



Universidad de Valladolid

Máster en Investigación Biomédica 2021/2022

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER:

“CARACTERIZACIÓN DEL SÍNDROME COVID
PERSISTENTE: ESTUDIO DEL INMUNOMA POR
CITOMETRÍA ESPECTRAL Y EVALUACIÓN DE LA
MEMORIA INMUNOLÓGICA”

Tutor

David Bernardo

Alumna

Marina Perez Mazzali

Resumen

El Síndrome COVID Persistente define un conjunto de signos y síntomas que experimentan los pacientes con un diagnóstico confirmado o probable de infección por SARS-CoV-2 generalmente en los 3 meses previos al inicio del mismo, y que perduran durante, al menos, 2 meses en un patrón que puede ser constante, recurrente o con fluctuaciones. Su fisiopatología es aún desconocida, aunque se han propuesto varias teorías que involucran al sistema inmune, indicando que podría ser la base de la patología. Para comprobarlo, nos propusimos caracterizar el inmunoma de los pacientes que lo padecen y compararlo con el de individuos que superaron la infección sin presentar secuelas. Para ello, evaluamos la respuesta inmune frente al SARS-CoV-2 y vimos que existe una clara tendencia de estos pacientes a presentar una menor memoria, tanto humoral como celular. Los anticuerpos que se vieron más afectados fueron los IgA, aquellos que mayor capacidad protectora poseen por ser los que neutralizan el virus en las puertas de entrada al organismo. Además, realizamos un inmunofenotipaje por citometría espectral para el estudiar las poblaciones de células inmunes y hallamos que los pacientes con COVID Persistente tienen disminuidos los linfocitos T CD4, las células Tregs y las T $\gamma\delta$, así como niveles más elevados de células NKT. Investigaciones futuras nos acercarán a determinar si la falta de respuesta en estos pacientes se debe a una menor reactividad o la depleción de linfocitos, y si la misma es virus-específica o puede verse comprometida también la respuesta ante otros patógenos.

1. Introducción

La pandemia causada por el SARS-Cov-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2) ha hecho estragos en todo el mundo, dejando al día de la redacción del presente trabajo más de 500 millones de casos confirmados y más de 6 millones de muertes, de acuerdo a datos oficiales de la OMS. Durante la etapa aguda de la enfermedad causada por este virus, la COVID-19, los pacientes experimentan desde síntomas leves hasta casos críticos o fatales. Aunque la mayoría de los pacientes que sobreviven a la infección se recuperan totalmente, algunos de ellos continúan manifestando síntomas de la enfermedad luego de su recuperación e, incluso pueden desarrollar nuevos síntomas en lo que se ha denominado Síndrome de COVID Persistente, COVID post-agudo o Long COVID (Anaya et al. 2021). Un estudio de seguimiento a pacientes con COVID leve y severo ha reportado síntomas persistentes en el 50.9% de los pacientes estudiados (Moreno-Pérez et al. 2021), mientras que otros señalan prevalencias que rondan el 11% al 30% de los pacientes recuperados (Castanares-Zapatero et al. 2022; Rigoni et al. 2022).

Esta condición, primero descrita por los propios pacientes que la padecían y su entorno social, fue en un principio subestimada por la comunidad médica que la trató como un problema más relacionado a la salud mental (Yong 2021) que a la física. Sin embargo, rápidamente fue ganando reconocimiento entre médicos y científicos (Yong 2021). Tanto es así que la OMS le otorgó un código en la clasificación internacional de enfermedades en septiembre de 2020, sólo unos meses después de declararse la pandemia (Organización Mundial de la Salud 2020). Si bien existía tal clasificación, útil para que los médicos pudieran reportarla y tener estadísticas oficiales, la definición de dicha condición no llegó hasta finales del año 2021. Ésta fue resultado de un consenso obtenido mediante el método Delphi en un proceso liderado por la OMS, con la participación de un panel internacional formado por pacientes, médicos y expertos (Soriano et al. 2021). De acuerdo a esta definición oficial, el síndrome de COVID Persistente es aquel cuadro que presentan los individuos adultos con un historial de infección por SARS-CoV-2 probable o confirmada, generalmente en los 3 meses previos al inicio del mismo, caracterizado por síntomas que persisten durante, al menos, 2 meses y que no pueden ser explicados por un diagnóstico alternativo (Soriano et al. 2021). Estos síntomas son muy variados e incluyen más comúnmente fatiga, dificultad para respirar y disfunción cognitiva, y generalmente afectan la vida cotidiana de quienes lo padecen. Estos pueden aparecer luego de la recuperación inicial o persistir desde el comienzo, pueden ser fluctuantes o reaparecer luego de un tiempo (Soriano et al. 2021). Esta definición, si bien para muchos incompleta, proporcionó un marco para el estudio de las características clínicas, los factores de riesgo y el desarrollo de posibles tratamientos.

Respecto de los síntomas referidos por los pacientes, la fatiga, la dificultad para respirar y los síntomas neurológicos (incluida la depresión) están dentro de los más reportados (Larijani et al. 2022; Anaya et al. 2021; Rigoni et al. 2022; Moreno-Pérez et al. 2021). Mientras que ciertos autores han encontrado un mayor riesgo de presentar COVID Persistente entre los pacientes que han sufrido COVID-19 severa con necesidad de soporte respiratorio (Rigoni et al. 2022), otros afirman que la severidad de la enfermedad no tiene que ver con su aparición, y que ésta se da indistintamente en pacientes que cursaron la enfermedad aguda de forma leve, moderada o grave (Anaya et al. 2021; Yong 2021). Sin embargo, un estudio multicéntrico halló que el sexo femenino, la cantidad de comorbilidades y, sobre todo, la carga de síntomas al ingreso del hospital durante la fase aguda están correlacionados con una mayor cantidad de síntomas post-COVID (Fernández de las Peñas et al. 2022).

En cuanto a la fisiopatología, varios estudios demuestran que un daño tisular a largo plazo, por ejemplo, en los pulmones o el cerebro, podrían ser responsables de la sintomatología observada (disnea, tos y fatiga, pérdida de memoria y anosmia, entre

otros, respectivamente). También se han visto alteraciones en otros órganos como corazón, hígado, páncreas y riñones, durante el seguimiento de pacientes post recuperación que podrían asociarse a las manifestaciones del COVID Persistente (Yong 2021; Mehandru y Merad 2022).

La mayoría de los autores coinciden en que la inflamación patológica persistente es un posible mecanismo fisiopatológico del síndrome (Yong 2021; Mehandru y Merad 2022; Anaya et al. 2021). La respuesta inflamatoria exagerada ante nuevas amenazas infecciosas y su menor capacidad o retardo para resolver la inflamación podrían tener que ver con la persistencia de los síntomas, sobre todo en los sitios más expuestos como el tracto respiratorio superior (Mehandru y Merad 2022).

Otro de los mecanismos propuestos está relacionado a la persistencia viral. Hay estudios que demostraron la liberación prolongada de SARS-Cov-2 vía fecal o respiratoria tras varios meses luego de la infección, lo cual podría causar una activación inmune persistente (Yong 2021; Mehandru y Merad 2022). Se ha visto que los pacientes convalecientes han mostrado alteraciones de células T CD8⁺(con persistencia de perfiles citotóxicos), niveles elevados de monocitos CD14⁺CD16⁺ y células dendríticas plasmocitoides activadas, así como de citocinas pro inflamatorias (IL-6, IL-1 β y TNF) hasta 6 meses luego de la infección (Mehandru y Merad 2022; Anaya et al. 2021; Castanares-Zapatero et al. 2022), lo cual podría asociarse tanto a alteraciones sistémicas como órgano-específicas.

Por otro lado, se ha visto una respuesta autoinmune contra antígenos tisulares propios luego de la infección, la cual produce y sostiene un daño orgánico que también podría explicar los síntomas de los pacientes COVID Persistente, así como se ha demostrado para muchos otros virus como Epstein–Barr, cytomegalovirus, herpes virus 6, virus de la hepatitis A y C, entre otros (Mehandru y Merad 2022; Castanares-Zapatero et al. 2022). En este sentido, se han hallado elevadas las células B CD27⁺IgD⁻ en estos pacientes, las cuales están asociadas a enfermedades como la esclerosis múltiple (Anaya et al. 2021). Varios mecanismos se han propuesto para la respuesta autoinmune, entre ellos el mimetismo de antígenos, la pérdida de tolerancia frente a antígenos propios durante infecciones y la diseminación de epitopos, entre otros (Mehandru y Merad 2022). Otras alteraciones como la disfunción endotelial y la activación de la coagulación también han sido propuestos (Castanares-Zapatero et al. 2022).

Finalmente se puede decir que los desórdenes subyacentes del sistema inmune parecen estar involucrados en la mayoría de los mecanismos sospechados de producir el Síndrome: la activación desregulada sostenida del sistema inmune la respuesta inflamatoria patológica crónica, la autoinmunidad, la persistencia vírica o el daño tisular.

Por tanto, y en resumen de todo lo anteriormente expuesto, nuestra hipótesis es que los pacientes que padecen COVID Persistente presentan alteraciones inmunológicas que podrían ser la base de los cambios patológicos. Para evaluar esta hipótesis, decidimos caracterizar el inmunoma de estos pacientes comparándolo frente al de otros pacientes que han enfermado de COVID-19 y que, sin embargo, se han recuperado sin presentar secuela alguna. Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos a analizar en ambas cohortes en estudio:

- Determinar la memoria humoral frente al SARS Cov-2.
- Determinar la memoria celular frente al SARS Cov-2.
- Realizar un análisis no sesgado de las principales poblaciones de leucocitos.
- Comprobar si existen diferencias cuantitativas en las diferentes poblaciones leucocitarias de ambas cohortes mediante un análisis manual jerarquizado.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño experimental

Se realizó un estudio transversal, prospectivo, de casos y controles. Los casos fueron definidos como pacientes adultos con diagnóstico confirmado de COVID Persistente. Éstos fueron reclutados a través de la asociación Long Covid ACTS (LongCovid Autonomous Communities Together Spain) de la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Se reclutaron 20 pacientes de los cuales 16 fueron de sexo femenino y 4 masculino, con una edad promedio de 44.5 años. A cada uno de ellos se le realizó una encuesta con el fin de recabar datos demográficos, sobre el Síndrome y sobre los antecedentes de la infección primaria por SARS-Cov-2 (los principales datos se resumen en la Figura 1, A). La cohorte control fue definida como pacientes adultos con diagnóstico confirmado de infección por SARS-Cov-2 que no presentaban, al momento del estudio, sintomatología compatible con COVID Persistente. Se reclutaron 22 controles, 17 de sexo femenino y 5 masculino, con un promedio de edad de 45.4 años. La presencia de patologías previas conocidas de tipo inflamatorias, neoplásicas malignas y autoinmunes, así como el tratamiento con fármacos inmunosupresores fueron criterios de exclusión dentro de ambas cohortes.

