió CD38 a Tcm, CD4Temra i CD4Tn, l'expressió de HLA-DR a Tem, Temra, CD4Tn, l'expressió de CD11a a CD8Tcm, l'expressió de PD-L2 a CD8Tcm, CD8Tem.

Per comparar entre grups de pacients, es va fer servir la ràtio PHA/DMSO. L'augment de l'expressió de CD134 als MON, el % CD8Tn, l'expressió CD38 al CD4Tcm i CD137 als CD4Tn va ser més gran als pacients amb evolució moderada.

Taula 14: DMSO PHA als PBMCs analitzats per citometria

		DMSO						PHA						COV-Mod	COV-Gre
		COV-Mod			COV-Gre			COV-Mod			COV-Gre			DMSO vs PHA	DMSO vs PHA
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t	Test-t
														p	p
Monòcits	MON (%)	22	2.11	0.67	13	2.71	1.32	22	8.02	1.33	13	8.65	1.76	<0.001*	0.006
	MON PD-L2 (MFI)	22	526.45	61.69	13	653.54	57.22	22	1506.73	373.52	13	1051.77	83.08	0.008*	<0.001
	MON CD137 (MFI)	22	95.22	13.55	13	80.95	12.44	22	224.02	37.47	13	138.75	28.53	0.002*	0.038
Sub-poblacions memòria	CD4 Tcm (%)	22	8.99	1.03	13	6.85	1.00	22	14.43	1.78	13	11.74	1.12	0.006*	0.002
	CD4 Tem (%)	22	43.57	2.96	13	38.47	4.81	22	33.50	3.00	13	31.64	4.01	0.011	n.s
	CD8 Tcm (%)	22	1.38	0.23	13	1.61	0.53	22	2.51	0.42	13	2.76	0.78	0.011	n.s
Subpoblacions CD4	Tcm CD38+ (%)	22	16.18	2.19	13	13.19	1.82	22	22.83	3.07	13	14.36	1.93	0.043	n.s
	Tcm HLA-DR (MFI)	14	66.76	7.69				14	194.10	61.63				0.030*	n.s
	Tcm PD-L2 (MFI)	22	212.95	13.88	13	203.00	17.01	22	351.45	29.67	13	273.15	18.50	<0.001*	0.005
	Tem CD38+ (%)	22	6.45	0.86	13	6.58	1.04	22	14.50	2.50	13	10.89	1.11	0.003*	n.c
	Tem HLA-DR (MFI)	14	73.39	6.90				14	203.99	55.89				0.018*	n.s
	Temra CD38+ (%)	22	17.94	1.87	13	21.85	2.72	22	23.89	2.87	13	24.60	2.87	0.045	n.s
	Temra HLA-DR (MFI)	14	74.06	10.94				14	188.49	58.01				0.037*	n.c
	Tn CD38 (MFI)	22	970.36	62.24	13	885.31	59.31	22	1293.09	113.94	13	1034.69	76.68	0.009*	n.s
	Tn CD38+ (%)	22	49.80	3.15	13	45.40	3.65	22	59.55	3.34	13	53.44	3.68	0.020	n.s
	Tn HLA-DR (MFI)	14	84.22	9.34				14	183.18	53.17				0.044*	n.c
Tn HLA-DR+ (%)	14	2.10	0.65				14	12.17	4.00				0.010*	n.c	
Subpoblacions CD8	Tcm CD11a (MFI)	22	25171.09	2276.30	13	28198.85	5057.71	22	19930.45	1789.31	13	23497.00	4441.19	0.039	n.s
	Tcm CD38+ (%)	22	17.41	2.55	13	17.93	3.99	22	29.84	4.84	13	21.09	4.42	0.014	n.s
	Tcm PD-L2 (MFI)	22	181.49	17.52	13	194.26	28.91	22	336.32	37.34	13	244.02	28.08	<0.001*	n.s
	Tcm CD137+ (%)	22	0.49	0.33	13	0.28	0.28	22	10.76	2.03	13	7.79	3.07	<0.001*	0.016*
	Tem CD38+ (%)	22	11.93	2.34	13	10.39	2.22	22	25.88	3.70	13	19.88	2.82	0.001	0.007
	Tem HLA-DR (MFI)	14	192.14	25.60				14	502.86	170.18				0.047*	n.s
	Tem PD-L2 (MFI)	22	216.14	9.97	13	223.38	18.14	22	287.45	30.32	13	254.85	20.98	0.017*	n.s
	Tem CD137+ (%)	22	0.14	0.07	13	0.70	0.63	22	8.61	2.42	13	6.18	2.59	<0.001*	0.030
	Temra CD38+ (%)	22	14.61	1.68	13	19.29	1.64	22	25.84	3.11	13	28.14	3.01	0.001	0.009*
	Temra HLA-DR (MFI)	14	246.21	40.42				14	603.64	192.31				0.045*	n.s
	Temra CD137+ (%)	22	0.07	0.03	13	0.47	0.44	22	11.52	2.93	13	8.93	3.61	<0.001*	0.019*
	Tn CD38+ (%)	22	44.90	4.93	13	43.15	5.09	22	56.06	4.81	13	53.85	5.28	n.s	0.079
	TnCD137+ (%)	22	0.06	0.03	13	0.41	0.40	22	14.88	3.30	13	10.07	4.42	<0.001*	0.025*

Fenotip dels leucocits després d'activació específica amb peptids de SARS-CoV2

De tots els pacients dels que es van obtenir la mostra T1, es cultivar PBMCs durant 24hores en presència de pèptids M, N, o S de SARS-CoV-2. Dels 35 pacients, 22 pacients amb una evolució moderada de la COVID-19 i 13 pacients amb una evolució greu de la COVID-19. Similar a l'apartat d'activació, al final del cultiu es va determinar l'expressió en membrana dels marcadors CD11a, CD38, HLA-DR i PD-L2 als monòcits i subpoblacions CD4 i CD8 de memòria.

Es van calcular les ràtios M/DMSO, N/DMSO i S/DMSO per a cada paràmetre i es van comparar les mitjanes entre els dos grups de gravetat mitjançant el test t de student (Taula 16).

Quan es va valorar l'estímul amb pèptid M, els pacients amb evolució greu presentaven un augment més important que els d'evolució moderada de: l'expressió CD11a en MON i CD137 en CD8Temra i els % de CD4Tn, CD8Tcm i CD8Tem. En canvi l'augment era més significatiu en els d'evolució moderada en quant a: l'expressió PD-L2 i CD134 en MON i l'expressió CD137 en CD4Tn.

En quan a l'estímul amb pèptid N, l'augment en els pacients d'evolució greu va ser més gran en: l'expressió PD-L2 de MON, % CD8Tem, i CD137 en CD8Tem; i en els pacients d'evolució moderada va ser més gran en l'expressió CD134 MON, % CD8Tn, CD137 de CD4Tn i CD137 en CD8Temra. En quan a l'estímul amb pèptid S, l'augment en els pacients d'evolució greu va ser més gran en: l'expressió PD-L2 MON, % CD8 Tem i l'expressió CD137 en CD8Temra. Mentre que en els pacients d'evolució moderada va ser més gran l'augment en: CD134 MON i CD137 CD4Tn.

Taula 15: Ràtio PHA/DMSO en MOD Gre

		Ratio PHA/DMSO						
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t
		COV-Mod			COV-Gre			p
Monòcits	MON CD134 (MFI)	22	2.55	0.36	13	1.65	0.14	0.014*
Subpoblacions CD4 CD8 memòria	CD8 Tn (%)	22	1.18	0.15	13	0.83	0.05	0.049
Marcadors Subpoblacions CD4	Tcm CD38+ (%)	22	1.74	0.18	13	1.40	0.09	0.048*
	Tn CD137+ (%)	22	0.83	0.03	13	0.71	0.05	0.015

a)

		M						Ratio M COV-Mod vs COV-Gre
		COV-Mod			COV-Gre			Test-t p
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	
				N	Mitjana	EEM	N	Mitjana
Monòcits	CD11a (MFI)	22	27479.00	2703.41	13	27882.00	3460.20	0.041*
	PD-L2 (MFI)	22	2424.23	324.31	13	2364.54	306.70	0.037*
	CD134 (MFI)	22	1240.82	314.36	13	852.62	339.36	0.006*

Subpoblacions memòria	CD4 Tn (%)	22	39.19	3.13	13	49.74	4.88	0.041
	CD8 Tcm (%)	22	2.10	0.32	13	2.73	1.17	0.037
	CD8 Tem (%)	22	12.02	1.16	13	19.58	2.99	0.023

Subpoblacions CD4	Tn HLA-DR (MFI)	14	139.30	21.78	2	128.00	15.00	0.015
	Tn CD137+ (%)	22	14.76	7.22	13	8.01	7.67	0.016

Subpoblacions CD8	Temra CD137+ (%)	22	0.66	0.09	13	0.96	0.28	0.005
-------------------	------------------	----	------	------	----	------	------	--------------

		N						Ratio N COV-Mod vs COV-Gre
		COV-Mod			COV-Gre			Test-t p
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	
				N	Mitjana	EEM	N	Mitjana
Monòcits	PD-L2 (MFI)	22	1195.86	307.08	13	1335.77	167.13	0.026*
	CD134 (MFI)	22	1378.77	360.71	13	805.31	320.77	0.004*

Subpoblacions memòria	CD8 Tem (%)	22	12.20	1.12	13	20.00	3.10	0.048
	CD8 Tn (%)	22	44.15	4.26	13	37.67	5.72	0.033

Subpoblacions CD4	Tcm CD11a (MFI)	22	16255.95	580.94	13	15608.38	1013.38	0.036
	Tn CD137+ (%)	22	14.80	7.21	13	7.86	7.68	0.008

Subpoblacions CD8	Tem CD137+ (%)	22	0.92	0.25	13	0.93	0.30	0.018*
	Temra CD137+ (%)	22	1.15	0.42	13	0.73	0.33	0.013*

		S						Ratio S COV-Mod vs COV-Gre
		COV-Mod			COV-Gre			Test-t p
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	
				N	Mitjana	EEM	N	Mitjana
Monòcits	PD-L2 (MFI)	22	1518.55	302.97	13	1630.00	296.24	0.033*
	CD134 (MFI)	22	1419.18	353.42	13	922.69	347.57	0.006*

Subpoblacions memòria	CD8 Tem (%)	22	12.17	1.15	13	19.64	3.13	0.037
-----------------------	-------------	----	-------	------	----	-------	------	--------------

Subpoblacions CD4	Tn CD137+ (%)	22	13.90	7.17	13	8.14	7.66	0.041
-------------------	---------------	----	-------	------	----	------	------	--------------

Subpoblacions CD8	Temra CD137+ (%)	22	0.53	0.11	13	0.55	0.22	0.011*
-------------------	------------------	----	------	------	----	------	------	---------------

Taula 16: Poblacions de PBMCs en estimul M, N, i S i Ràtio M, N, i S/DMSO

Producció citocines després de l'activació policlonal T1

Del sobrenedant dels cultius es va determinar la concentració de 8 citocines (CD40L, IFN- γ , GranzimB, IL-10, IL-12/23p40, IL-13, IL-17/17A i IL-4) mitjançant un assaig multiplex.

Es van comparar les mitjanes de cada paràmetre entre els pacients COV-Gre i pacients COV-Mod dos grups de gravetat en la condició de cultiu DMSO mitjançant el test t de student. (Taula 17). També es van comparar les mitjanes de cada paràmetre en cada grup entre les dos condicions de cultiu DMSO i PHA mitjançant el test t de student. Es van calcular les ràtios PHA/DMSO de cada paràmetre i es van comparar les mitjanes entre els dos grups de gravetat mitjançant el test t de student.