A

Paciente	Sexo	Edad	Días des de diagnóstico COVID-19	Días des de diagnóstico COVID Persistente	Severidad de la enfermedad primaria	Cantidad Signos/Síntomas referidos
PER14	F	31	521	479	1	6
PER4	F	38	490	368	1	11
PER9	F	51	517	245	1	12
PER17	F	40	495	399	1	12
PER24	M	62	363	153	4	13
PER7	F	44	438	364	1	14
PER10	F	35	507	398	1	14
PER20	F	47	728	576	3	15
PER1	F	44	683	502	1	16
PER5	M	54	570	215	3	16
PER15	F	38	589	531	3	16
PER2	M	57	532	494	1	17
PER12	F	53	283	173	1	18
PER26	F	25	527	420	1	18
PER11	M	49	719	719	2	18
PER21	F	46	521	235	3	18
PER29	F	51	505	333	3	18
PER18	F	38	701	476	1	20
PER30	F	56	500	188	2	20
PER19	F	32	264	187	1	23

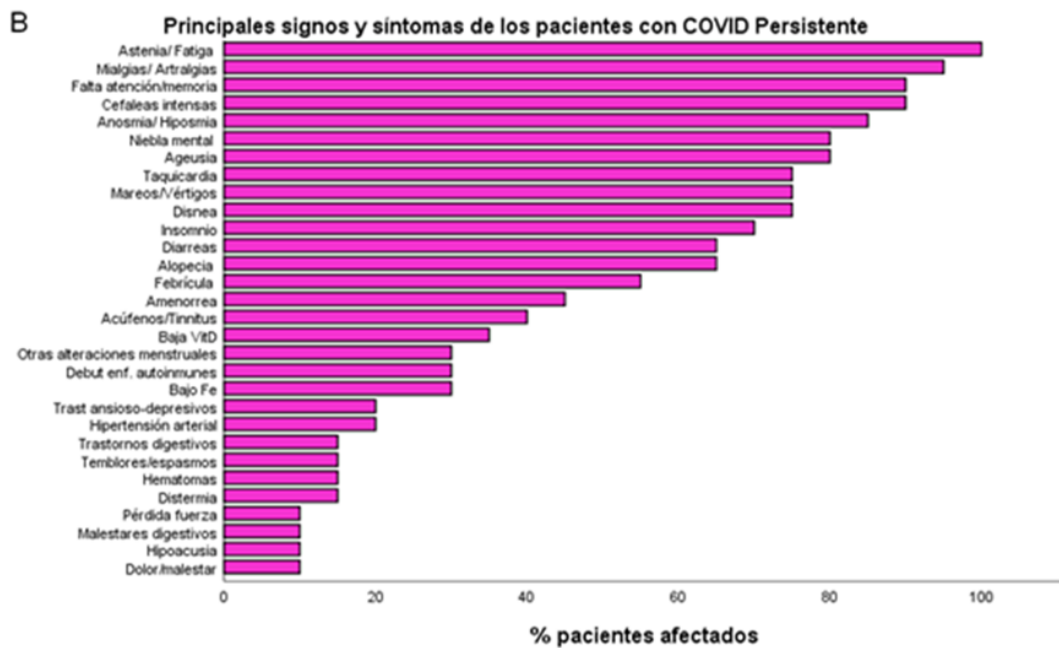


Fig. 1. A. Resumen de las características demográficas, datos relacionados a la enfermedad primaria por COVID-19 y al Síndrome COVID Persistente de la cohorte de enfermos. La severidad de la enfermedad primaria fue clasificada en las siguientes categorías: 1. Leve, no requirió hospitalización. 2. Moderada: requirió hospitalización en sala común. 3. Grave: requirió aporte externo de oxígeno. 4. Muy grave: requirió internación en UCI/asistencia ventilatoria mecánica. B. Principales signos y síntomas referidos por los pacientes, expresado como porcentaje de los pacientes afectados por cada uno.

2.2. Obtención y procesamiento de las muestras

A cada individuo se le extrajeron 16 ml de sangre en dos tubos de heparina-litio mediante punción de vena periférica, previa firma del consentimiento informado (bajo aprobación del CEIm: PI-21-2098).

Para la obtención del plasma y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), la sangre fue separada inmediatamente luego de la extracción usando Cytiva Ficoll-Paque™ PLUS. Cada tubo de sangre fue vertido lentamente en un tubo de centrifuga con 3 ml de Ficoll-Paque™. Se centrifugó a 800g durante 30min a 4°C en un rotor Fisherbrand™ GT2 con la aceleración ajustada al máximo y la deceleración al mínimo. Se fraccionaron 4 ml de plasma en tubos para congelación con 1 ml cada uno. Las CMSP fueron recogidas con pipeta de la interfaz plasma-Ficoll, depositadas en un tubo de centrifuga con 10 ml de medio RPMI y centrifugadas a 400g durante 5min a 4°C. Luego de desechar el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 2 ml de medio de criopreservación (dimetilsulfóxido al 10% en suero fetal bovino), colocado en crioviales y almacenados a -80°C hasta su utilización.

2.3. Determinación de la memoria humoral

A partir de una de las fracciones de plasma que habían sido congeladas se llevó a cabo la determinación de la memoria humoral por el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Se realizó un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgG e IgA específicos frente a la proteína S (espícula) y anticuerpos IgG específicos frente a la proteína N (nucleocápside) del SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos fueron cualitativos y se expresaron como paciente “reactivo” o “no reactivo” en base a la presencia o ausencia de anticuerpos para cada tipo, respectivamente.

2.4. Determinación de la memoria celular

La memoria celular frente al SARS Cov-2 fue evaluada ex-vivo mediante un inmunoensayo por manchas (“spots”) ligado a enzimas (ELISPOT) para interferón gamma (IFN- γ)(Ogbe et al. 2021). Brevemente, este ensayo detecta las células T respondedoras a un estímulo dado mediante la captura del IFN- γ en proximidad de las células que lo han secretado. El mismo queda fijado a la membrana en el fondo del pocillo, donde se evidencia como un “spot” de color azul oscuro (Czerkinsky et al. 1988). De esta forma, cada *spot* observado en la membrana corresponde a una célula productora de IFN- γ y se la denomina SFU (por *spot-forming units*).

Para el ensayo se utilizaron las CMSP que habían sido congeladas y almacenadas a -80° C. Se procedió a descongelarlas por inmersión en baño a 37°C y, posteriormente, fueron centrifugadas en 10 ml de RPMI durante 5 min a 400g y 4°C. Luego de aspirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 ml de medio AIM V®. Para realizar el conteo de células viables, se hizo una dilución 1:10 en Trypan Blue y se procedió a contar en cámara de Neubauer.

Para realizar la prueba se utilizó el kit comercial Human IFN- γ ELISPOT^{PRO} (Mabtech). En una placa de 96 pocillos, se utilizaron 4 por cada muestra y 2 muestras por calle. Se colocaron 100.000 células en un volumen final de 200 μ l de AIM V® por pocillo, de acuerdo al esquema que se muestra en la Figura 2. Las células en el pocillo número uno fueron estimuladas con 0.2 μ l de anti-CD3 (100 ng/ml) y 2 μ l de anti-CD28 (100 μ g/ml) (ambos Mabtech) como control positivo; las de los pocillos número tres y cuatro con 2 μ l de péptidos del dominio S1 de la espícula (SARS-CoV-2 scaanning pool, Mabtech), a una dilución 1:100. El pocillo número dos no recibió ningún estímulo, utilizándose tanto como control negativo, así como para la determinación del nivel basal de células productoras de IFN- γ . Luego de incubar la placa durante 48 hs a 37°C, 5% de Co2 y 95% de humedad, se retiró el medio de cultivo, se lavó 5 veces con PBS y se procedió a la detección del IFN- γ secretado añadiendo anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ conjugados con peroxidasa (Mabtech) a una concentración de 1 μ g/ml. Se reveló de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se dejó secar el tiempo suficiente hasta que se vieran nítidos los *spots* sobre la membrana.

Los pocillos fueron observados y fotografiados con lupa magnificadora a un aumento de 4X (Nikon SMZ1000). Posteriormente, mediante la aplicación ImageJ, se procedió a contar los *spots* presentes en cada pocillo. La prueba se consideró válida si el control negativo presentaba menos de 10 de éstos y el positivo más de 20 (o en su defecto, si alguno de los pocillos número tres o cuatro presentaba *spots*, indicando que la prueba funcionó correctamente). El procedimiento de conteo fue realizado siempre por el mismo operador. Los *spots* en los pocillos expuestos a la proteína S1 fueron promediados y los resultados fueron expresados en SFU, lo cual corresponde a la cantidad de linfocitos T reactivos.

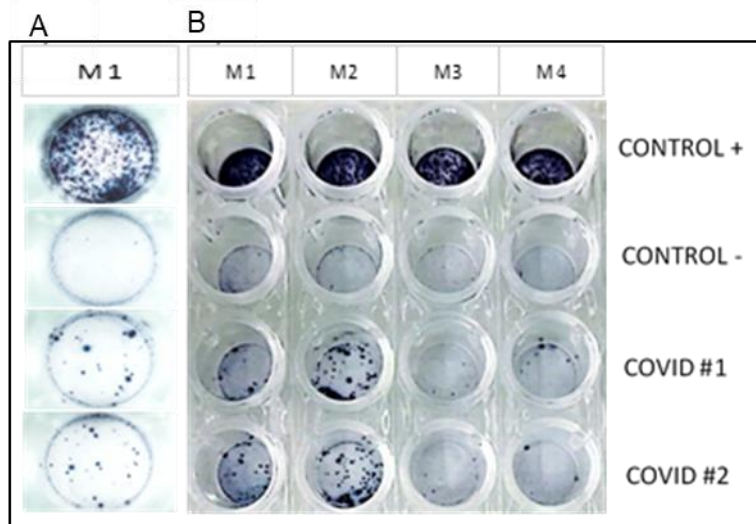


Fig. 2. ELISPOT. A) Resultado de la muestra número 1 (M1) visto bajo lupa magnificadora. B) Disposición de las muestras (M1 a M4) en una placa de ELISPOT.

2.5. Inmunofenotipaje e identificación de las distintas poblaciones celulares

2.5.1. Citometría espectral

Las CMSP fueron descongeladas y contadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3. Un total de 2 millones de células fueron teñidas con anticuerpos marcados con fluorocromos y caracterizadas por citometría espectral en un equipo CyTek Aurora de 5 láseres, siguiendo el protocolo y panel de análisis OMIP-069 (Park, Lannigan, y Jaimes 2020).

Brevemente, éste es un panel de citometría de flujo de 40 colores desarrollado para el inmunotipaje de las principales poblaciones de células inmunes presentes en sangre periférica. Luego de descongelarlas, las CMSP fueron teñidas con Live/Dead fixable near-IR dead cell stain kit” (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) para excluir del análisis las células muertas. Seguidamente, se añadió Brilliant Stain Buffer y True-Stain Monocyte Blocker para obtener una fluorescencia óptima de las células deseadas y luego se procedió a la tinción con anticuerpos monoclonales marcados con los fluorocromos detallados en la tabla 1. Después de cada paso de tinción, las células fueron lavadas con tampón FACS (500mL de PBS, 10 ml de FCS filtrado, 0.1 g de NaN₃ y 2,5mL de EDTA estéril) e incubadas a temperatura ambiente en oscuridad durante el tiempo indicado en el protocolo. Por último, fueron fijadas con paraformaldehído al 1% en PBS y lavadas con tampón FACS. Se conservaron a 4°C en oscuridad hasta la citometría.

ESPECIFICIDAD	FLUOROCROMO	CLON	PROPÓSITO
Viability	Live Dead UV Blue	—	Viabilidad
CD45	PerCP	HI30	Leucocitos
CD3	BV510	SK7	Células T, células NKT-Like
CD4	cFluor YG584	SK3	T CD4 y células NKT-Like
CD8	BUV805	SK1	CD8 T, NK, y células NKT-Like
CD25	PE-Alexa Fluor700	CD25-3G10	T _{regs}
TCRγδ	PerCP-eFluor 710	B1.1	Pan Tγδ
CD14	Spark Blue 550	63D3	Diferenciación de monocitos
CD16	BUV496	3G8	Diferenciación de Monocitos, NK y células dendríticas
CD11c	eFluor 450	3.9	Diferenciación de células dendríticas
CD19	Spark NIR 685	HIB19	Células B
CD20	Pacific Orange	HI47	Células B
CD24	PE-Alexa Fluor 610	SN3	Diferenciación de células B
CD39	BUV661	TU66	Diferenciación de células B, T _{regs} , y monocitos
IgD	BV480	IA6-2	Diferenciación de células B
IgG	BV605	G18-145	Diferenciación de células B
IgM	BV570	MHM-88	Diferenciación de células B
CD141	BB515	1A4	Diferenciación de células dendríticas
CD1c	Alexa Fluor 647	L161	Células dendríticas, NKT-Like
CD123	Super Bright 436	6H6	Células dendríticas plasmacitoides
CD2	PerCP-Cy5.5	TS1/8	Diferenciación de NK
CD56	BUV737	NCAM16.2	Pan NK, activación de células Tγδ
CCR7	BV421	G043H7	Diferenciación de células T
CD27	APC-H7	M-T271	Diferenciación de células B y T
CD28	BV650	CD28.2	Diferenciación de células T y NK
CD45RA	BUV395	5H9	Diferenciación de células dendríticas y células T
CD95	PE-Cy5	DX2	Diferenciación de células B y T
CD127	APC-R700	HIL-7R-M21	Receptor de citocinas; diferenciación de células T
CXCR5	BV750	RF8B2	Receptor de quimocinas; diferenciación de células T
CXCR3	PE-Cy7	G025H7	Receptor de quimocinas; células dendríticas y diferenciación de células B y T
HLA-DR	PE-Fire810	L243	Activación células T y monocitos; marcador de linaje de NK y células dendríticas
CD38	APC-Fire810	HIT2	Activación/diferenciación de monocitos, células dendríticas y células T y B
CD159c	PE	REA205	Diferenciación de NK
CD159a	APC	REA110	Activación/diferenciación de NK, NKT like y células Tγδ
PD-1	BV785	EH12.2H7	Receptor inhibitorio de células T
CD314	BUV615	1D11	Diferenciación de NK
CCR6	BV711	G034E3	Diferenciación de células T y B; receptor de quimocinas

Tabla 1. Tabla con los anticuerpos utilizados en el panel OMIP.-069, su especificidad, fluorocromo, clon y el propósito de su inclusión dentro del mismo. Modificado de: OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood, DOI: 10.1002/cyto.a.24213

2.5.2. Análisis exploratorio y caracterización del perfil leucocitario

El análisis de los datos arrojados por el citómetro, tanto supervisado como no supervisado, se realizó en la plataforma OMIQ Data Science (© Omiq, Inc. 2022). El primer paso consistió en transformar los datos de fluorescencia utilizando la escala, los parámetros y cofactores sugeridos por el software. Luego, se procedió a crear las

“gates” o puertas que permitieron eliminar los restos celulares, los dobletes y seleccionar los leucocitos (células CD45⁺) viables que se usaron para el análisis posterior.

2.5.2.1. Análisis no sesgado de las poblaciones celulares

2.5.2.1.1. Análisis exploratorio por técnicas de reducción de la dimensionalidad Debido a la cantidad de datos obtenida de este tipo de paneles con gran número de colores, la exploración de los datos mediante identificación manual tradicional de sub poblaciones en plots de dos dimensiones es poco aconsejable debido a su subjetividad y el tiempo que consume (Park, Lannigan, y Jaimes 2020; Melsen et al. 2020). Se decidió entonces utilizar un enfoque no supervisado para el análisis exploratorio, mediante el algoritmo UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection)(Becht et al. 2019).

Brevemente, este algoritmo utiliza un método no lineal, basado en gráficos que se construyen para representar la información en múltiples dimensiones y luego reconstruye los resultados en un mapa de dos dimensiones, reteniendo la estructura multidimensional. De esta manera, el algoritmo encuentra similitudes entre células en todas las dimensiones. Estas dimensiones son, en este caso, los marcadores que éstas expresan y sus niveles de expresión. El algoritmo devuelve un mapa bidimensional (un gráfico cartesiano clásico X versus Y). La proximidad de las células en este mapa refleja sus distancias en el espacio multidimensional, de forma que aquellas células que tienen patrones de expresión similares están localizadas muy cerca. Esta relación distancia/similitud se respeta dentro de cada agrupación o islote y entre ellos.

Este tipo de gráficos facilita la exploración de los datos muestrales debido a que simplifica en sólo dos dimensiones todo el conjunto de característica que el investigador está interesado en evaluar, de forma de que no sea necesario hacer un gráfico de un marcador en función de otro para cada uno de ellos.

Para construirlo, se utilizaron 27 marcadores fenotípicos: CD14, CD45RA, CD16, CD39, CD56, CCR7, CD8, CD123, D11c, IgD, CD3, CD20, IgM, IgG, CD28, CD141, CD2, TCRgd, CD4, CD2, CD25, HLA DR, CD1c, CD19, CD127, CD27 y CD38. Y los siguientes parámetros: *neighbours*: 60, distancia mínima: 0.7, métrica: euclidiana, número de componentes: 2, *seed*: 6198, *learning_rate*: 1, *epochs*: 250, *embedding initialization*: espectral.

2.5.2.1.2. Clustering no supervisado

Luego se utilizó el algoritmo FlowSOM para encontrar las poblaciones celulares similares y separarlas en agrupaciones o “metaclústeres” de forma no supervisada. Resumidamente, este algoritmo analiza la expresión de todos los marcadores seleccionados por el usuario en cada una de las células de cada muestra y, a continuación, las agrupa en clústeres según el nivel de expresión de los mismos. De esta manera, no sólo permite visualizar las células en las agrupaciones biológicas típicas, sino que, además, permite la detección de poblaciones nuevas o no esperadas. Por último, los resultados de estos dos algoritmos se combinan de manera que los clústeres formados se mapean sobre el UMAP para poder observar la distribución de los mismos.

Los parámetros utilizados para el algoritmo fueron: 27 marcadores fenotípicos (los mismos que para el algoritmo UMAP), *umap_1* y *umap_2* (las dos dimensiones que dio como salida el algoritmo anterior), número de clústeres: 225 (15 en la dimensión X, 15 en la dimensión Y), número de iteraciones de entrenamiento: 10, distancia métrica: euclidiana, método: *Consensus Metaclustering*, número de metaclústeres: 20.

2.5.2.1.3. Mapa de calor clusterizado (Clustered Heatmap)

Con los metaclústeres obtenidos en el punto anterior, se creó un mapa de calor clusterizado o *Clustered Heatmap*. Este algoritmo permite representar de manera

gráfica, mediante una escala de colores (de más claro a más oscuro), el nivel de expresión que tiene cada metaclúster, muestra o grupo determinado por el investigador, de cada uno de los marcadores fenotípicos seleccionados por el usuario y, a su vez, asociar por similitud (distancia) los conglomerados formando un dendrograma.

Para construir el mapa de calor se establecieron los siguientes parámetros: 27 marcadores fenotípicos (los mismos que se usaron para los dos algoritmos explicados anteriormente) y distancia euclidiana. Se analizaron los metaclústeres formados por FlowSOM segmentándolos por condición (casos y controles) para ver posibles diferencias de expresión entre grupos.