En el sobrenedant del cultiu sense agent activador (PHA) destaca que hi ha una major concentració de IL-12 en els pacients d'evolució greu ($p=0.031$). Quan es compara la producció i secreció de citocines en el sobrenedant dels cultius en presència de PHA, s'augmentava els nivells de CD40L, granzym B, IL13 i IL-4 en tots dos grups de pacients. Però només augmentaven IL-12 i IL17 en els pacients amb evolució moderada. En els pacients amb evolució moderada l'increment de concentració de CD40L, granzym B, IL10, IL12, IL17 i IL4 va ser més gran que en els d'evolució greu.

Taula R17: Citocines Resultats DMSO PHA i Ratio PHA/DMSO en MOD Gre

Citocines		DMSO						PHA						COV-Mod	COV-Gre
		COV-Mod			COV-Gre			COV-Mod			COV-Gre			DMSO vs PHA	DMSO vs PHA
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t	Test-t
														p	p
	CD40L	4	620.94	241.59	3	477.86	128.05	16	6335.92	846.94	8	3905.51	445.95	<0,001*	<0,001
	Granzim B	5	374.15	137.62	3	206.99	85.98	18	3614.64	550.98	8	1827.77	808.55	<0,001*	0,043*
	IL-12/23p40	5	176.49	43.65	5	330.80	56.52	20	554.68	92.73	10	270.01	41.50	0.029	n.s
	IL-13	5	679.33	25.57	6	679.35	21.44	19	823.58	26.19	10	773.99	26.00	0.006	0.012
	IL-17/17A	5	6.56	2.28	3	8.41	3.49	18	1694.21	448.16	9	287.51	197.74	<0,001*	n.s
	IL-4	4	37.66	6.25	3	24.57	4.73	17	106.12	9.38	8	70.48	7.52	0.001	0.003

Producció citocines després de l'activació específica amb peptids de SARS-CoV2

A continuació, es va determinar la concentració de 8 citocines (CD40L, IFN- γ , granzim B, IL-10, IL-12/23p40, IL-13, IL-17/17A i IL-4) al sobrenedant dels cultius on s'han estimulat PBMCs amb els pèptids M, N, i S. respecte a cultius amb DMSO.

Primer es van calcular les ràtios M/DMSO, N/DMSO i S/DMSO per a cada paràmetre i es van comparar les mitjanes entre els dos grups de gravetat mitjançant el test t de student (Taula 18).

D'aquesta comparació les úniques diferències significatives van ser: l'augment de concentració de CD40L en els pacients d'evolució greu en el sobrenedant dels cultius amb pèptids M ($p=0.046$), i l'augment de la concentració de granzim B en els pacients d'evolució moderada en el sobrenedant amb pèptids S ($p=0.001$).

Taula 18: Citocines Resultats M N S i Ratio x/DMSO en MOD Gre

		M						M	
								Mod vs Gre	
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t	
		COV-Mod			COV-Gre			p	p
Citocines	CD40L	14	1463.66	220.36	11	2726.80	656.19	0.046*	0.046*
	Granzim B	16	1715.95	395.67	11	1298.86	463.98	n.s	n.s
	IFN- γ	16	589.12	277.78	11	562.79	251.00	n.s	n.s

		N						N	Mod vs Gre
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t	Test-t
		COV-Mod			COV-Gre			p	p
Citocines	CD40L	18	1705.34	364.52	10	1935.16	377.34	n.s	n.s
	Granzim B	20	1152.02	289.93	12	724.85	354.18	n.s	n.s
	IFN- γ	20	188.45	79.52	11	51.49	6.41	0.05*	n.s

		S						S	Mod vs Gre
		N	Mitjana	EEM	N	Mitjana	EEM	Test-t	Test-t
		COV-Mod			COV-Gre			p	p
Citocines	CD40L	19	1399.41	237.77	11	1739.88	323.16	n.s	n.s
	Granzim B	21	1124.16	201.92	11	370.80	87.17	0.001*	0.001*
	IFN- γ	22	207.86	70.33	10	71.99	18.23	n.s	n.s

5.DISSCUSSIÓ

Durant la realització del present treball hem observat que la infecció promou canvis als pacients que alteren la homeòstasi fisiològica que s'observa als controls, que permeten la seva monitorització y seguiment. Hem observat algunes de les diferències existents entre els pacients amb una evolució moderada i greu. També hem avaluat les diferències entre diferents paràmetres de la resposta immunològica entre pacients moderats i greus.

La discussió s'ha realitzat intentant relacionar les diferències observades dintre del seu context funcional i emmarcat dintre de la resposta immunològica entre els grups de pacients i respecte del conjunt de pacients amb els controls.

En conjunt les nostres observacions estan en la línia que la desregulació temporal de la resposta immunològica porta a una deficient capacitat efectora de la immunitat adaptativa, el manteniment de la tempesta de citocines, que causa el dany al teixit pulmonar i dirigeixen la evolució tòrpida dels pacients greus.

Anàlisi de la resposta immunològica front SARS-CoV-2 en pacients hospitalitzats a causa de la infecció en absència de patologia prèvia activa o tractament immunosupressor.

Per tal de trobar un marcador pronòstic predictor del curs de la malaltia a partir de l'anàlisi de diferents paràmetres de la resposta immunològica dels pacients

hospitalitzats a causa de la infecció, es necessari un grup homogeni de pacients que no presentin patologies prèvies actives ni tractaments immunosupressors que poguessin interferir sobre els resultats de la resposta immunològica. Per tant els pacients COVID-19 inclosos presenten menys factors de risc i comorbiditats relacionades amb la edat, antecedents patològics, el sexe o l'estat vacunal que els descrits en COVID-19.

La edat, el sexe o els antecedents previs no estan relacionats amb la gravetat dels pacients COVID inclosos al present estudi. La edat avançada

és un factor predictor de mortalitat i, per tant, es considerada un factor de risc de gravetat clínica en la COVID-19 (218-219). S'ha descrit que el percentatge de mortalitat es del 0,4% per a pacients menors de 40 anys, del 12,8% en pacients de 70 a 79 anys i del 20,2% en majors de 80 anys (220). D'altra banda, les patologies prèvies, com les malalties cardiovasculars, la malaltia renal crònica, les malalties pulmonars cròniques, la diabetis mellitus no controlada, la hipertensió, la immunosupressió, l'obesitat i malalties hematològiques o de la coagulació, predisposen els pacients COVID-19 a un curs clínic desfavorable i a un major risc d'intubació i mort (221-223). S'ha descrit que els pacients obesos amb índex de masa corporal per sobre de 35 kg/m² tenen un major risc d'ingrés a la UCI (Odds ratio=3,6) en pacients menors de 60 anys i COVID-19 (224). Per el que respecta al sexe, estudis poblacionals han descrit que entre el 60 i el 75% dels pacients amb COVID-19 greu eren homes (225), en una cohort de 287 pacients hospitalitzats es va observar que la taxa de mortalitat era superior en homes (35%) que en dones (14%) (226). En canvi, als estudis realitzats amb grups de pacients amb una mida mostral semblant al present estudi, com el grup de pacients publicat per

Moritz Anft on dels 49 pacients inclosos, 19 pacients eren crítics i 35 moderats (227) on no s'observen diferències en els antecedents previs o en la cohort de Zhou amb 8 greus i 33 moderats (228) on no s'observen diferències entre els grups respecte de l'edat ni el sexe. Ja que el baix nombre dels pacients inclosos no és representatiu de la població hospitalitzada a causa de COVID-19. A la població del present d'estudi, la mitjana d'edat dels pacients inclosos és de 50 anys, i donat que sols s'han inclòs 47 pacients, el efecte del mostreig fa que no sigui una mostra representativa de tots els pacients hospitalitzats a causa de la infecció per SARS-CoV-2. El motiu de que no s'observin les diferències descrites anteriorment per als antecedents previs radica en que al present estudi els pacients que presentaven algun d'aquests factors de risc van ser exclosos per tal de minimitzar el efecte de les patologies de base o els tractaments rebuts amb les variables de la resposta immune dels pacients front a SARS-CoV-2.

La vacunació front SARS-CoV-2 no protegeix de la COVID-19 greu. Estudis epidemiològics han confirmat que la vacunació ha reduït dràsticament els casos greus i la mortalitat a causa de COVID-19 (229). Però tot i que a nivell poblacional la vacunació protegeix de la malaltia greu, a causa de que la efectivitat de les vacunes es troba per sota del 100%, els individus vacunats continuen tenint risc de infecció i de desenvolupar una COVID-19 greu (230). La major part de les vacunes no s'administren per via respiratòria, sinó que es basen en virus modificats o en RNAm que codifiquen per a proteïnes de SARS-CoV-2 que s'administren intramuscularment, i per tant no generen memòria resident de limfòcits T ni títols elevats d'anticossos IgA neutralitzants a la mucosa respiratòria amb el que no protegeixen de la infecció i per tant, la evolució dels pacients pot ser tòrpida a causa de la resposta immunològica deficient o la presència d'altres factors de risc als pacients.

A partir de la recollida de les dades temporals del curs de la infecció, s'ha pogut verificar que la població de pacients fos el més homogènia possible i presentés un temps entre T0 i T1 semblant per evitar les comparacions de pacients en moments molt diferents del curs de la infecció.

Els pacients greus i moderats no tenen un curs inicial de la infecció diferent, no presenten diferències en el temps transcorregut des de l'inici de símptomes fins a l'hospitalització. En altres cohorts de pacients s'ha observat que als pacients greus el temps de de l'inici de símptomes fins a l'admissió a l'hospital era major que als pacients amb una COVID-19 lleu o moderada (208). En canvi en altres grups de pacients, un dels factors predictors de la recuperació ràpida després de l'ingrés fou un major temps des de l'inici dels símptomes fins a l'hospitalització (231). La variació en la atenció hospitalària, l'accés als recursos sanitaris i els factors de risc presents amb més o menys freqüència podrien explicar aquestes diferències.

PARÀMETRES PARACLINICS INFLAMATÒRIS

El dany al teixit pulmonar i l'activació de la RII, promou l'alliberament de citocines i reactants de fase aguda als pacients COVID-19. A més també s'observen canvis en les poblacions hematològiques que són característics de la infecció per SARS-CoV-2.

LDH, Ferr, PCR, CALPs i DD

Els pacients COVID-19 presenten nivells elevats de LDH, IL-6, Ferritina i PCR en el moment de l'hospitalització. Aquestes tres proteïnes han estat considerades com a marcadors d'inflamació en diferents patologies, tot i que tenen diferents característiques. La LDH es un marcador sensible però inespecífic del dany tissular, que es troba alterat als pacients COVID (232). La ferritina es un reactant de fase aguda, els nivells alt de ferritina s'associen a un pitjor pronòstic en COVID-19 (233). La PCR es un reactant de fase aguda que s'allibera al fetge en resposta a IL-6. Tant la IL-6 (234) com la PCR es troben augmentades en pacients amb COVID-19 i s'ha associat a la seva gravetat (273). Els increments de LDH, Ferritina i PCR son conseqüència del dany causat per els efectes citopàtics del virus sobre les cèl·lules epitelials pulmonars, i de l'activació de la RII que mitjançant la síntesi de IL-6 activa l'alliberament de ferritina i PCR per part del fetge. L'increment de la ferritina lliure, al degradar-se allibera calci que pot afavorir la replicació viral, mentre que la PCR participa de la resposta anti-viral ja que activa la via clàssica del complement i te efectes pro-trombòtics i pro-inflamatòris, amb el que podria contribuir a la tempesta de citocines i la trombosi observada als pacients greus. La IL-6 junt amb altres citocines pro-inflamatòries com IL-1 β , IL-8 i el TNF- α activen el mecanisme de la febre, promouen la limfopènia la coagulació i la lesió pulmonar (236). Donat que la IL-6 te un paper molt important en la inflamació i en la tempesta de citocines, era d'esperar que estigués alterada als i es mantingués durant el transcurs de la infecció als pacients greus.