2.5.2.2. *Análisis supervisado. Estrategia de identificación jerárquica manual de las diferentes poblaciones celulares (Gating Strategy)*

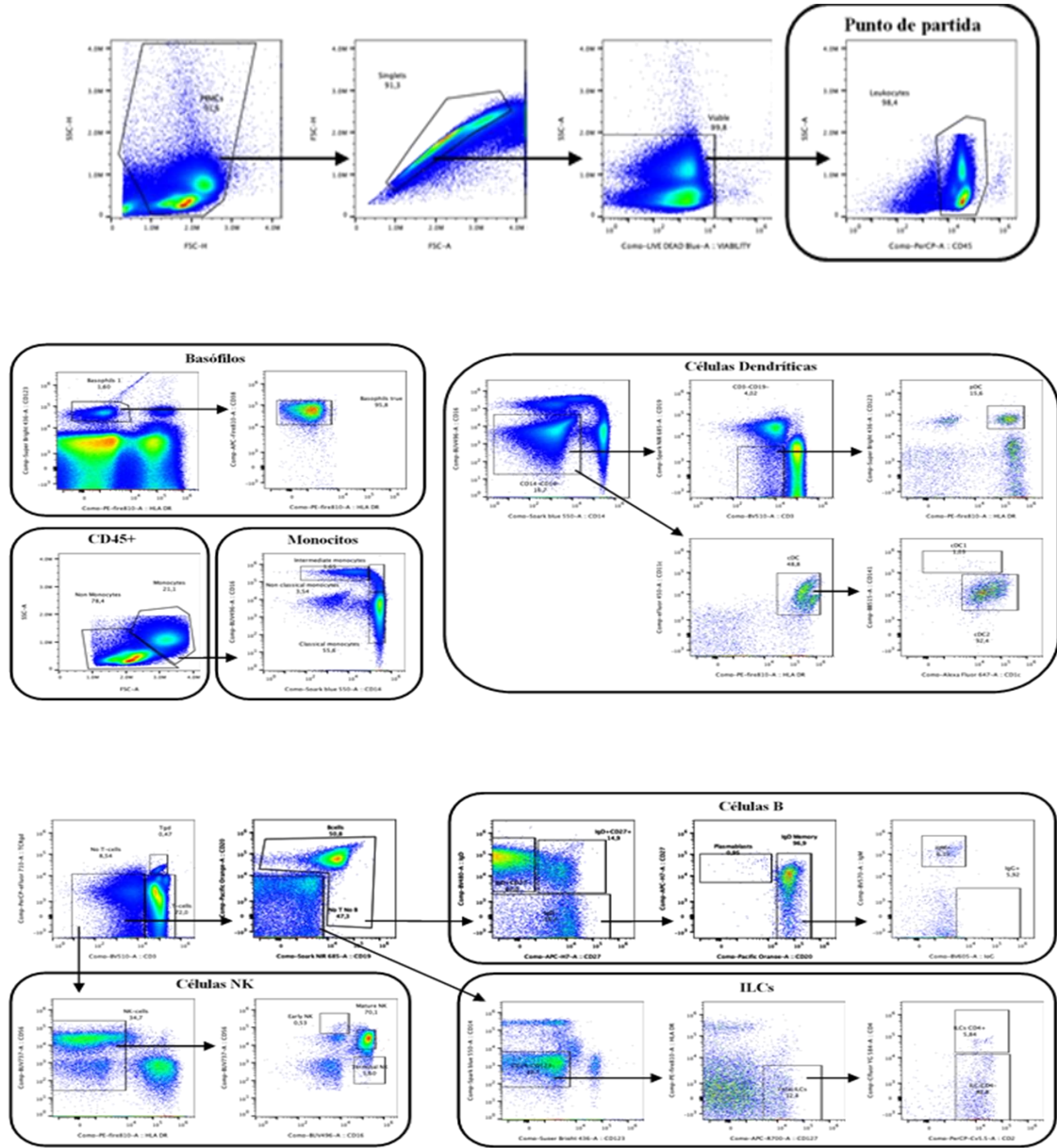
Con el objetivo de estudiar el fenotipo de las CMSP, se siguió el flujo de trabajo descrito por Park (Park, Lannigan, y Jaimes 2020) con ligeras modificaciones. Siguiendo los pasos sucesivos de la “Gating Strategy” (Fig. 3), se identificaron las siguientes poblaciones: células T CD4 y CD8, células T reguladoras (Tregs), células T $\gamma\delta$, células tipo NKT, células B, células NK, monocitos, basófilos, células linfoides innatas (ILCs) y células dendríticas. A su vez, y para cada una de las principales poblaciones a estudio, se identificaron diversas sub-poblaciones tal y como se detalla en dicha figura. Esto nos ha permitido identificar un total de 52 sub-poblaciones circulantes. La abundancia de las poblaciones y sub-poblaciones identificadas se expresó como porcentaje de células referido al total de leucocitos viables circulantes. Posteriormente, se hizo la comparación estadística entre casos y controles, a fin de determinar si existen diferencias.

2.6. Análisis estadístico

Los resultados del ELISPOT, la serología y las frecuencias relativas de las diferentes poblaciones identificadas mediante el análisis supervisado, se analizaron con el software IBM SPSS Statistics 26 y GraphPad Prism 9.3.1. Las variables categóricas fueron analizadas utilizando frecuencias y las variables cuantitativas continuas fueron expresadas mediante la media y desvío estándar. Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba T para muestras independientes, mientras que para las variables categóricas se utilizó el Test Exacto de Fisher, con un nivel de significación de 0,05 en ambos casos.

El análisis estadístico de los clústeres obtenidos mediante algoritmos no supervisados se llevó a cabo en la misma plataforma OMIQ. Se utilizó el algoritmo edgeR para comparar la abundancia de células dentro de cada metaclúster entre ambas cohortes. Se utilizó un p-valor corregido (FDR, *False Discovery Rate*) con un nivel de significación también de 0.05.

A



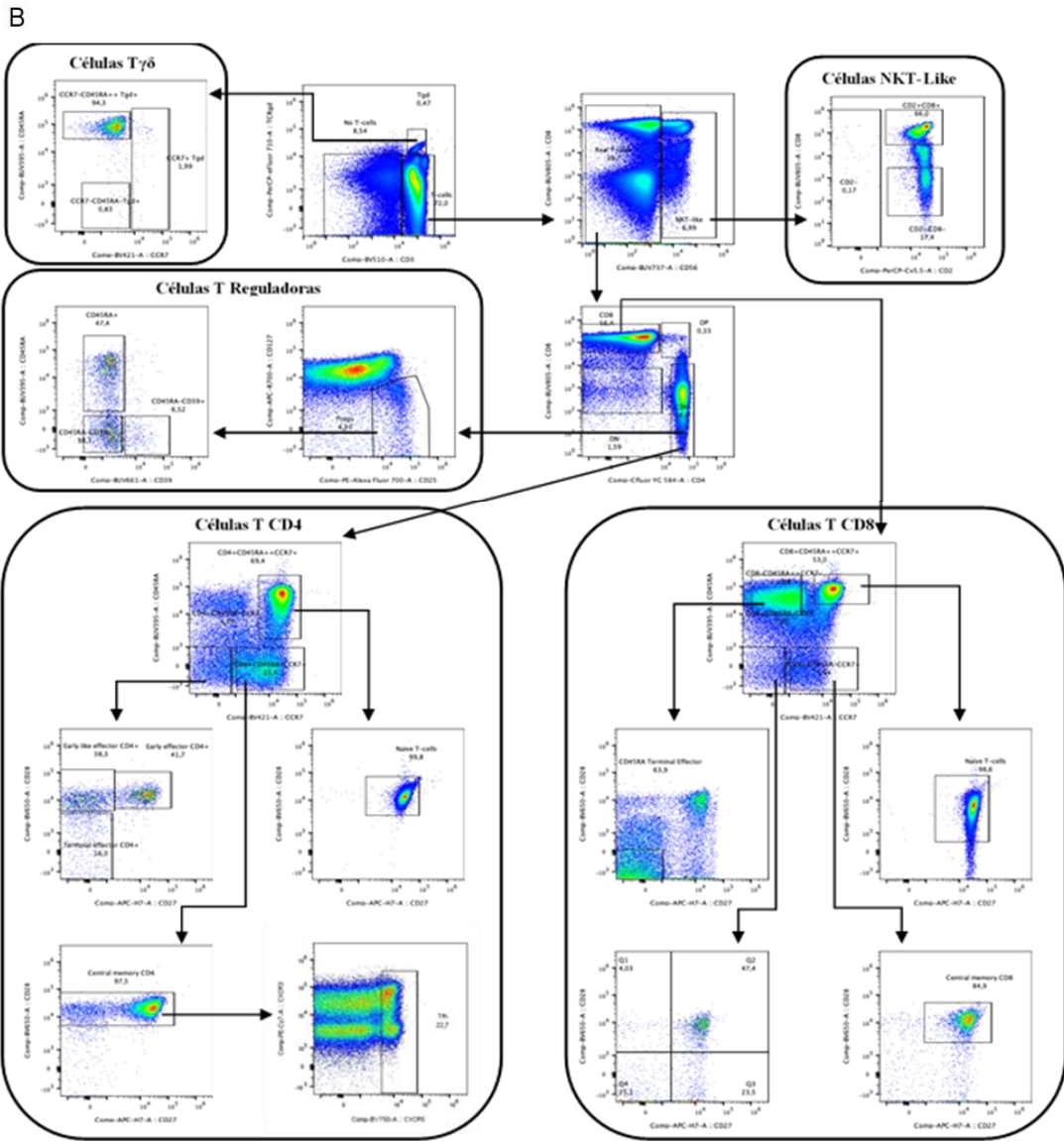


Fig. 3. En A se puede observar en detalle la estrategia jerárquica para identificar las poblaciones finales de basófilos, células dendríticas, células B, células NK y células linfoides innatas (ILCs). En B se puede ver la estrategia de identificación de las sub poblaciones de células T $\gamma\delta$, NKT, Tregs, T CD4 $^+$ y T CD8 $^+$. Modificado de: OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood, DOI: 10.1002/cyto.a.24213

3. Resultados

3.1. Caracterización de la cohorte COVID Persistente

El 80% de los individuos de esta cohorte fueron del sexo femenino con una edad promedio de 41.5 años, mientras que la de los hombres fue de 50.8 años. El tiempo que pasó desde la primo-infección por SARS-CoV-2 fue de 522.7 días (+/- 126.7 días) y la gravedad de ésta fue muy heterogénea: el 60% de los pacientes tuvo una enfermedad leve, el 10% moderada, el 25% se enfermó de forma grave y el 5% tuvo COVID-19 muy grave. Desde el diagnóstico clínico del síndrome pasaron 372.8 días (+/-156 días), en promedio. Se refirieron un total de 57 signos y síntomas diferentes y, en cuanto a la cantidad, el promedio fue de 15.8, con un máximo de 23 y un mínimo de 6 síntomas por persona. Entre los más frecuentes encontramos la astenia o fatiga que afectó al 100% de los pacientes, la artralgia o mialgia al 95%, el 90% presentó falta de atención o de memoria y cefaleas intensas. Otros síntomas bastante frecuentes fueron la niebla mental, la anosmia y ageusia, la disnea, los mareos o vértigo y el insomnio, que afectaron entre un 70 y un 85% de los pacientes.