Els pacients greus presenten nivells mes alts de LDH i IL-6 en el moment de l'hospitalització. En el cas de la LDH disminueix al T1 en la mateixa mesura en els dos grups de pacients, el que reflecteix que el dany tissular

provocat per la infecció que inicialment era major als greus, disminueix en el T1. En canvi, la IL-6 no canvia amb el temps en cap dels dos grups. El que indica que la RII encara es manté activa i la producció de IL-6 que es major en els pacients greus, contribueix a la tempesta de citosines (234,237,238). Durant la realització del arbre de decisió, la variable directora principal es la IL-6, i juntament amb la Limfopènia i la LDH permeten la classificació correcta del 46% dels pacients moderats.

Tant la PCR, com la Ferr Homes disminueixen en la mateixa mesura en els dos grups de pacients al T1, tot i que es mantenen els nivells de IL-6, aquesta ja no activa l'alliberament de reactants de fase aguda degut a la inactivació de la senyalització intracel·lular del receptor de IL-6 als hepatòcits (239, 240).

Els pacients COVID-19 presenten nivells elevats de CALPS en el moment de l'hospitalització. Els nivells de calprotectina sèrica, estan correlacionats positivament amb els NEU/L a tots els grups de pacients excepte als moderats a T0. El que posa de manifest que aquestes dues variables formen part del mateix mecanisme. La calprotectina sèrica es troba als grànuls citoplasmàtics dels Neutrofilis, i s'allibera en la degranulació dels Neutròfils. S'ha descrit que als pacients greus es troba alterada (241,242). En canvi, no hem observat els mateixos canvis en el nostre grup de pacients, ja que els nivells de CALPs disminueixen en els dos grups de pacients en la mateixa mesura. En la infecció per SARS-CoV-2 es característica la neutrofilia, que participa de la fisiopatologia de la infecció, de dos maneres, d'una banda l'activació dels Neutròfils promou la seva degranulació i de l'altra, la formació de NETs. En els

dos casos s'allibera la calprotectina al espai extracel·lular juntament amb el contingut dels grànuls, el que afavoreix la tempesta de citosines

Dimer D està elevat als pacients COVID-19 en el moment de la hospitalització. Tot i que no s'han pogut comparar els nivells de DD entre el grup control i els pacients COVID-19, en aquests últims els nivells de DD es troben elevats respecte dels valors de referència per a la població sana. I disminueixen en la mateixa mesura en els dos grups de pacients. Els nivells de DD elevats són la conseqüència de les alteracions de la coagulació que s'observen en COVID-19.

Alteracions de les poblacions Hematològiques

Els pacients COVID-19 presenten limfopènia, basopènia i monocitopènia, a l'inici de la hospitalització i aquesta es mes accentuada als pacients greus. Estudis previs confirmen els resultats obtinguts (243, 244). Les causes que podrien donar lloc a la limfopènia poden ser múltiples. D'una banda, la migració de cèl·lules activades al teixit infectat. D'altra banda, la mort dels leucòcits per apoptosi i piroptosi de les cèl·lules hiperactivades a causa de l'exposició a nivells alts de TNF, i altres citocines inflamatòries com la IL-6 (246). O també a causa de la proliferació defectuosa dels limfòcits (245)

S'ha descrit que els basòfils elevats en COVID-19 s'associen a la malaltia greu (247), a través de la entrada al teixit pulmonar poden participar de la tempesta de citosines mitjançant la formació de xarxes extracel·lulars semblants a les NETs dels neutròfils, i promoure la síntesi de mediadors inflamatoris a causa del reconeixement dels DAMPs alliberats i el dany cel·lular que es genera.

També participen de la polarització a Th2 mitjançant la síntesi de IL-4, el que s'afavoreix la polarització Th2 que no es eficient en la resposta anti-viral.

La monocitopenia perifèrica ja ha estat descrita prèviament en COVID-19 associada als pacients greus (248) podria estar participant de la fisiopatologia de la COVID-19 mitjançant la entrada al teixit pulmonar i la seva diferenciació pro-inflamatòria dirigida per les citocines dels limfòcits Th1 i afavorir la tempesta de citosines causant de SDRA. Però també mitjançant la presentació antigènica poden afavorir l'activació dels LTc i promoure l'eliminació viral.

Els pacients COVID-19 presenten eosinopènia, a l'inici de la hospitalització. La eosinopènia en algunes cohorts de pacients s'ha associat a malaltia greu (244), en canvi en altres s'ha associat als pacients COVID sense distinció per gravetat (208). Donat que els eosinòfils depenen de la polarització Th2, la seva presència indicaria que s'ha generat una polarització de la resposta no efectiva front els virus. El que podria d'una banda afavorir la replicació viral per falta de resposta efectora i d'altra potenciar la resposta cap a la polarització Th2 que no seria efectiva en la eliminació del virus.

En canvi els pacients COVID-19 presenten neutrofília a l'inici de la hospitalització. La infecció per SARS-CoV-2 s'ha relacionat amb un augment de neutròfils que s'associa amb la gravetat de la malaltia (249,250). Com a resultat de l'increment de l'expressió de GM-CSF observat en els pacients COVID (251), s'incrementen els neutròfils circulants que es dirigeixen cap als pulmons per participar dels mecanismes fisiopatològics de ARDS mitjançant la degranulació i la formació de NETs. També participen de la tempesta de citocines, dels infiltrats i la fibrosi pulmonar observats als pacients COVID(252).

Els canvis dels paràmetres serològics i hematològics observats als pacients COVID-19 hospitalitzats son la conseqüència de l'estat inflamatori en resposta a la infecció per SARS-CoV-2.

PARÀMETRES PARACLINICS IMMUNOLÒGICS:

L'activació de la resposta immune adaptativa front SARS-CoV-2, te lloc en un context pro-inflamatori, que dirigeix la producció d'anticossos, la migració dels leucòcits al teixit pulmonar, i l'activació de les subpoblacions dels limfòcits T de memòria.

Anticossos Anti-IFNs, Anti-S i N de SARS-CoV-2

El 25% dels pacients COVID-19 hospitalitzats presenten anticossos anti-IFNs.

Dels 47 pacients inclosos a l'estudi 4 dels 16 pacients greus presentaven anticossos anti-IFN-I al T0, i tots van requerir atenció a la unitat de crítics. Aquest percentatge es comparable al 10% dels pacients amb pneumònia per COVID-19 que presenten autoanticossos neutralitzants contra els IFN-I descrits per Bastard (253). Els IFNs participen de la coordinació i de l'activació de les cèl·lules efectores en la resposta anti-viral. Els auto-anticossos o els defectes genètics dels gens dels IFNs (254), poden influir negativament en la activació i coordinació de la resposta anti-viral en els moments inicials de la infecció impedit l'acció dels mecanismes efectors dels IFNs. S'ha descrit que els pacients COVID crítics que tenien anticossos neutralitzants front IFN-I presentaven una major alteració de paràmetres com la leucocitosi, neutrofília i trombocitosi i mes lesions renals agudes que els pacients COVID crítics que no tenien anticossos anti-IFN-I (255).

Els pacients greus presenten menys d'anticossos Anti-N a l'inici de la hospitalització. S'ha descrit que els pacients greus poden presentar una cinètica retardada en la producció dels anticossos anti-SARS-CoV-2 (256). Tot i que està descrit que els nivells màxims d'anticossos són més alts als pacients greus (257,258). Els resultats obtinguts en el present treball no són comparables al que està descrit per a la cinètica dels anticossos anti-S, es a dir inicialment no s'observa un retard en la producció dels anticossos, però al T1 els greus incrementen significativament els títols respecte de T0, tot i que no són diferents significativament dels Moderats a T1. Possiblement perquè el nostre grup de pacients encara no ha assolit el pic màxim de producció d'anticossos anti-S. L'aparició dels anticossos específics és un dels indicadors de l'activació de la RIA, als pacients greus l'activació retardada de la RIA pot afavorir la replicació viral i junt a la tempesta de citocines contribuir del dany al teixit pulmonar i de la fisiopatologia de la COVID.

Subpoblacions limfocitàries

La limfopènia als pacients greus afecta tant els LTCD4+ com els CD8+. Publicacions recents també descriuen que la limfopènia en COVID-19 pot afectar tant als LTCD4+ com als CD8+ (259,260). En canvi, d'altres descriuen alteracions únicament del compartiment limfoide sense especificar la població de limfòcit afectada (291). Entre les causes que podrien donar lloc a la limfopènia CD4 i CD8 estan la migració de cèl·lules activades al teixit infectat (261,262), la mort a causa de l'exposició a nivells alts de TNF, i IL-6 (246). O per la proliferació defectuosa dels limfòcits (245).

Els pacients COVID-19 expandeixen el compartiment CD4Tcm a l'inici de l'hospitalització i després disminueix. En aquest sentit s'ha descrit que els pacients moderats presenten un increment del compartiment CD4Tcm, de fet els LT específics poden trobar-se en sang perifèrica als pacients infectats

després de 4 dies de l'inici de símptomes (263). Amb el que es generen LT efectors i de memòria, aquests últims s'expandiran mentre es mantingui l'exposició al virus. Mentre que en estadis finals de la infecció el percentatge de CD4Tcm disminueix com a part de la contracció de la resposta (264).

Els pacients COVID-19 al T1 presenten un major percentatge de CD4Tem que al T0. El percentatge de CD4Tem s'incrementa amb el transcurs de la infecció degut a que son les cèl·lules efectores que participen de la resposta al virus en els pacients greus, o que reben senyals que les polaritzin a CD4Teg al teixit infectat per tal que participin de la contracció de la resposta i la reparació del teixit.

Les CD4Tn disminueixen al T1 als pacients moderats, però no als pacients greus. Donat que els pacients moderats ja no presenten una infecció activa en T1, els percentatges de LTn disminueixen alhora que s'incrementen els CD4Tem. En canvi als pacients greus, donat que encara presenten la infecció activa els percentatges relatius de la població CD4Tn no varia ja que s'ha de mantenir el recanvi de les diferents poblacions CD4+ efectores i de memòria.

Marcadors de leucòcits

Els granulòcits dels pacients COVID-19 expressen menys CD11a i mes CD38. La molècula CD11a juntament amb CD18 forma part de la molècula LFA-1, que participa de la migració transendotelial als leucòcits. CD38 és necessari per a l'activació i proliferació de cèl·lules immunitàries. La presència de IFN- γ i TNF α indueixen la seva expressió en macròfags i cèl·lules dendrítiques, i mitjançant la unió amb CD31, participa en l'adhesió i migració

transendotelial dels leucòcits. (264). Les dues molècules expressades als granulòcits i als monòcits indiquen l'activació de la RII i la migració dels fagòcits al teixit infectat el que mantindria la tempesta de citocines i la resposta pro-inflamatòria.

Els monòcits dels pacients COVID-19 presenten una major expressió de CD38 que els controls. De la mateixa manera que ocorre amb els granulòcits, donat que CD38 també s'indueix als monòcits en presència de IFN- γ i TNF α (264), estaria indicant la activació i la capacitat migratòria dels monòcits.