3.2. Memoria humoral

Se analizaron tres tipos diferentes de anticuerpos contra el virus de la COVID-19. De los 42 individuos estudiados, 41 presentaron anticuerpos neutralizantes de tipo IgG dirigidos contra la proteína S (95% de los pacientes y 100% de los controles, p-valor= 0.48). Respecto de los anticuerpos IgG contra la proteína N de la nucleocápside, en 36 de los 42 individuos se evidenció su presencia (75% de los pacientes y 95.45% de los controles, p-valor= 0.087). Finalmente, y si bien no hubo diferencias entre ambas cohortes en los títulos de anticuerpos IgG anti-S e IgG anti-N, las IgA séricas contra la proteína S sí presentaron una diferencia muy significativa. Las mismas se hallaron en 33 de los 42 individuos, representando sólo un 60% de los pacientes, mientras que el 95.46% de los controles fueron reactivos (p-valor= 0.0077) (Fig. 4).

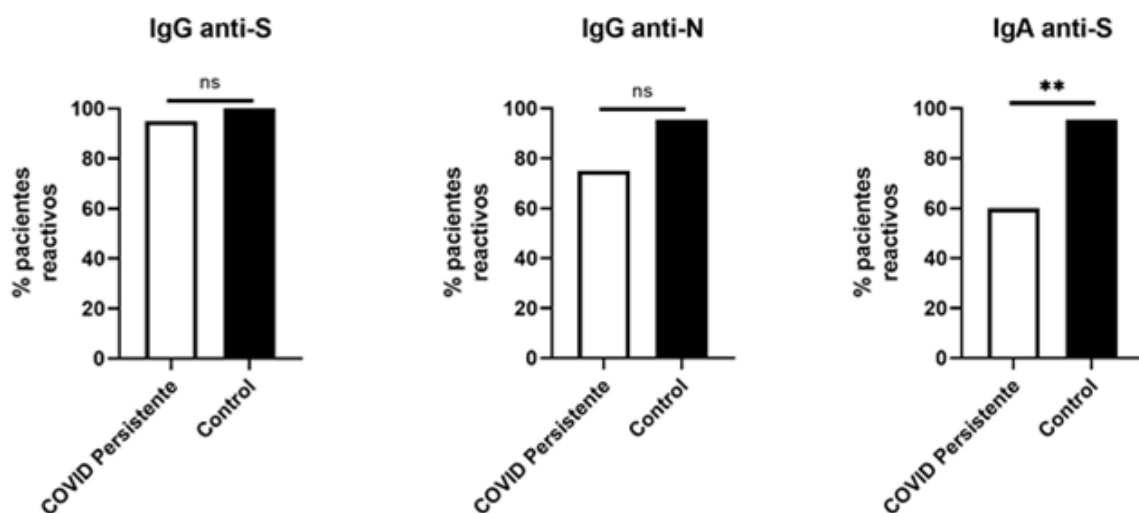


Fig. 4. Respuesta humoral frente al virus SARS-CoV-2 por la técnica de electroquimioluminiscencia: comparación de los pacientes reactivos para cada anticuerpo evaluado entre ambas cohortes. ** p-valor<0.01, ns: no significativo.

3.3. Memoria celular

Dado que los pacientes con COVID Persistente presentaban menores niveles de anticuerpos IgA anti-S frente al virus que los pacientes control, decidimos estudiar a

continuación los niveles de memoria celular en ambas cohortes (Figura 5). Todos los individuos presentaron respuesta ante la estimulación con péptidos del SARS-Cov-2, habiendo secreción de IFN- γ por parte de los linfocitos T estimulados, en ambas cohortes. La media de SFU basal fue de 3.68 (DE 2.42) para los enfermos y 2.65 (DE 2.62) para los controles, no encontrándose diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, tras la estimulación con péptidos de la espícula del virus se obtuvo una media de 15.7 spots (DE 20.93) para los pacientes con COVID Persistente y 25.2 (DE 25.93) para los controles. La respuesta a la estimulación en los controles fue altamente significativa (p-valor <0.0001) frente a su control pareado sin estimular, mientras que la significación fue mucho menor en los pacientes con COVID Persistente (p-valor= 0.0155). De hecho, al comparar la cantidad de linfocitos T reactivos entre ambas cohortes se observó una tendencia (p-valor= 0.07) a una mayor respuesta celular en los controles.

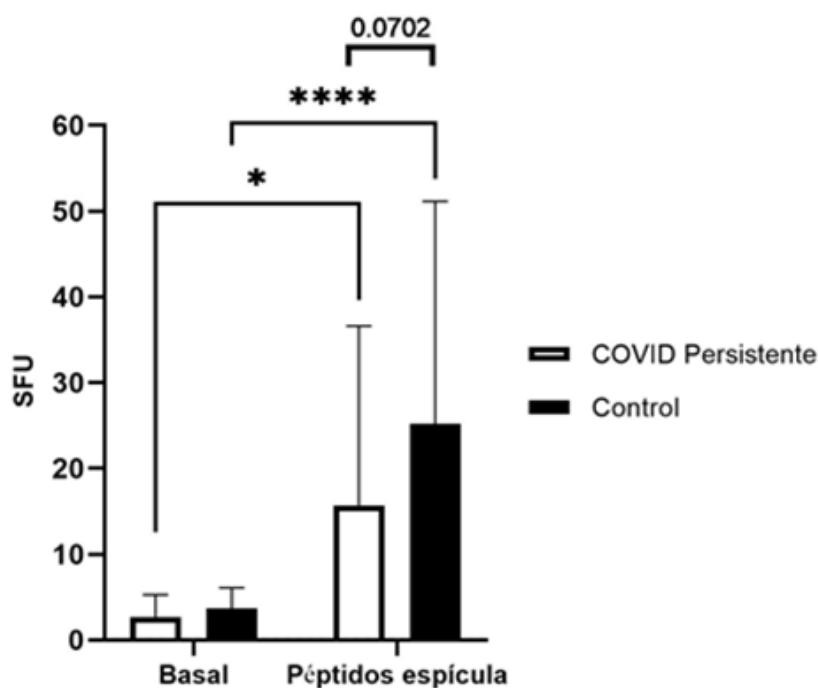


Fig. 5. Memoria celular frente al SARS-Cov-2 por la técnica de ELISPOT. Se comparan los niveles basales entre grupos, la respuesta a la estimulación dentro de cada uno y la cantidad de SFU luego de la estimulación entre ambas cohortes. *p-valor < 0.05, **** p-valor < 0.0001.

3.4. Análisis no sesgado de las poblaciones de leucocitos

3.4.1. UMAP

Una vez caracterizado que los pacientes con COVID Persistente parecen tener una memoria humoral y celular reducida frente al virus referido a la cohorte sin dicho síndrome, decidimos a continuación caracterizar el perfil leucocitario de ambas cohortes.

Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis UMAP. Previamente a utilizar el algoritmo según se explica en la sección 2.5.2.1.1., se seleccionaron al azar 2 millones de leucocitos viables de cada cohorte (100.000 de cada paciente del grupo enfermos y 90.909 por cada uno del grupo de controles), para que ambas estén igualmente representadas.

Para visualizar posibles diferencias en la distribución de las agrupaciones celulares resultantes, se hizo un plot bidimensional del UMAP para el grupo de enfermos y otro

para el grupo de controles y luego ambos se superpusieron (Figura 6, A y B). Se observa que prácticamente la distribución es la misma, a excepción de pequeñas porciones en algunos de los islotes se señala con flechas azules algunas de las diferencias cuando están presentes en los enfermos y con flechas naranjas cuando están en los controles). A continuación, se estudió la densidad de células en cada agrupación, para analizar si existían diferencias en la cantidad de células dentro de cada islote. Para esto, se construyó un plot de densidad de los UMAP de cada cohorte (Fig. 6 C y D), donde la densidad de células está representada en una escala de colores que va del azul al rojo (menor a mayor densidad). Se pueden observar diferencias en la densidad de células dentro de cada agrupación entre ambos grupos. Además, este gráfico permite ver cuáles son las agrupaciones o clústeres con mayor cantidad de células.