Els monòcits dels pacients COVID-19 expressen mes PDL-2 a T0 i a T1 disminueix als pacients greus. El PD-L2 a l'igual que PD-L1 es el lligand de la molècula PD-1 dels limfòcits. La unió de PD-L2 del monòcit a PD-1 del limfòcit impedeix la senyalització activadora de CD28 amb el que el LT que reconeix específicament amb el TCR un antígen-MHC, en presència de PD-L2 no rebrà els senyals co-estimuladors de CD28 i no s'activarà. La polarització Th1 promou l'expressió de PD-L1 als macròfags inflamatoris als teixits mitjançant l'IFN- γ , en canvi la polarització Th2 promou la expressió de PD-L2 als macròfags inflamatoris als teixits mitjançant la IL-4 (265). La regulació de l'activació dels LT mitjançant PD-L2, es important per limitar la resposta immunopatologica als teixits, afavorint la disminució de la resposta inflamatòria i la l'homeòstasi del teixit.

Marcadors de Subpoblacions Tmem

Els pacients COVID-19 presenten un menor percentatge de cèl·lules CD4Tcm, Tem i Tn CD11a+ en el T0 q augmenten en T1. Lamolècula CD11a juntament amb CD18 forma part de la integrina LFA-1, que participa de la

migració transendotelial als leucòcits i als limfòcits, en aquests a més participa de les interaccions cel·lulars i en la activitat efectora dels LTreg. S'ha descrit que la reducció del percentatge dels LT CD11a+ en sang perifèrica cap als teixits infectats pot participar del mecanisme fisiopatològic de dany tissular als pacients COVID-19 (266). La disminució dels LTCD4CD11a+ durant el període agut de la infecció es dona per la elevada taxa de migració dels LTmem cap als teixits infectats o dels LTn cap als òrgans limfoides secundaris. A més la molècula CD11a també participa de la supressió dels LT mitjançant la unió a LFA-1 present a la membrana de les APCs. El que produeix la disminució de la capacitat efectora i de proliferació del LT (267). De manera que la disminució de CD11a prepara la cèl·lula per rebre senyals co-estimuladors i activar la funció efectora.

Els pacients COVID-19 presenten un percentatge major de cèl·lules CD4Tmem, i menor de Tn CD38+ en el T0. La molècula CD38 es un marcador d'activació dels LT, s'ha descrit que les poblacions CD4Tcmi CD4Tem CD38+ es troben elevades als pacients COVID-19 (268,269). Per tant els CD4LTmem que arriben al teixit respiratori infectat, presenten un perfil efector activat. Mentre que els LTn que recirculen per els òrgans limfoides secundaris no. El fet que els pacients greus disminueixin el percentatge de cèl·lules Tmem CD38+ (excepte Temra) indica que la capacitat efectora d'aquestes cèl·lules es menor que al T0 i que per tant no poden eradicar la infecció al contrari que ha ocorregut amb els pacients moderats que mantenen elevat el percentatge de TmemCD38+ (excepte Temra) a T1 tot i haver resolt la infecció.

Els pacients COVID-19 presenten un percentatge major de cèl·lules CD8Tmem en el T0. De forma semblant als LTCD4Tmem els CD8Tmem s'ha

descriu que les poblacions Tmem CD38 es troben elevades als pacients COVID-19 (265,270). Per tant els CD8LTmem que arriben al teixit respiratori infectat, presenten un perfil efector activat.

CULTIU I ESTIMULACIÓ DE PBMCs

Es va avaluar la resposta efectora dels monòcits i les subpoblacions de LT memòria als PBMCs de pacients moderats i greus, per avaluar la capacitat d'activació efectora i l'efecte de l'estímul amb pèptids de SARS-CoV-2 sobre l'expressió de diferents marcadors d'activació, molècules d'adhesió, i sobre la síntesi de citocines que participen de la resposta efectora adaptativa.

Expressió de marcadors als monòcits i subpoblacions Tmem en cultiu basal i amb PHA

La estimulació amb PHA incrementa l'expressió de PD-L2, CD134 i CD137 als monòcits dels pacients COVID. El increment de la capacitat inhibidora als monòcits, mitjançant la expressió de PD-L2, comporta la regulació de la resposta dels LT per tal de limitar la capacitat efectora front l'estímul policlonal i de gran magnitud amb el PHA, mitogen que activa els LT mitjançant la interacció amb el TCR-CD3, promou l'activació i la entrada en el cicle cel·lular dels limfòcits. Al limitar l'activació, els monòcits mantenen la viabilitat de les cèl·lules en detriment de la capacitat efectora (223). L'increment en la expressió de CD134 i CD137 es part de la activació cel·lular, ja que aquestes molècules són membres de la família del receptor de TNF, i participen de la regulació de la resposta immune a molts tipus cel·lulars. CD137 s'expressa als monòcits macròfags i CD, la unió de CD137L indueix l'activació, la migració, la supervivència i la diferenciació dels monòcits (271).

La estimulació amb PHA incrementa el percentatge de CD4Tcm i CD8Tcm **ahora que disminueix el percentatge de CD4Tem als moderats però no als greus.** El PHA als pacients moderats canvia els percentatges relatius de les poblacions LTmem, donat que es troben en cultiu aquest fet pot ocórrer per estimulació de la proliferació del compartiment Tcm o be per la mort dels altres com es el cas del CD4Tn que fa augmentar la proporció de les altres cèl·lules.

Els pacients greus en absència d'estimulació presenten un major percentatge de cèl·lules CD4Tn, CD8Temra activades (CD38+) i una menor expressió de CD11a al compartiment CD4Temra. El que indica que el perfil del compartiment de memòria efectora dels pacients greus està activat sense cap estímul, i a més presenta un llindar d'activació menor donat que disminueix la expressió de la molècula inhibidora CD11a.

La estimulació amb PHA incrementa el percentatge de CD38 a totes les subpoblacions de CD4LTmem als pacients moderats però no als greus, on incrementa la expressió de PD-L2 als CD4Tcm. La estimulació dels pacients greus amb PHA es oposada a la observada als pacients moderats. Als moderats la resposta a l'estímul genera activació efectora, mentre que als pacients greus no. El que podria estar indicant una deficient activació o que la resposta que ja està exhausta i per tant no pot activar-se normalment.

La estimulació amb PHA activa el compartiment CD8Tmem tant als moderats com als greus. El PHA incrementa el percentatge de CD38+ CD8Tem i Temra i el percentatge de CD137+ CD8 Tcm Tem Temra i disminueix el percentatge de CD137 als CD8Tn als dos grups de pacients en la

mateixa mesura. Amb el que la capacitat d'activació del compartiment memòria CD8 es igual als dos grups de pacients.

La estimulació amb PHA promou la expressió de PD-L2 als Tem i Tcm i de CD11a i CD38 als CD8Tcm dels pacients moderats, però no als greus.

Alhora que ocorre la activació del compartiment memòria, als pacients moderats també es promou la expressió de molècules co-inhibidores com CD11a, aquesta regulació sols ocorre als CD8Tcm dels pacients moderats.

Expressió de marcadors als monòcits i subpoblacions Tmem en cultiu amb pèptids de SARS-CoV-2

El cultiu de PBMCs en presència de pèptids M, N, o S, l'expressió de CD134 als monòcits. El perfil d'activació es diferent de l'observat amb l'estímul PHA, donat que el PHA es un estímul fort i policlonal, mentre que els pèptids sols activen als LT específics mitjançant la presentació antigènica per les CD, i aquests constitueixen un percentatge molt baix com per a que es puguin evidenciar les diferències en la resposta T específica.

Producció de citocines als sobredants dels cultius.

Els pacients greus produeixen basalment mes IL-12 que els moderats, amb l'estímul PHA la resposta de citocines es menor. Els PBMCs dels pacients greus produeixen basalment mes IL-12 que els moderats, el que reflecteix l'estat proinflamatori de les cèl·lules T als pacients greus. Mentre que la menor resposta de citocines observada amb PHA reflexa una menor capacitat d'activació dels compartiments CD4 i CD8 als pacients greus.

LIMITACIONS DEL TREBALL:

L'avaluació de la memòria i de les subpoblacions limfocitàries específiques front SARS-CoV-2 en sang perifèrica es una aproximació, que informa sobre el perfil de les cèl·lules que encara no han migrat al teixit pulmonar. Per a l'estudi de la resposta efectora i de memòria cal analitzar les cèl·lules residents al teixit pulmonar, les CD8 de memòria resident o els limfòcits del teixit limfoide secundari associat als bronquis.

Els cultius de PBMCs únicament s'han realitzat al T1, i per tant no es pot avaluar la seva evolució en el temps.

No s'ha avaluat la resposta creuada front altres coronavirus relacionats, i que pugui esdevenir un factor protector front la infecció de SARS-CoV-2, mitjançant el reconeixement creuat.

A l'estudi no es van incloure altres poblacions com les, subpoblacions de monòcits, LB, o subpoblacions de NKs, limfòcits T polaritzats o reguladors.

No s'han realitzat els cultius amb mostres controls i per tant no es pot avaluar quina es la situació basal de la resposta normal front els diferents estímuls.

No es va poder analitzar el marcador HLA-DR a molts dels pacients greus en el T1.

No es van analitzar els hemogrames de 6 controls. I per tant s'ha perdut potència estadística a l'anàlisi de les dades, i no s'han analitzat poblacions absolutes en els pacients. Tot i que si s'han pogut comparar els percentatges.

APORTACIONS DEL TREBALL:

Es confirmen els estudis previs, diverses publicacions anteriors han trobat les mateixes diferències que el nostre treball.

L'anàlisi de PD-L2 als marcadors de superfície i del que encara no es coneix en profunditat el seu paper en la resposta immunològica front SARS-CoV-2.

La realització del arbre de decisió, en cas que es validi amb una mostra més gran de pacients, pot ser una eina molt útil en el cribatge dels pacients a partir del primer dia de la hospitalització.

6.CONCLUSIONS

1. En la nostra cohort, no es van trobar els factors determinants de gravetat mes descrits (obesitat, diabetes, edat) entre pacients moderats i greus en el moment d'ingres hospitalari perque es van triar pacients de forma que aquests factors tinguessin menys impacte
2. Els pacients de COVID-19 i els donants sans presenten una composició leucocitaria diferent al moment de la infecció. Les diferencies son evidents tant entre donants sans i pacients, com entre pacients moderats i greus
3. En el moment de la inclusió a l'estudi, els pacients que van tenir una evolucio greu presentaven nivells mes alts dels parametres serologics relacionats amb la inflamació
4. Els pacients que tindran una evolucio greu tenen limfopenia deguda tant a limfocits T CD4 com a CD8, a mes a mes de una disminució significativa de monocits i basofils. Sembla que els mecanismes que ho desencadenen son comuns perque estan relacionades en aquests pacients greus
5. Abans que progressi la malaltia, els pacients greus i moderats tenen poques diferencies en quan a proporció de les subpoblacions de memoria
6. Els pacients que tindran una evolucio greu tenen un augment d'expressio de CD38 als monocits, i una disminució significativa de CD11a a les poblacions de memoria tant de CD4 com de CD8, possiblement per un mecanisme comú
7. Els marcadors d'inflamació i la limfopenia segueixen sent els parametres independents entre sí i decisius per determinar l'evolucio de la gravetat de la malaltia
8. Els canvis dels parametres entre T0 i T1 es different en pacients que evolucionen a moderat i greu, possiblement reflectin els canvis de la resposta immunologica que experimenten durant la seva progressio. Les diferencies mes significatives es a la poblacio CD4 i als monocits
9. La resposta immune policlonal que presenten els pacients greus es caracteriza per menys capacitat d'activació monocits i de les poblacions de CD8 naive

10. La reactivació in vitro de les cel·lules amb els 3 peptids virics dels pacients greus mostra major expansió de CD8Tem, pero menys activació de naive CD4Temra
11. Les cel·lules de pacients greus produeixen menys citocines davant d'una activació policlonal, i quan es reactiven amb el peptid viric S, produeixen significativament menys Granzym B, pero mes sCD40L en front peptid M

7.AGRAÏMENTS

Primer de tot, gràcies Silvia, gràcies infinites per la paciència i per la dedicació.