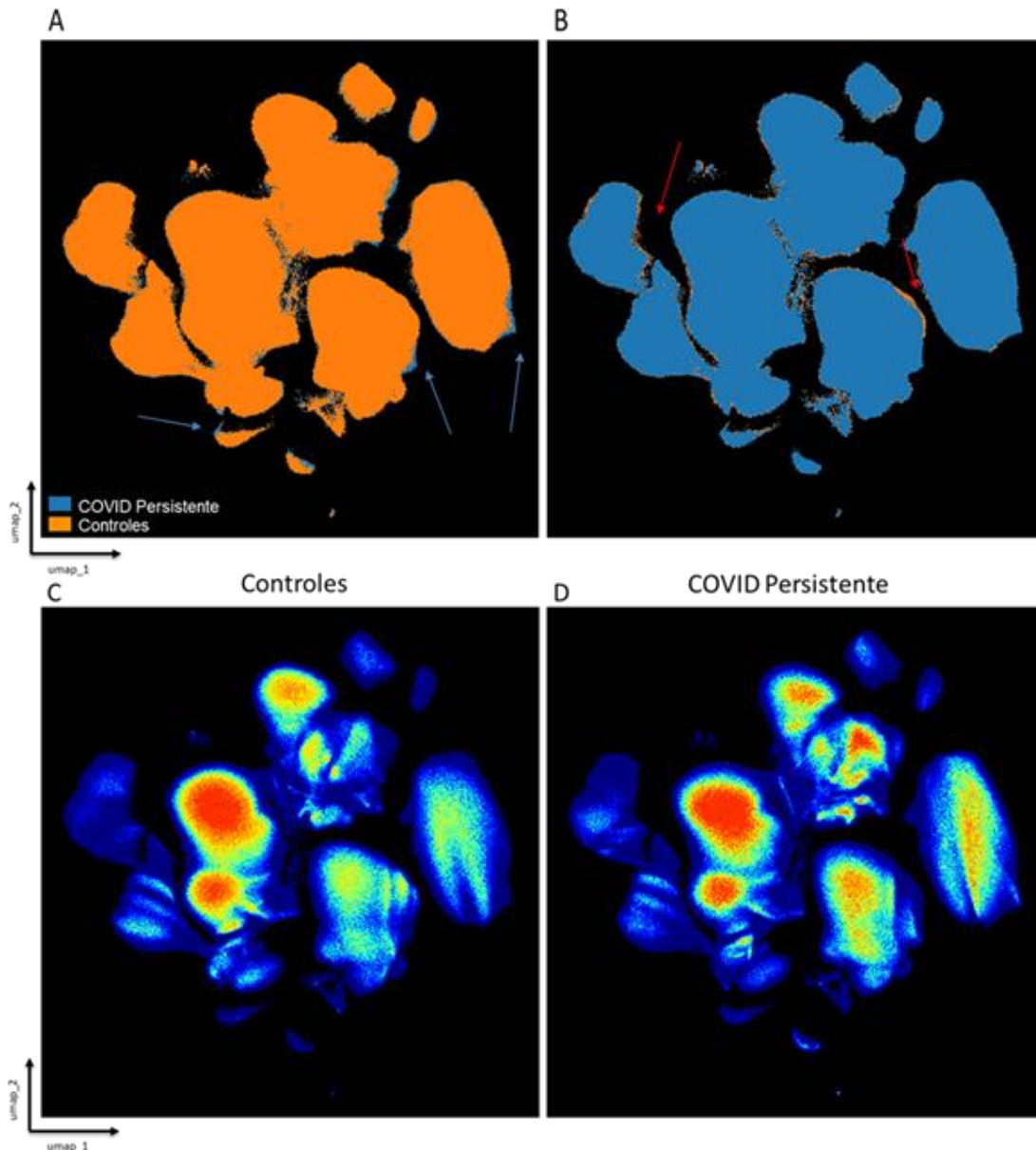


Fig. 6. Representación del UMAP en un gráfico bidimensional. A y B: superposición del UMAP de controles sobre el de enfermos COVID Persistente (A) y viceversa (B) donde se puede apreciar la similar distribución de las agrupaciones resultado del algoritmo en ambos grupos, a excepción de pequeñas porciones (algunas de las cuales se señalan con flechas naranjas y azules). C y D: plots de densidad sobre los UMAP de controles y enfermos, respectivamente, donde se pueden observar leves diferencias en la densidad celular dentro de cada isla. La escala de colores representa de azul a rojo la densidad en forma creciente.

3.4.2. FlowSOM

Tras haber realizado el análisis exploratorio no supervisado de los datos y observar que las poblaciones celulares se agrupaban en diversas islas o continentes, se implementó un método para crear clústeres de células en base a su similitud en cuanto a expresión de ciertos marcadores fenotípicos. Esto se llevó a cabo mediante el algoritmo FlowSOM, como se explica en la sección 2.5.2.1.2. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 7. Por un lado, se obtuvo un gráfico en forma de árbol con los clústeres y metaclústeres que se han formado (Figura 7, A.1) y la relación entre ellos. Cabe aclarar que, en este software, la cantidad es determinada por el usuario, por lo que se probaron diferentes opciones hasta dar con la que mejor se adaptó a nuestros datos (análisis previos no mostrados).

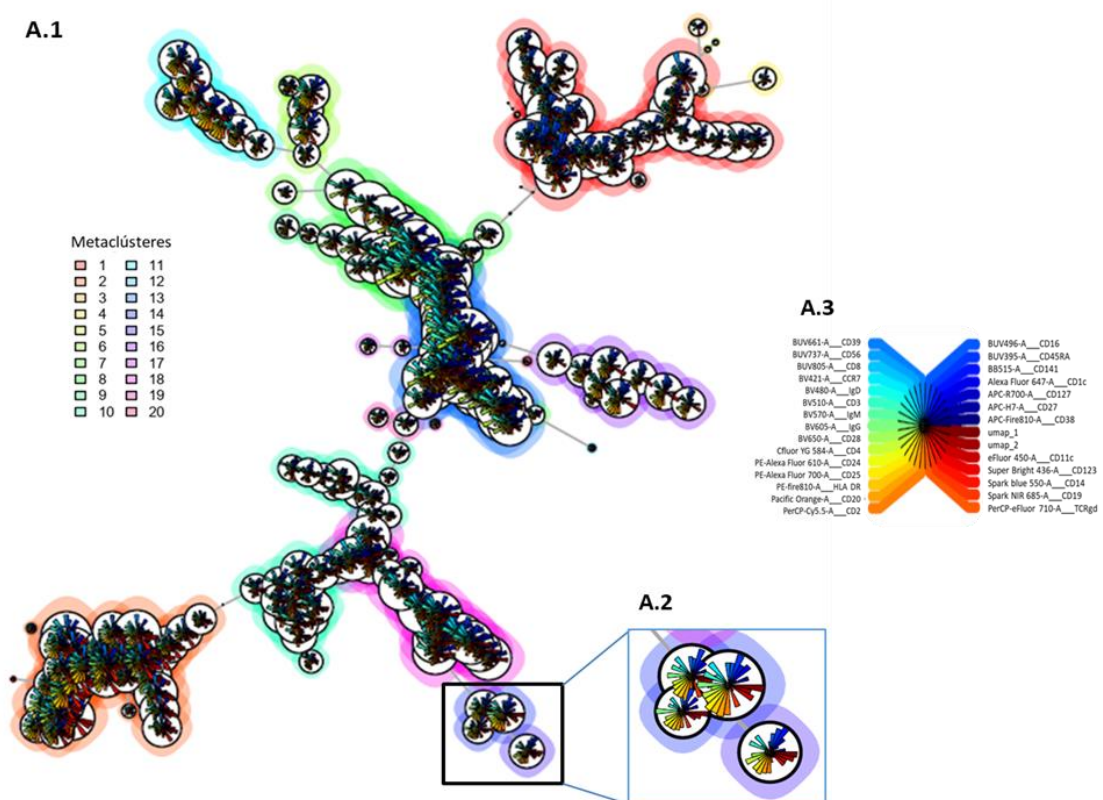


Fig. 7. Resultado del algoritmo FlowSOM. A.1: gráfico en forma de árbol donde los metaclústeres están representados en diferentes colores y el tamaño de los clústeres o nodos es proporcional a la representación que tiene el mismo dentro del total de leucocitos viables. En A.2 se muestra con mayor detalle la expresión de los marcadores dentro de los diferentes clústeres con una clave de colores representada en la A.3. El largo de cada barra coloreada se relaciona con el nivel de expresión del marcador.

Por otro lado, a partir de los metaclústeres obtenidos se crearon “gates”, es decir, que se utilizaron como filtros para agrupar células. Luego, estas “gates” o filtros fueron lanzados sobre el UMAP obtenido previamente (Figura 8). Se puede observar una distribución similar de los clústeres entre el UMAP de casos y el de controles, es decir que no se observa, por ejemplo, ningún clúster que sólo se encuentre en alguno de estos grupos.

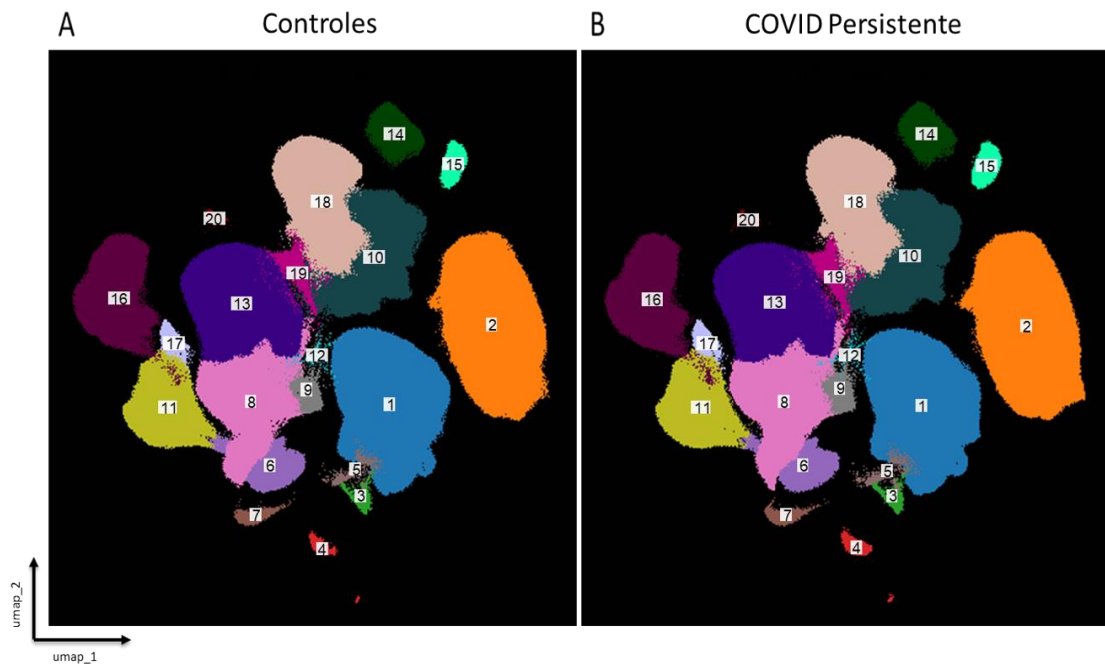


Fig. 8. Resultados del algoritmo FlowSOM. Los metaclústeres creados mediante FlowSOM mapeados sobre los UMAP de controles y enfermos (A y B, respectivamente).

3.4.3. Mapa de calor *clusterizado* (Clustered Heatmap)

A continuación, se obtuvo un mapa de calor de la expresión de los distintos marcadores fenotípicos seleccionados dentro de cada metaclúster para ambas cohortes. En el mapa (Figura 9) se observan las filas formando clústeres por distancia (escala en negro, en el margen superior izquierdo) y la escala de colores va de amarillo a negro con la expresión creciente de los marcadores. Como se puede apreciar, si bien hay pequeñas diferencias en los niveles de intensidad de color de algunos marcadores entre los metaclústeres de ambas cohortes, la distancia entre ellos es muy poca. Sin embargo, se observan mayores diferencias entre grupos en los metaclústeres 12 y 16 (flechas sobre el margen derecho de la imagen).