He après com mai, he disfrutat molt aquest projecte, i ha estat gràcies a tu. Ets molt gran i transmetes valors d'esforç dedicació i excel·lència. I es per això que volia que fossis tu qui hem dirigís la tesi. Vam començar fa massa anys i al final encara ens ha faltat temps...

Estic molt agraït amb totes les persones que estan o han estat a recerca del Sant Pau, Bet, Mari Àngels, Lidia, Ruben... A tots us estic molt agraït per haver-me ensenyat... I haver-ho fet en positiu, des de la humilitat i el bon rollo. No hem estat cada dia perquè la vida pega moltes voltes, però he disfrutat cada estona. Gràcies.

A Carlos i Juan els hi donaré de menjar a part. Sou uns cracks!!! El vostre bon rotllo s'encomana i això es la millor part perquè fa que tots al vostre voltant siguin una mica més feliços.

Ara toca al taulí, Mjosè es un plaer haver coincidit amb tu, aquest projecte va començar amb la teva ajuda, amb els consells que dones, la humilitat amb la que vius i el sacrifici per els demès, son valors admirables, i més quan algú que sap tan com tu ho comparteix amb els demès. Gràcies.

A Juan, a Mila, Encarna, Desiree, Sara a tot el departament de genètica, micro, bioquímica, Hemato, a tots moltes gràcies perquè us he anat demanant de tot per poder tirar endavant la part experimental, si no fos per el material de genètica no hagués pogut fer ni mig cultiu. Es un gust treballar amb vosaltres i poder créixer junts es el millor de tot. Mateu i Marina també tenen molta culpa que aquest projecte hagi pogut acabar i els que vindrán. Gràcies.

Marc, ets un crack, resolutiu, clar, ordenat i molt motivat. Sense tu impossible. Moltíssimes gràcies.

Nuria ens veiem a casa i a partir de les 7 fem rentadora, banyera, sopar, conte i al despatx... Ui ja no, ara... i ara que fare? Doncs compartir-ho tot amb tu i ajudar-te igual que tu ho fas amb mi. T'estime.

Pare... Mare... Raul... Gràcies per els ànims i la motivació per escoltar i per saber com estic sols amb el to de veu. Sense el vostre consell no haguera arribat mai a ser feliç. Gràcies

Moltes gràcies!!!!

8. Bibliografia

(1) Zhu, Zhixing et al. "From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses." *Respiratory research* vol. 21,1 224. 27 Aug. 2020, doi:10.1186/s12931-020-01479-w

(2) Marmor, Hannah N et al. "Risk factors for SARS-CoV-2 related mortality and hospitalization before vaccination: A meta-analysis." *PLOS global public health* vol. 2,11 e0001187. 2 Nov. 2022, doi:10.1371/journal.pgph.0001187

(3) Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., & Slutsky, A. S. (2012). Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *JAMA*, 307(23), 2526–2533.

(4) A chronicle of SARS-SARS-CoV-2: Part-I-Epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci. Total Environ.* 2020, 734, 139278.

(5) Kaivola, J.; Nyman, T.A.; Matikainen, S. Inflammasomes and SARS-CoV-2 Infection. *Viruses* 2021, 13, 2513.]

(6) Immunopathology of SARS-CoV-2 Infection: A Focus on T Regulatory and B Cell Responses in Children Compared with Adults. *Children* 2022].

(7): Role of Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients: A Review on Molecular Mechanisms, Immune Functions, Immunopathology and Immunomodulatory Drugs to Counter Cytokine Storm. *Vaccines* 2021.

(8) Coronaviral Infection and Interferon Response: The Virus-Host Arms Race and COVID-19. *Viruses* 2022, 14, 1349.]

(9) ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-2533. doi:10.1001/jama.2012.5669.

(10) Chen C, Zhang XR, Ju ZY, He WF: Advances in the research of mechanism and related immunotherapy on the cytokine storm induced by coronavirus disease 2019. (Article in Chinese). *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2020, 36:471-5. 10.3760/cma.j.cn501120-20200224-00088

- (11) Manik M, Singh RK: Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. *J Med Virol.* 2022, 94:869-77. 10.1002/jmv.27405
- (12) Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846-848.
- (13) Ghasemzadeh M, Ghasemzadeh A, Hosseini E: Exhausted NK cells and cytokine storms in COVID-19: whether NK cell therapy could be a therapeutic choice. *Hum Immunol.* 2022, 83:86-98. 10.1016/j.humimm.2021.09.004
- (14) Bi J: NK cell dysfunction in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2022, 19:127-9. 10.1038/s41423-021-00825-2
- (15) Cifaldi L, Prencipe G, Caiello I, Bracaglia C, Locatelli F, De Benedetti F, Strippoli R: Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015, 67:3037-46. 10.1002/art.39295
- (16) Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, et al.: Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J Clin Invest.* 2020, 130:4694-703. 10.1172/JCI138554
- (17) Zheng M, Gao Y, Wang G, et al.: Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020, 17:533-5. 10.1038/s41423-020-0402-2
- (18) Y. Huang, C. Yang, X. fengXu, W. Xu, and S. wenLiu, "Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 41, no. 9, pp. 1141–1149, Sep. 2020, doi: 10.1038/S41401-020-0485-4.
- (19) J. Y. Li et al., "The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway," *Virus Res.*, vol. 286, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.virusres.2020.198074.
- (20) H. wei Jiang et al., "SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 17, no. 9, pp. 998–1000, Sep. 2020, doi: 10.1038/S41423-020-0514-8.

- (21) P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, and V. Thiel, "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 155–170, Mar. 2021, doi: 10.1038/S41579-020-00468-6.
- (22) Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS: Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity* 2019, 50:907-923.
- (23) Hoffmann HH, Schneider WM, Rice CM: Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol* 2015, 36:124-138.
- (24) Meyts I, Casanova JL: Viral infections in humans and mice with genetic deficiencies of the type I IFN response pathway. *Eur J Immunol* 2021:1039-1061.
- (25) R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, Z. J. Chen, Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappa Band IRF 3. *Cell* 122, 669–682 (2005).
- (26) E. Meylan et al., Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172 (2005).
- (27) J. Zhu et al., Argininemonomethylation by PRMT7 controls MAVS-mediated antiviral innate immunity. *Mol. Cell* 81, 3171–3186.e8 (2021).
- (28) C. M. Daniels, S. E. Ong, A. K. Leung, The promise of proteomics for the study of ADP-ribosylation. *Mol. Cell* 58, 911–924 (2015).
- (29) Salvi V, Nguyen HO, Sozio F, Schioppa T, Gaudenzi C, Laffranchi M, Scapini P, Passari M, Barbazza I, Tiberio L et al.: SARS-CoV-2-associated ssRNAs activate inflammation and immunity via TLR7/8. *JCI Insight* 2021, 6.
- (30) Onodi F, Bonnet-Madin L, Meertens L, Karpf L, Poirot J, Zhang SY, Picard C, Puel A, Jouanguy E, Zhang Q et al.: SARS-CoV-2 induces human plasmacytoid dendritic cell diversification via UNC93B and IRAK4. *J Exp Med* 2021, 218.
- (31) Greene TT, Zuniga EI: Type I interferon induction and exhaustion during viral infection: plasmacytoid dendritic cells and emerging COVID-19 findings. *Viruses* 2021, 13.
- (32) Severa M, Diotti RA, Etna MP, Rizzo F, Fiore S, Ricci D, Iannetta M, Sinigaglia A, Lodi A, Mancini N et al.: Differential plasmacytoid dendritic cell phenotype and type I interferon response in asymptomatic and severe COVID-19 infection. *PLoS Pathog* 2021, 17:e1009878.

- (33) Lei X, Dong X, Ma R, Wang W, Xiao X, Tian Z, Wang C, Wang Y, Li L, Ren L et al.: Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* 2020, 11:3810.
- (34) Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JY, Wang H, Menachery VD, Rajsbaum R, Shi PY: Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep* 2020, 33:108234.
- (35) Tay MZ, Poh CM, Rénia L, Macary PA, Ng LF. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 20(6), 363–374 (2020).
- (36) Yang M. Cell pyroptosis, a potential pathogenic mechanism of 2019-nCoV infection. *SSRN* 3527420 (2020).
- (37) Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 2009, 27, 229–265.
- (38) Azkur, A.K.; Akdis, M.; Azkur, D.; Sokolowska, M.; van de Veen, W.; Brügger, M.-C.; O'Mahony, L.; Gao, Y.; Nadeau, K.; Akdis, C.A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy* 2020, 75, 1564–1581.
- (35) Chen, X.; Liu, S.; Goraya, M.U.; Maarouf, M.; Huang, S.; Chen, J.L. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front. Immunol.* 2018, 9, 320.
- (36) Krämer, Benjamin et al. “Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19.” *Immunity* vol. 54,11 (2021): 2650-2669.e14. doi:10.1016/j.immuni.2021.09.002
- (37) Vorobjeva, N.V.; Chernyak, B.V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry* 2020, 85, 1178–1190.
- (38) Voiriot, G., Dorgham, K., Bachelot, G., Fajac, A., Morand-Joubert, L., Parizot, C., et al. Identification of bronchoalveolar and blood immune inflammatory biomarker signature associated with poor 28-day outcome in critically ill COVID-19 patients. *Scientific reports.* 2022. 12(1):9502.
- (39) Dentone, C., Vena, A., Loconte, M., Grillo, F., Brunetti, I., Barisione, E., et al., Bronchoalveolar lavage fluid characteristics and outcomes of invasively mechanically ventilated patients with COVID-19 pneumonia in Genoa, Italy. *BMC Infect Dis.* 2021. 21(1): 353.

- (40) Zhu, Y., Chen, X. and Liu, X., NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Frontiers in Immunology*. 2022. 13.
- (41) Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil Extracellular Traps - the Dark Side of Neutrophils. *J Clin Invest* (2016) 126:1612–20. doi: 10.1172/JCI84538
- (42) Zaid Y, Puhm F, Allaeyes I, Naya A, Oudghiri M, Khalki L, et al. Platelets can Associate With SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. *Circ Res* (2020) 127:1404–18. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317703
- (43) Dupont A, Rauch A, Staessens S, Moussa M, Rosa M, Corseaux D, et al. Vascular Endothelial Damage in the Pathogenesis of Organ Injury in Severe COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2021) 41:1760–73. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315595
- (44) van den Berg, D.F.; Te Velde, A.A. Severe COVID-19: NLRP3 inflammasome dysregulated. *Front. Immunol.* 2020, 11, 1580.
- (45) Yong, Y.-Y.; Zhang, L.; Hu, Y.-J.; Wu, J.-M.; Yan, L.; Pan, Y.-R.; Tang, Y.; Yu, L.; Law, B.Y.-K.; Yu, C.-L.; et al. Targeting autophagy regulation in NLRP3 inflammasome-mediated lung inflammation in COVID-19. *Clin. Immunol.* 2022, 244, 109093.
- (46) Zhao, N.; Di, B.; Xu, L.L. The NLRP3 inflammasome and COVID 19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021, 61, 2–15.
- (47) Dinarello, C.A. (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550
- (48) Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8, 1812–1825
- (49) Soy, M.; Keser, G.; Atagündüz, P.; Tabak, F.; Atagündüz, I.; Kayhan, S. Cytokine storm in COVID-19: Pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin. Rheumatol.* 2020, 39, 2085–2094.
- (50) Melazzini, F.; Colaneri, M.; Fumoso, F.; Freddi, G.; Lenti, M.V.; Pieri, T.C.; Piloni, D.; Noris, P.; Pieresca, C.; Preti, P.S.; et al. Venous thromboembolism and COVID19: A single center experience from an academic tertiary referral hospital of Northern Italy. *Intern. Emerg. Med.* 2021, 16, 1141–1152.
- (51) Waggoner SN, Reighard SD, Gyurova IE et al. Roles of Natural killer cells in antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* 16, 15–23 (2016).

- (52) Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The broad spectrum of human Natural killer cell diversity. *Immunity* 47(5), 820–833(2017).
- (53) Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.* 9, 1869 (2018).
- (54) Biassoni R, Malnati MS. Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Current Protoc. Immunol.* 121(1), e47 (2018).
- (55) Boudreau JE, Hsu KC. Natural killer cell education in human health and disease. *Curr. Opin. Immunol.* 50, 102–111 (2018).
- (56) Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* 128(2), 151–163 (2009).
- (57) Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharm. Anal.* 10(2), 102–108(2020).
- (58) Acharya D, Liu G, Gack MU. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 397–398 (2020).
- (59) Osman M, Faridi RM, Sligl W et al. Impaired Natural killer cell counts and cytolytic activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv.* 4(20), 5035–5039 (2020).
- (60) Bordoni V, Sacchi A, Cimini E et al. An inflammatory profile correlates with decreased frequency of cytotoxic cells in coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 71(16), 2272–2275 (2020).
- (61) Demaria O, Carvelli J, Batista L et al. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural killer cells in COVID-19. *Cell Mol. Immunol.* 17(9), 995–997 (2020).
- (62) Varchetta S, Mele D, Oliviero B et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol. Immunol.* 18(3), 604–612(2020).
- (63) Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.* 109, 102433 (2020).
- (64) Walport MJ. Complement. *N Engl J Med* 2001;344:1058–66. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>.

(65) Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 2010. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>.

(66) Reis ES, Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. New insights into the immune functions of complement. *Nat Rev Immunol* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0168-x>.

(67) Heesterbeek DA, Bardoel BW, Parsons ES, Bennett I, Ruyken M, Doorduyn DJ, et al. Bacterial killing by complement requires membrane attack complex formation via surface-bound C5 convertases. *EMBO J* 2019. <https://doi.org/10.15252/embj.201899852>.

(68) Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1305>.

(69) Ali YM, Ferrari M, Lynch NJ, Yaseen S, Dudler T, Gragerov S, et al. Lectin pathway mediates complement activation by SARS-CoV-2 proteins. *Front Immunol* 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714511>.

(70) Yu J, Yuan X, Chen H, Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition. *Blood* 2020. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020008248>.

(71) Afzali B, Noris M, Lambrecht BN, Kemper C. The state of complement in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00665-1>.

(72) Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P, et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest* 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI141374>.

(73) Wang X, Guan F, Miller H, Byazrova MG, Cndotti F, Benlagha K, Camara NOS, Lei J, Filatov A, Liu C. The role of dendritic cells in COVID-19 infection. *Emerg Microbes Infect.* 2023 Mar 22:2195019. doi: 10.1080/22221751.2023.2195019. Epub ahead of print. PMID: 36946172.

(74) Winheim E, Rinke L, Lutz K, Reischer A, Leutbecher A, Wolfram L, Rausch L, Kranich J, Wratil PR, Huber JE, Baumjohann D, Rothenfusser S, Schubert B, Hilgendorff A, Hellmuth JC, Scherer C, Muenchhoff M, von Bergwelt-Baildon M, Stark K, Straub T, Brocker T, Keppler OT, Subklewe M, Krug AB. Impaired function and

delayed regeneration of dendritic cells in COVID-19. *PLoS Pathog.* 2021 Oct 6;17(10):e1009742.

(75) Úbeda, María et al. “Diversity of immune responses in children highly exposed to SARS-CoV-2.” *Frontiers in immunology* vol. 14 1105237. 3 Mar. 2023, doi:10.3389/fimmu.2023.1105237

(76) Úbeda, María et al. “Diversity of immune responses in children highly exposed to SARS-CoV-2.” *Frontiers in immunology* vol. 14 1105237. 3 Mar. 2023, doi:10.3389/fimmu.2023.1105237.

(77) Cyster, J. G. & Allen, C. D. C. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. *Cell* 177, 524–540 (2019).

(78) Victora, G. D. et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605 (2010).

(79) Gitlin, A. D., Shulman, Z. & Nussenzweig, M. C. Clonal selection in the germinal center by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509, 637–640 (2014).

(80) Gitlin, A. D. et al. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science* 349, 643–646 (2015).

(81) Kräutler, N. J. et al. Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by T_H cells. *J. Exp. Med.* 214, 1259–1267 (2017).

(82) Allen, C. D. C., Okada, T. & Cyster, J. G. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190–202 (2007).

(83) Crotty, S. et al. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J. Immunol.* 171, 4969–4973 (2003).

(84) Zuccarino-Catania, G. V. et al. CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat. Immunol.* 15, 631–637 (2014)

(85) Adachi, Y. et al. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* 212, 1709–1723 (2015).

- (86) Hammarlund, E. et al. Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nat. Commun.* 8, 1781 (2017).
- (87) Brynjolfsson, S. F., Mohaddes, M., Kärrholm, J. & Wick, M.-J. Long-lived plasma cells in human bone marrow can be either CD19⁺ or CD19⁻. *Blood Adv.* 1, 835–838 (2017).
- (88) Dan, J. M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 371, eabf4063 (2021).
- (89) Gaebler, C. et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 591, 639–644 (2021).
- (90) Chen J, Subbarao K. The immunobiology of sars*. *Annu Rev Immunol* (2007) 25:443–72. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141706
- (91) Li G, Chen X, Xu A. Profile of specific antibodies to the sars-associated coronavirus. *N Engl J Med* (2003) 349(5):508–9. doi: 10.1056/NEJM200307313490520
- (92) Hsueh PR, Huang LM, Chen PJ, Kao CL, Yang PC. Chronological evolution of igm, iga, igg and neutralisation antibodies after infection with sars-associated coronavirus. *Clin Microbiol Infect* (2004) 10(12):1062–6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01009.x
- (92) Sakharkar, M. et al. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection. *Sci. Immunol.* 6, eabg6916 (2021).
- (93) Dan, J. M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 371, eabf4063 (2021).
- (94) Klein SL, Pekosz A, Park HS, et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J Clin Invest.* 2020;130(11):6141-6150.
- (95) Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science.* 2020;370(6521):1227-1230.
- (96) Perreault J, Tremblay T, Fournier MJ, et al. Waning of SARS-CoV-2 RBD antibodies in longitudinal convalescent plasma samples within 4 months after symptom onset. *Blood.* 2020;136(22):2588-2591.

- (97) Marot S, Malet I, Leducq V, et al. Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers. *Nat Commun.* 2021;12(1):844..
- (98) Roltgen K, Powell AE, Wirz OF, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol.* 2020;5(54):eabe0240.
- (99) Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* 2020;383(18):1724-1734.
- (100) Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun.* 2021;12(1):1162.
- (101) Alfego D, Sullivan A, Poirier B, Williams J, Adcock D, Letovsky S. A population-based analysis of the longevity of SARS-CoV-2 antibody seropositivity in the United States. *EClinicalMedicine.* 2021;36:100902.
- (102) Lumley SF, Wei J, O'Donnell D, et al. The duration, dynamics, and determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibody responses in individual healthcare workers. *Clin Infect Dis.* 2021;73(3):e699-e709
- (103) Krutikov M, Palmer T, Tut G, et al. Prevalence and duration of detectable SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies in staff and residents of long-term care facilities over the first year of the pandemic (VIVALDI study): prospective cohort study in England. *Lancet Healthy Longev.* 2022;3(1):e13-e21.
- (104) Haveri A, Ekstrom N, Solastie A, et al. Persistence of neutralizing antibodies a year after SARS-CoV-2 infection in humans. *Eur J Immunol.* 2021;51(12):3202-3213.
- (105) He Z, Ren L, Yang J, et al. Seroprevalence and humoral immune durability of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Wuhan, China: a longitudinal, population-level, cross-sectional study. *Lancet.* 2021;397(10279):1075-1084.
- (105) Klein SL, Pekosz A, Park HS, et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J Clin Invest.* 2020;130(11):6141-6150.
- (106) Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun.* 2021;12(1):1162.
- (107) Turner, J. S. et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature* 595, 421–425 (2021).

- (107) Levin, E. G. et al. Waning immune humoral response to BNT162b2 Covid-19 vaccine over 6 months. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/nejmoa2114583> (2021).
- (108) Kuri-Cervantes, L. et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* 5, eabd7114 (2020).
- (109) Long, Q.-X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 26, 845–848 (2020).
- (110) Woodruff, M. C. et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.* 21, 1506–1516 (2020).
- (111) Kaneko, N. et al. Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19. *Cell* 183, 143–157.e13 (2020).
- (112) Fenoglio, D. et al. Characterization of T lymphocytes in severe COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* 93, 5608–5613 (2021).
- (113) Adamo, S. et al. Profound dysregulation of T cell homeostasis and function in patients with severe COVID-19. *Allergy* 76, 2866–2881 (2021).
- (114) Zhang, J. et al. Spike-specific circulating T follicular helper cell and cross-neutralizing antibody responses in COVID-19-convalescent individuals. *Nat. Microbiol.* 6, 51–58 (2021).
- (115) Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology.* 2010; 131:9–17. [PubMed: 20586810]
- (116) Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell.* 2011; 20:131–9. [PubMed: 21238931]
- (117) Mandl, J. N. et al. Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naïve CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 38, 263–274 (2012).
- (118) Shioh, L. R. et al. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440, 540–544 (2006).
- (119) Mescher, M. F. et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 211, 81–92 (2006).

- (120)Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 2009;206:2059-2066.
- (121)Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009) Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10:857–863
- (122)Ramirez JM, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes T, Dayer JM, Saurat JH, Roosnek E, Chizzolini C (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *Eur J Immunol* 40:2450–2459
- (123)Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, and Maclennan ICM (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol* 34, 335–368. [PubMed: 26907215]
- (124)Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, Barnett B, Crotty S. 2010. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185: 190–202.
- (125)Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. 2009. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10: 385–393.
- (126)Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057–61. [PubMed: 12522256]
- (127)Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21:503-513.
- (128)Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10398-10403.
- (129) Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-1265.