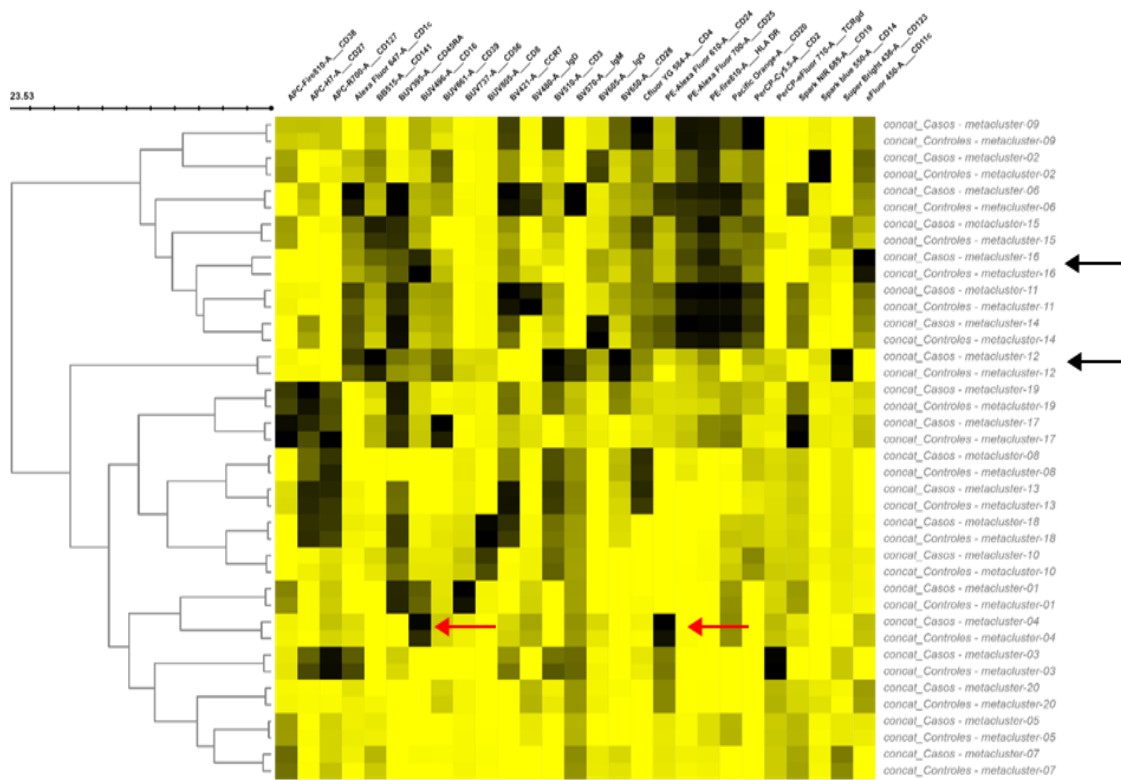


Fig. 9. Mapa de calor clusterizado segmentado por grupo (COVID Persistente, expresado como "Casos" y Controles). La escala de colores representa de forma creciente el nivel de expresión de cada marcador, de más claro a más oscuro. Con flechas negras se representan los metaclústeres que presentar mayor distancia (diferencias de expresión) entre grupos. Las flechas rojas señalan los altos niveles de expresión de los CD16 y CD24 del metaclúster 4.

Por otro lado, y para analizar la abundancia de células dentro de cada metaclúster entre cohortes, se analizó estadísticamente mediante el algoritmo edgeR. El resultado se observa en la Figura 10. Este gráfico, denominado Volcano Plot, muestra de forma sencilla el análisis comparativo de los metaclústeres formados entre ambos grupos (casos y controles, en este caso) en base a un nivel de significación determinado por el usuario. Se observa que existen diferencias significativas en la cantidad de células dentro del metaclúster 4. Se realizó además un boxplot para determinar en qué sentido se da dicha diferencia, confirmando que se encuentra expandido en la cohorte con COVID Persistente. Dicho metaclúster se caracteriza por expresar altos niveles de CD16 y CD24 (Figura 10, C y D) y, además, éstos son más altos en la población COVID Persistente (Figura 9, flechas rojas).

3.5. Identificación de poblaciones mediante análisis jerárquico manual

Debido a que el análisis no supervisado no arrojó grandes diferencias entre grupos, se decidió analizar los datos de forma manual. Con este análisis buscamos, a su vez, encontrar la naturaleza del metaclúster 4 que se vio expandido en los pacientes con COVID Persistente.

Tras establecer las "gates" como se explicó en el punto 2.5.2.2., se obtuvo la cantidad de células que pertenecían a cada población y sub población de células inmunes en cada muestra. Se identificaron un total de 52 poblaciones o sub poblaciones y la abundancia se expresó como porcentaje de leucocitos (células CD45⁺) viables, ya que la cantidad absoluta de estos varía entre pacientes. Tras el análisis estadístico, las poblaciones que se hallaron significativamente alteradas entre cohortes se muestran en la Figura 11.

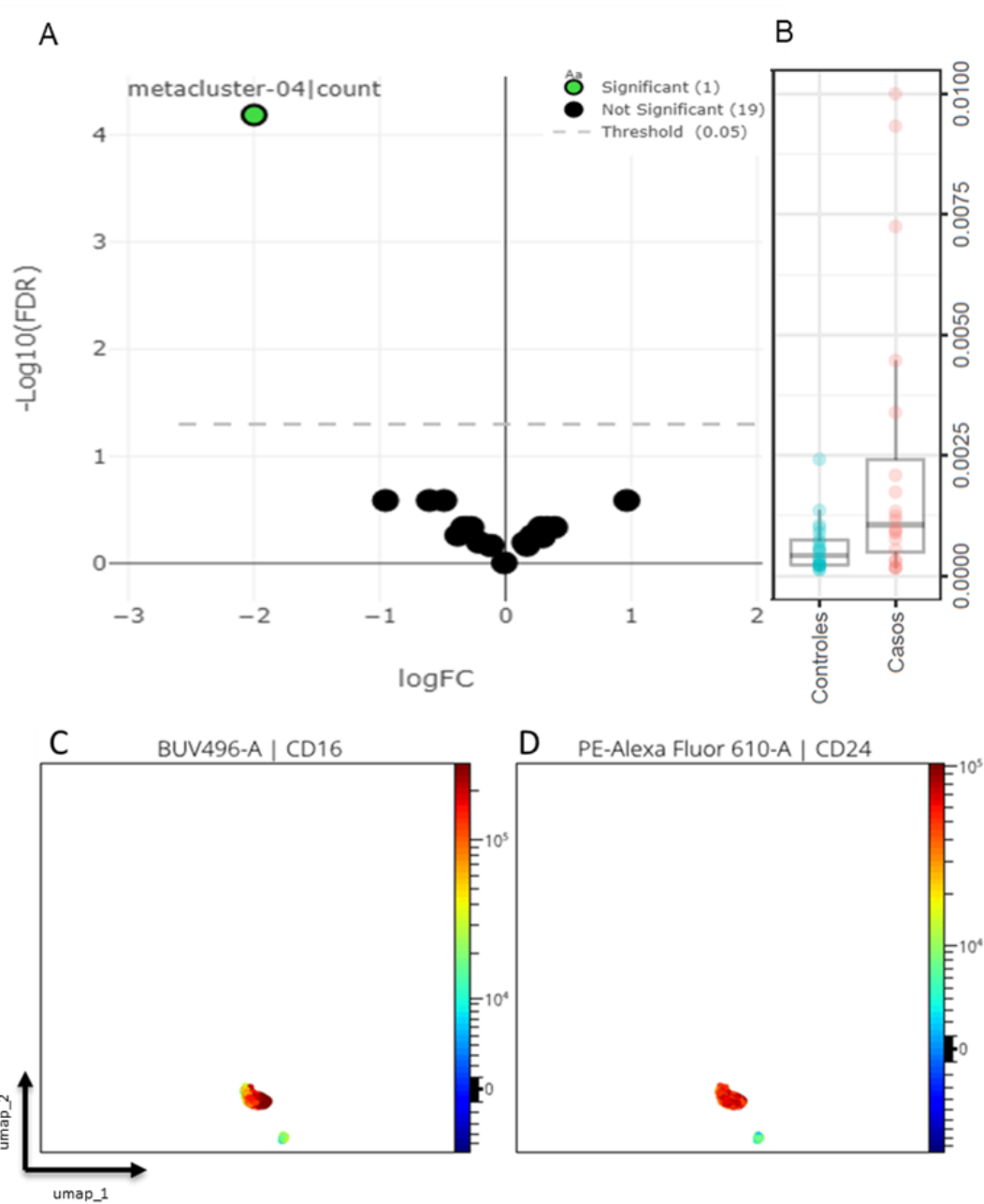


Fig. 10. A: Volcano plot mostrando diferencias significativas entre grupos en el metacúster 4. B: Boxplot del metacúster 4 evidenciando que la abundancia de células dentro de éste es mayor en los pacientes con COVID Persistente con respecto a los controles (expresado en porcentaje con respecto al total de leucocitos viables). C y D: se muestra la alta expresión de CD16 y CD24 en la gran mayoría de células que componen dicho metacúster (todas las muestras).

Las células T CD4⁺ conforman, en promedio, un 36.39% (DE 9.24%) de todos los leucocitos viables en los controles y un 29.68% (DE 10.22) en los enfermos (p-valor=0.03). Dentro de éstas, está alterada la fracción CD4⁺ “early like effector” que representa un 0.53% (DE 0.29%) en los controles y un 0.34% (DE 0.27%) en los pacientes con COVID Persistente (p-valor=0.04). También se vieron disminuidas en los enfermos las células Tγδ totales (p-valor=0.034) así como la fracción CCR7⁺CD45RA⁻ de éstas (p-valor=0.03), con respecto a los controles. Las primeras representaron el 0.64% (DE 0.42%) y las últimas 0.07% (DE 0.05%) en pacientes COVID Persistente, y 1.16% (DE

0.97%) y 0.23% (DE 0.32%), respectivamente, en los controles. Además, se halló un detrimento en las Tregs CD45RA⁻CD39⁻ en los enfermos (0.23%, DE 0.15%) con respecto a los controles (0.42%, DE 0.26%). Otra población en la que se hallaron diferencias significativas fue la de células NKT y, dentro de ellas, la fracción NKT CD2⁺CD8⁺, aunque en este caso ambas se hallaron aumentadas en la cohorte de enfermos. En cuanto a las primeras, las medias fueron 2.04% (DE 2.7%) y 3.8% (DE 2.9%) en controles y enfermos, respectivamente, mientras que las NKT CD2⁺CD8⁺ representan un 0.99% (DE 1%) en controles y un 2.25% (DE 2.2%) entre los enfermos.