- (130) Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007;8:145-153.
- (131) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-1132.
- (132) Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007;8:145-153.
- (133) Schulz, O. et al. (2016) Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 203–242
- (134) Gilchuk, P. et al. (2016) A distinct lung-interstitium-resident memory CD8+ T cell subset confers enhanced protection to lower respiratory tract infection. *Cell Rep.* 16, 1800–1809
- (135) Fernandez-Ruiz, D. (2016) Liver-resident memory CD8+ T cells form a front-line defense against malaria liver-stage infection. *Immunity* 45, 889–902
- (136) de la Roche, M. et al. (2016) Origins of the cytolytic synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 421–432
- (137) Tirosh, R. & Berke, G. T lymphocyte-mediated cytolysis as an excitatory process of the target. I. Evidence that the target may be the site of Ca²⁺ action. *Cell. Immunol.* 95, 113–123 (1985).
- (138) Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 388–400 (2015).
- (139) Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C. & Tschopp, J. Cytolytic T cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650–652 (1994).
- (140) Kaech SM, Cui W (2012) Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12:749–761
- (141) Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F et al (2010) Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32:79–90

- (142)Tang Y, Guan SP, Chua BY et al (2012) Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN-gamma and dendritic cell function. *J Allergy Clin Immunol* 129(1611–1620):e4
- (143)Omori M, Yamashita M, Inami M et al (2003) CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA. *Immunity* 19:281–294
- (144)Man K, Miasari M, Shi W et al (2013) The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* 14:1155–1165
- (145)Lu Y, Hong B, Li H et al (2014) Tumor-specific IL-9-producing CD8⁺ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc Natl Acad SciUSA* 111:2265–2270
- (146)Robb RJ, Lineburg KE, Kuns RD et al (2012) Identification and expansion of highly suppressive CD8⁺FoxP3⁺ regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 119:5898–5908
- (147)Tsai S, Shameli A, Yamanouchi J et al (2010) Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells. *Immunity* 32:568–580
- (148)Tubo NJ, Fife BT, Pagan AJ, Kotov DI, Goldberg MF, Jenkins MK. Most microbe-specific naive CD4⁺ T cells produce memory cells during infection. *Sci Immunol* 2016; 351:511–4.
- (149)Gerlach C, et al. One naive T cell, multiple fates in CD8⁺ T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 2010; 207:1235–1246. [PubMed: 20479114]
- (150) Youngblood, Ben et al. “Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells.” *Nature* vol. 552,7685 (2017): 404-409. doi:10.1038/nature25144
- (151)Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nature Med.* 2005; 11:748– 756. [PubMed: 15951824]
- (152)Joshi NS, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁺ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007; 27:281–295. [PubMed:17723218]

- (153)J.T. Pingel, M.L. Thomas, Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation, *Cell* 58 (1989) 1055–1065.
- (154)D. Mason, Subsets of CD4+ T cells defined by their expression of different isoforms of the leukocyte-common antigen, CD45, *Biochem. Soc. Trans.* 20 (1992) 188–190.
- (155)D. Rizzo, A. Lotay, N. Gachard, I. Marfak, J.L. Faucher, F. Trimoreau, et al., Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment-free survival, *Am. J. Hematol.* 88 (2013) 747–753.
- (156)Potsch, C; Vöhringer, D; Pircher, H «Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity.»*European journal of immunology*, 29, 11, novembre 1999, pàg.3562-70.PMID:10556810.
- (157)Sallusto, F.; Lenig, D.; Forster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401, 708–712.
- (158)Hengel, R.L.; Thaker, V.; Pavlick, M.V.; Metcalf, J.A.; Dennis, G., Jr.; Yang, J.; Lempicki, R.A.; Sereti, I.; Lane, H.C. Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen. *J. Immunol.* 2003, 170, 28–32
- (159)Wang, A.; Chandran, S.; Shah, S.A.; Chiu, Y.; Paria, B.C.; Aghamolla, T.; Alvarez-Downing, M.M.; Lee, C.C.; Singh, S.; Li, T.; et al. The stoichiometric production of IL-2 and IFN-gamma mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans. *Sci. Transl. Med.* 2012.
- (160)Fazilleau, N.; Eisenbraun, M.D.; Malherbe, L.; Ebright, J.N.; Pogue-Caley, R.R.; McHeyzer-Williams, L.J.; McHeyzer-Williams, M.G. Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat. Immunol.* 2007, 8, 753–761.
- (161)Jain, A.; Song, R.; Wakeland, E.K.; Pasare, C. T cell-intrinsic IL-1R signaling licenses effector cytokine production by memory CD4 T cells. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3185.

- (162)Jiang, X.; Clark, R.A.; Liu, L.; Wagers, A.J.; Fuhlbrigge, R.C.; Kupper, T.S. Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 2012, 483, 227–231.
- (163)Kohlmeier, J.E.; Cookenham, T.; Roberts, A.D.; Miller, S.C.; Woodland, D.L. Type I interferons regulate cytolytic activity of memory CD8⁽⁺⁾ T cells in the lung airways during respiratory virus challenge. *Immunity* 2010, 33, 96–105.
- (164)Kumar, B.V.; Ma, W.; Miron, M.; Granot, T.; Guyer, R.S.; Carpenter, D.J.; Senda, T.; Sun, X.; Ho, S.H.; Lerner, H.; et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep.* 2017, 20, 2921–2934.
- (165)Marshall, H.D.; Chandele, A.; Jung, Y.W.; Meng, H.; Poholek, A.C.; Parish, I.A.; Rutishauser, R.; Cui, W.; Kleinstein, S.H.; Craft, J.; et al. Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4⁽⁺⁾ cell properties during viral infection. *Immunity* 2011, 35, 633–646.
- (166)Joshi, N.S.; Cui, W.; Chandele, A.; Lee, H.K.; Urso, D.R.; Hagman, J.; Gapin, L.; Kaech, S.M. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 2007, 27, 281–295.
- (167)Pepper, M.; Linehan, J.L.; Pagan, A.J.; Zell, T.; Dileepan, T.; Cleary, P.P.; Jenkins, M.K. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat. Immunol.* 2010, 11, 83–89.
- (168)McKinstry, K.K.; Strutt, T.M.; Bautista, B.; Zhang, W.; Kuang, Y.; Cooper, A.M.; Swain, S.L. Effector CD4 T-cell transition to memory requires late cognate interactions that induce autocrine IL-2. *Nat Commun.* 2014, 5, 5377.
- (169)Raeber, M.E.; Zurbuchen, Y.; Impellizzieri, D.; Boyman, O. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunol. Rev.* 2018, 283, 176–193.
- (170) Dhume, K.; McKinstry, K.K. Early programming and late-acting checkpoints governing the development of CD4 T-cell memory. *Immunology* 2018, 155, 53–62
- (171) Wang, D.; Yuan, R.; Feng, Y.; El-Asady, R.; Farber, D.L.; Gress, R.E.; Lucas, P.J.; Hadley, G.A. Regulation of CD103 expression by CD8⁺ T cells responding to renal allografts. *J. Immunol.* 2004, 172, 214–221.

- (172) Sanchez, A.M.; Zhu, J.; Huang, X.; Yang, Y. The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. *J. Immunol.* 2012, 189, 2805–2814.
- (173) Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* (2003) 4:225–34. doi: 10.1038/ni889
- (174) Cui W, Liu Y, Weinstein JS, Craft J, Kaech SM. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. *Immunity* (2011) 35:792–805. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.017
- (175) Ichii H, Sakamoto A, Kuroda Y, Tokuhisa T. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *J Immunol.* (2004) 173:883–91. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.883
- (176) Zhou X, Yu S, Zhao DM, Harty JT, Badovinac VP, Xue HH. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* (2010) 33:229–40. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.002
- (177) Ji Y, Pos Z, Rao M, Klebanoff CA, Yu Z, Sukumar M, et al. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol.* (2011) 12:1230–7. doi: 10.1038/ni.2153
- (178) Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* (2003) 4:225–34. doi: 10.1038/ni889
- (179) Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43: 2797–2809. doi:10.1002/eji.201343751
- (180) Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* (2007) 27:281–95. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.010.
- (181) Intlekofer M, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol.* (2005) 6:1236–44. doi: 10.1038/ni1268

- (182)Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* (2009) 31:296–308. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.014
- (183)Cannarile MA, Lind NA, Rivera R, Sheridan AD, Camfield KA, Wu BB, et al. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol.* (2006) 7:1317–25. doi: 10.1038/ni1403
- (184)Yang Y, Best JA, Knell J, Yang E, Sheridan AD, Jesionek AK, et al. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol.* (2011) 12:1221–9. doi: 10.1038/ni.2158
- (185)Lugli E, Goldman CK, Perera LP, Smedley J, Pung R, Yovandich JL, Creekmore SP, Waldmann TA, Roederer M. 2010. Transient and persistent effects of IL-15 on lymphocyte homeostasis in nonhuman primates. *Blood* 116: 3238– 3248. doi:10.1182/blood-2010-03-275438
- (186)Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, Corthesy P, Devevre E, Speiser DE, Rufer N. 2007. Four functionally distinct populations of human effectormemory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178: 4112– 4119. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4112
- (187)Carbone FR (2015): Tissue-resident memory T cells and fixed immune surveillance in nonlymphoid organs. *J Immunol* 195: 17-22.
- (188)Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, et al. (2013): The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* 14: 1294-1301.
- (189)Mousavi SF, et al. OX40 costimulatory signals potentiate the memory commitment of effector CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2008; 181:5990–6001.
- (190) Hendriks J, et al. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J. Immunol.* 2005; 175:1665–1676. [PubMed: 16034107]
- (191)Pulle G, Vidric M, Watts TH. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J. Immunol.* 2006; 176:2739–2748.
- (192) Salek-Ardakani S, et al. The TNFR family members OX40 and CD27 link viral virulence to protective T cell vaccines in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121:296–307.

- (193) Han Int Rev Cell Mol Biol. 2019 ; 342: 1–25.
- (194)Zaunders JJ, Munier ML, Seddiki N, et al. High levels of human antigen-specific CD4+ T cells in peripheral blood revealed by stimulated coexpression of CD25 and CD134 (OX40). J Immunol 2009; 183: 2827–2836.
- (195)Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. Crit Rev Immunol 2009; 29: 187–201.
- (196) Stark R, Hartung A, Zehn D, Frentsch M, Thiel A. IL-12- mediated STAT4 signaling and TCR signal strength cooperate in the induction of CD40L in human and mouse CD8+ T cells. Eur J Immunol 2013; 43: 1511– 1517.
- (197) Phetsouphanh C, Khoo WH, Jackson K, et al. High titre neutralizing antibodies in response to SARS-CoV-2 infection require RBD-specific CD4 T cells that include proliferative memory cells. Front Immunol 2022; 13:1032911.
- (198)Nowak A, Lock D, Bacher P, et al. CD137+CD154 expression as a regulatory T cell (Treg)-specific activation signature for identification and sorting of stable human Tregs from in vitro expansion cultures. Front Immunol2018; 9: 199.
- (199) Cannons JL, Lau P, Ghumman B, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. J Immunol 2001; 167: 1313–1324.
- (200)Kwon BS, Hurtado JC, Lee ZH, et al. Immune responses in 4-1BB (CD137) - deficient mice. J Immunol 2002; 168: 5483–5490.
- (201)Agarwal P, et al. Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. J. Immunol. 2009; 183:1695–1704.
- (202)Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe covid-19 is il-6 dependent. J Clin Invest (2020) 130 (9):4694–703. doi: 10.1172/JCI138554
- (203)Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. J Clin Invest (2020) 130(5):2620–9. doi: 10.1172/JCI137244

- (204)Urra JM, Cabrera CM, Porras L, Rodenas I. Selective Cd8 cell reduction by sars-Cov-2 is associated with a worse prognosis and systemic inflammation in covid-19 patients. *Clin Immunol* (2020) 217:108486. doi: 10.1016/j.clim.2020.108486
- (205)Kreutmair S, Unger S, Nunez NG, Ingelfinger F, Alberti C, De Feo D, et al. Distinct immunological signatures discriminate severe covid-19 from non-Sars-Cov-2-Driven critical pneumonia. *Immunity* (2021) 54(7):1578–93 e5. doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.002
- (206)Notarbartolo S, Ranzani V, Bandera A, Gruarin P, Bevilacqua V, Putignano AR, et al. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in covid-19 patients. *Sci Immunol* (2021) 6(62). doi: 10.1126/sciimmunol.abg5021
- (207)Kuo, I-Ying et al. “Converged Rab37/IL-6 trafficking and STAT3/ PD-1 transcription axes elicit an immunosuppressive lung tumor microenvironment.” *Theranostics* vol. 11,14 7029-7044. 12 May. 2021, doi:10.7150/thno.60040
- (208)Song JW, Zhang C, Fan X, Meng FP, Xu Z, Xia P, et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of covid-19. *Nat Commun* (2020) 11(1):3410. doi: 10.1038/s41467-020-17240-2
- (209)De Biasi, Sara et al. “Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia.” *Nature communications* vol. 11,1 3434. 6 Jul. 2020, doi:10.1038/s41467-020-17292-4
- (210)Wei L-L, Wang W-J, Chen D-X, Xu B. Dysregulation of the immune response affects the outcome of critical COVID-19 patients. *J Med Virol* (2020) 92:2768–76. doi:10.1002/jmv.26181
- (211) Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* (2020) 183:996– 1012.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038
- (212)Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory Cd4(+) and Cd8(+) T cells induced by sars-Cov-2 in uk convalescent individuals following covid-19. *Nat Immunol* (2020) 21(11):1336–45. doi: 10.1038/s41590-020-0782-6

- (213)Notarbartolo S, Ranzani V, Bandera A, Gruarin P, Bevilacqua V, Putignano AR,et al. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in covid-19 patients. *Sci Immunol* (2021) 6(62). doi: 10.1126/ sciimmunol.abg5021
- (214) Beyer, Daniel K, and Adriana Forero. “Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2.” *Journal of molecular biology* vol. 434,6 (2022): 167265. doi:10.1016/j.jmb.2021.167265
- (215)Zhang, Y., Chen, Y., Li, Y., Huang, F., Luo, B., Yuan, Y., et al., 2021a. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118 (23).
- (216) Yoo, J.-S., Sasaki, M., Cho, S.X., Kasuga, Y., Zhu, B., Ouda, R., et al., 2021. SARS-CoV-2 inhibits induction of the MHC class I pathway by targeting the STAT1 IRF1-NLRC5 axis. *Nat. Commun.* 12 (1), 6602.
- (217) Charlson, Mary E et al. “Charlson Comorbidity Index: A Critical Review of Clinimetric Properties.” *Psychotherapy and psychosomatics* vol. 91,1 (2022): 8-35. doi:10.1159/000521288.
- (218) Pijls BG, Jolani S, Atherley A et al (2021) Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies. *BMJ*, (Open) 11:e044640. [https:// doi. org/ 10. 1136/ bmjop en- 2020- 044640](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-044640).
- (219) Imam Z, Odish F, Gill I, et al. Older age and comorbidity are independent mortality predictors in a large cohort of 1305 COVID-19 patients in Michigan, United States. *J Intern Med.* 2020 10.1111/joim.13119.
- (220) Onder G., Rezza G., Brusaferro S. (2020). Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy. *JAMA* 323 (18), 1775–1776. doi: 10.1001/jama.2020.4683
- (221) Huang S, Wang J, Liu F, et al. COVID-19 patients with hypertension have more severe disease: a multicenter retrospective observational study. *Hypertens Res.* 2020 10.1038/s41440-020-0485-2.
- (222) Guo W, Li M, Dong Y, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev.* 2020; e3319 10.1002/dmrr.3319.

- (223) Hernández-Garduño E Obesity is the comorbidity more strongly associated for Covid-19 in Mexico. A case-control study. *Obes Res Clin Pract.* 2020 10.1016/j.orcp.2020.06.001.
- (224) Lighter J, Phillips M, Hochman S, et al. Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):896-897. doi:10.1093/cid/ciaa415
- (225) Papadopoulos V, Li L, Samplaski M (2021) Why does COVID-19 kill more elderly men than women? Is there a role for testosterone? *Andrology* 9:65–72. <https://doi.org/10.1111/andr.12868>.
- (226) Zhang JJ, Cao YY, Tan G, et al. Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. *Allergy.* 2021;76(2):533-550. doi:10.1111/all.14496
- (227) Anft M, Paniskaki K, Blazquez-Navarro A, et al. COVID-19-Induced ARDS Is Associated with Decreased Frequency of Activated Memory/Effector T Cells Expressing CD11a+. *Mol Ther.* 2020;28(12):2691-2702. doi:10.1016/j.ymthe.2020.10.001.
- (228) Zhou R, To KK, Wong YC, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity.* 2020;53(4):864-877.e5. doi:10.1016/j.immuni.2020.07.026
- (229) Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(10):626-636.
- (230) Lipsitch M, Krammer F, Regev-Yochay G, Lustig Y, Balicer RD. SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated individuals: measurement, causes and impact. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(1):57-65.
- (231) Ny P, Kelsom C, Chron A, et al. Factors associated with prompt recovery among hospitalised patients with coronavirus disease 2019. *Int J Clin Pract.* 2021;75(11):e14818. doi:10.1111/ijcp.14818
- (232) Ergenc I, Capar E, Erturk SB, et al. Diagnostic performance of lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes levels for the severity of COVID-19. *J Med Biochem.* 2023;42(1):16-26. doi:10.5937/jomb0-37234

- (233) Kurian SJ, Mathews SP, Paul A, et al. Association of serum ferritin with severity and clinical outcome in COVID-19 patients: An observational study in a tertiary healthcare facility. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2023;21:101295. doi:10.1016/j.cegh.2023.101295
- (234) Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10239):1763-1770. doi:10.1016/S0140-6736(20)31189-2
- (235) Molins B, Figueras-Roca M, Valero O, et al. C-reactive protein isoforms as prognostic markers of COVID-19 severity. *Front Immunol*. 2023;13:1105343. Published 2023 Jan 18. doi:10.3389/fimmu.2022.1105343
- (236) Yiu H.H., Graham A.L., Stengel R.F. Dynamics of a cytokine storm. *PLoS One*. 2012;7(10)
- (237) Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. (2020) 130:2620–9. doi: 10.1101/2020.02.16.20023903
- (238) Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. (2020). doi: 10.2139/ssrn.3541136. [Epub ahead of print].
- (239) Klein C, Wüstefeld T, Assmus U, Roskams T, Rose-John S, Müller M, Manns MP, Ernst M, Trautwein C. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):860-9. doi: 10.1172/JCI23640. Epub 2005 Mar 3. PMID: 15761498; PMCID: PMC1059450.
- (240) Unver N, McAllister F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018 Jun;41:10-17.
- (241) Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell*. 2020;182(6):1401-1418.e18. doi:10.1016/j.cell.2020.08.002
- (242) Udeh R, Advani S, de Guadiana Romualdo LG, Dolja-Gore X. Calprotectin, an Emerging Biomarker of Interest in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2021;10(4):775. Published 2021 Feb 15. doi:10.3390/jcm10040775

- (243) Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Miao H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. 3 2020. doi:10.1101/2020.03.01.20029074
- (244) Xie G, Ding F, Han L, Yin D, Lu H, Zhang M. The role of peripheral blood eosinophil counts in COVID-19 patients. *Allergy*. 2020 10.1111/all.14465.
- (245) Moss P. The T cell immune response against sars-Cov-2. *Nat Immunol* (2022) 23 (2):186–93. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w
- (246) Popescu I, Snyder ME, Isella CJ, Hannan SJ, Koshy R, Burke R, et al. Cd4(+) T-cell dysfunction in severe covid-19 disease is tumor necrosis factor-Alpha/Tumor necrosis factor receptor 1-dependent. *Am J Respir Crit Care Med* (2022) 205(12):1403–18. doi: 10.1164/rccm.202111-2493OC
- (247) Vitte J., Diallo A.B., Boumaza A., Lopez A., Michel M., Allardet-Servent J., Mezouar S., Sereme Y., Busnel J.-M., Miloud T., et al. A Granulocytic Signature Identifies COVID-19 and Its Severity. *J. Infect. Dis.* 2020;222 doi: 10.1093/infdis/jiaa591
- (248) Segalo S, Kiseljakovic E, Papic E, et al. The Role of Hemogram-derived Ratios in COVID-19 Severity Stratification in a Primary Healthcare Facility. *Acta Inform Med.* 2023;31(1):41-47. doi:10.5455/aim.2023.31.41-47
- (249) Cai J,LiH,Zhang C,Chen Z, LiuH,Lei F, et al.TheNeutrophil-To-Lymphocyte Ratio Determines Clinical Efficacy of Corticosteroid Therapy in Patients With COVID-19. *Cell Metab* (2021) 33:258–69. doi: 10.1016/j.cmet.2021.01.002
- (250)Wang H, Zhang Y, Mo P, Liu J, Wang H, Wang F, et al. Neutrophil to CD4+ Lymphocyte Ratio as a Potential Biomarker in Predicting Virus Negative Conversion Time in COVID-19. *Int Immunopharmacol* (2020) 85:106683. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106683
- (251) Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. (2020) 395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- (252) Zhu Y, Chen X, Liu X. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Front Immunol*. 2022;13:838011. Published 2022 Mar 2. doi:10.3389/fimmu.2022.838011

- (253) Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I ifns in patients with life-threatening covid-19. *Science* (2020) 370(6515). doi: 10.1126/science.abd4585
- (254) Q. Zhang et al., Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370, eabd4570 (2020). doi: 10.1126/science.abd4570
- (255) Solanich X, Rigo-Bonnin R, Gumucio VD, et al. Pre-existing Autoantibodies Neutralizing High Concentrations of Type I Interferons in Almost 10% of COVID-19 Patients Admitted to Intensive Care in Barcelona. *J Clin Immunol.* 2021;41(8):1733-1744. doi:10.1007/s10875-021-01136-x
- (256) Lucas, Carolina et al. "Kinetics of antibody responses dictate COVID-19 outcome." medRxiv : the preprint server for health sciences 2020.12.18.20248331. 22 Dec. 2020, doi:10.1101/2020.12.18.20248331.
- (257) Koutsakos, Marios et al. "Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses." *Cell reports. Medicine* vol. 2,3 (2021): 100208. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100208
- (258) Choteau M, Scohy A, Messe S et al (2022) Development of SARSCoV-2 humoral response including neutralizing antibodies is not sufficient to protect patients against fatal infection. *Sci Rep* 12:2077. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06038-5>
- (259) Tan, L.; Wang, Q.; Zhang, D.; Ding, J.; Huang, Q.; Tang, Y.-Q.; Wang, Q.; Miao, H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: A descriptive and predictive study. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020, 5, 33.
- (260) Dai, Wei et al. "Characteristics of lymphocyte subset alterations in COVID-19 patients with different levels of disease severity." *Virology journal* vol. 19,1 192. 19 Nov. 2022, doi:10.1186/s12985-022-01926-8
- (261) Sarzi-Puttini P, Giorgi V, Sirotti S et al (2020) COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? *Clin Exp Rheumatol* 38:337–342
- (262) Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK (2021) Deciphering the COVID-19 cytokine storm: systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 51:e13429. <https://doi.org/10.1111/eci.13429>

- (263) Anft M, Paniskaki K, Blazquez-Navarro A, et al. COVID-19-Induced ARDS Is Associated with Decreased Frequency of Activated Memory/Effector T Cells Expressing CD11a+. *Mol Ther.* 2020;28 (12) :2691-2702. doi:10.1016/j.ymthe.2020.10.001
- (264) Amici S. A., Young N. A., Narvaez-Miranda J., et al. CD38 is robustly induced in human macrophages and monocytes in inflammatory conditions. *Frontier Immunology.* 2018;9:p. 1593. doi: 10.3389/fimmu.2018.01593.
- (265) Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5336-5341. doi:10.1073/pnas.0931259100
- (266) Odak I, Barros-Martins J, Bošnjak B, et al. Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19. *EBioMedicine.* 2020;57:102885. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102885
- (267) Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Roles played by lymphocyte function-associated antigen-1 in the regulation of lymphocytic cholinergic activity. *Life Sci.* 2007;80(24-25):2320-2324. doi:10.1016/j.lfs.2007.01.012
- (268) Koutsakos M, Rowntree LC, Hensen L, et al. Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses. *Cell Rep Med.* 2021;2(3):100208. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100208
- (269) Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):158-168.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.08.017.
- (270) Zhang T, Yu-Jing L, Ma T. Role of regulation of PD-1 and PD-L1 expression in sepsis. *Front Immunol.* 2023;14:1029438. Published 2023 Mar 9. doi:10.3389/fimmu.2023.1029438
- (271) Shao Z, Schwarz H. CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol.* 2011;89(1):21-29. doi:10.1189/jlb.0510315