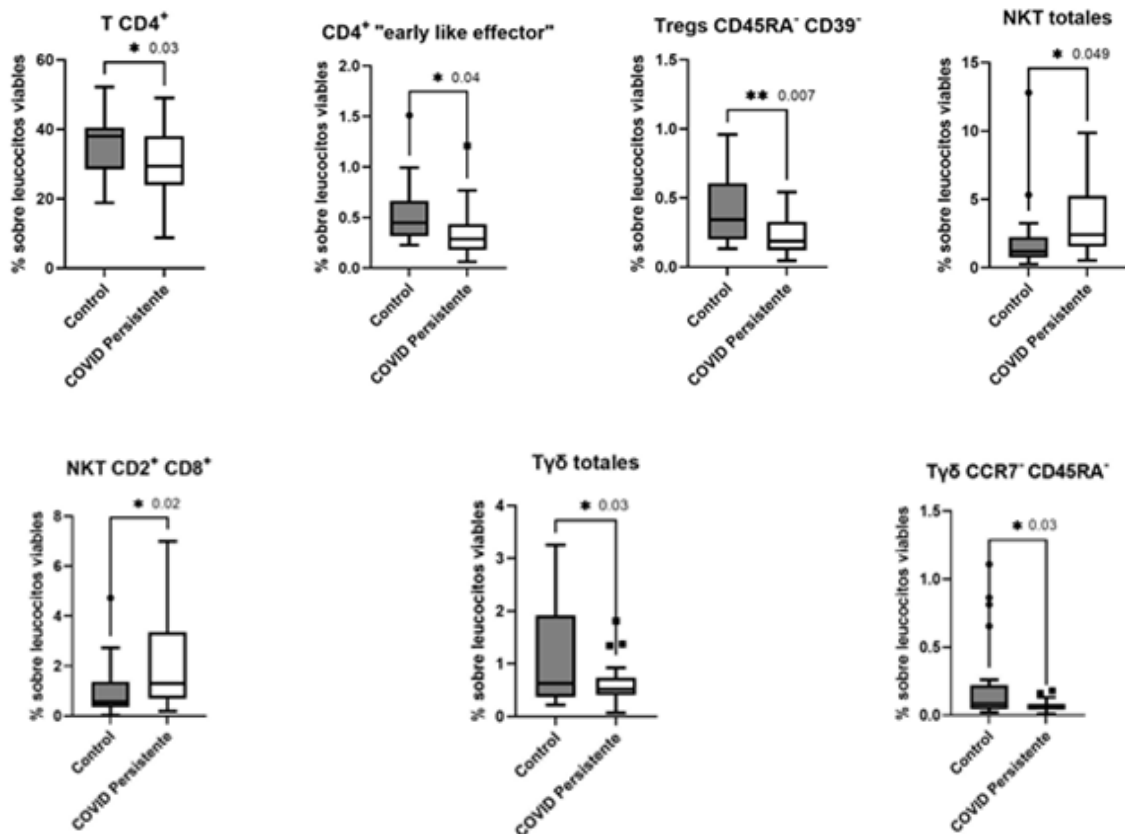


Fig. 11. Poblaciones de células inmunes significativamente alteradas en los pacientes con COVID Persistente, identificadas mediante la estrategia jerárquica manual.

3.6. Identificación de los metaclústeres obtenidos mediante la combinación de técnicas supervisadas y no supervisadas

Tras determinar los metaclústeres de forma no supervisada y realizar el análisis jerárquico manual de las poblaciones y sub poblaciones, se trató de identificar a qué población representaba cada uno, cuando fue posible. Para lograrlo, se combinó la información obtenida luego de aplicar la reducción de la dimensionalidad con la información obtenida de forma manual, junto con los niveles de expresión de los marcadores, tanto funcionales como fenotípicos. Cuando hizo falta, los metaclústeres fueron sub divididos o reagrupados en nuevos. A continuación, este análisis fue lanzado sobre el UMAP para observar cómo se distribuyen las nuevas agrupaciones (Figura 12).

Con los parámetros utilizados, se pudieron diferenciar 27 poblaciones biológicamente diferenciadas, separando o reagrupando los 20 metaclústeres iniciales. Han quedado clústeres sin identificar que se representan en blanco (Figura 12, 1), mientras que las

subpoblaciones con menor abundancia quedan enmascaradas dentro de categorías con mayor representación.

Además, se identificaron las características del metaclúster 4 (Figura 8, 4). Para ello, se hizo un gráfico FSC-A versus SSC-A para los controles y para los pacientes COVID Persistente (Figura 13, A y B, respectivamente), diferenciando las células dentro de éste (en negro) con el resto de las células (en rojo). Se puede observar su mayor abundancia dentro de los enfermos y que tienen un tamaño de pequeño a moderado y gran complejidad celular. Esto sumado al hecho de los altos niveles de expresión de CD16 y CD24 sugiere que podría tratarse de algún tipo de célula “neutrófilo *like*” (Parlato et al. 2014).

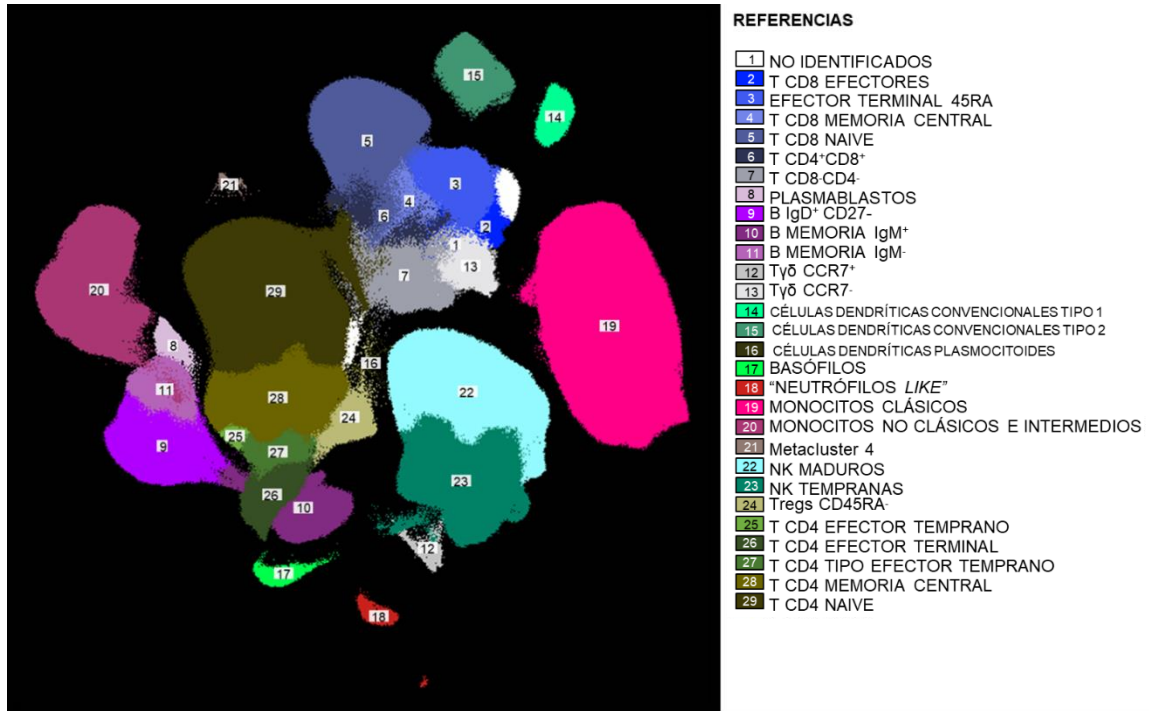


Fig. 12. Poblaciones celulares identificadas mediante la combinación de los análisis supervisado y no supervisado, mapeados sobre el UMAP (todas las muestras).

También se puede ver que los metaclústeres en los cuales se veían mayores diferencias de expresión entre casos y controles (Figura 9) corresponden al metaclúster que contiene a monocitos no clásicos e intermedios (Figura 12, 20) y a las células dendríticas plasmocitoides (Figura 12, 16), respectivamente. El metaclúster 20, por su parte, tampoco pudo ser confirmado a una población conocida (Figura 12, 21).

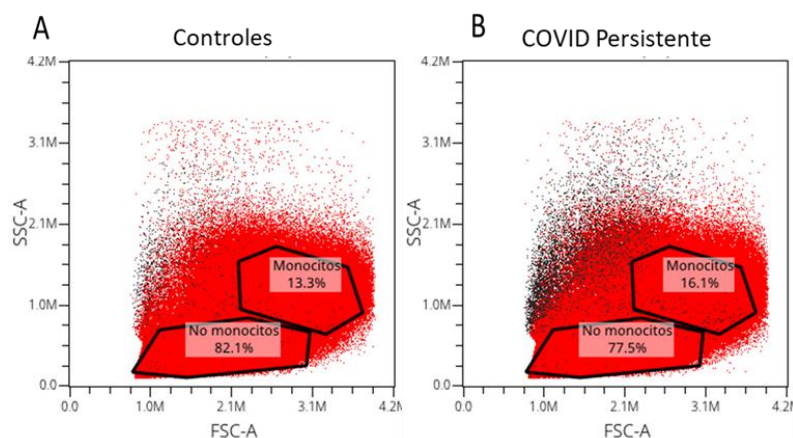


Fig. 13. Plot donde se muestra el tamaño y complejidad de las células que componen el metaclúster 4 (puntos negros), donde también se aprecia la mayor abundancia en el grupo de enfermos (B) por sobre el de controles (A).

4. Discusión

En este estudio hemos demostrado que los pacientes con COVID Persistente presentan una memoria celular y humoral disminuida frente al virus comparados con aquellos que no lo han desarrollado. Esto, a su vez, parece correlacionar con niveles disminuidos de linfocitos T CD4 en esa cohorte, lo que podría explicar parcialmente los resultados observados. Además, se ha identificado una población (metaclúster 4) que se encuentra expandida en esa cohorte. Dicho esto, se desconoce si estas alteraciones encontradas son causa o consecuencia del desarrollo del síndrome, algo que este grupo de investigación estudiará en el futuro.

Todos los individuos a excepción de uno (dentro del grupo de enfermos) presentaron anticuerpos de tipo IgG frente al antígeno S (proteína de la espícula viral) que podría deberse tanto a la vacunación como a la infección natural. Estos anticuerpos son de tipo neutralizante, al igual que los anticuerpos IgA contra el mismo antígeno. Sin embargo, son estos últimos los que mayor poder neutralizante poseen frente al SARS-Cov-2, se liberan primero y permanecen meses en las mucosas luego de la infección natural (Mohammed et al. 2022). Altos niveles de IgG e IgA se han asociado a casos graves de la enfermedad durante la infección viral temprana (Mohammed et al. 2022), sin embargo, aquí las IgA han resultado mucho más prevalentes entre los controles que entre los enfermos. En lo que respecta a los anticuerpos IgG frente al antígeno N (proteína de la nucleocápside), y aunque la diferencia no llegó a ser significativa (p -valor= 0.087), se observó una mayor cantidad de individuos reactivos entre los controles con respecto a los enfermos. Estos resultados difieren de otros estudios en los cuales se reportan respuestas humorales duraderas en pacientes con COVID Persistente, sobre todo en aquellos que han sufrido una hospitalización durante la enfermedad (Anaya et al. 2021). En el presente estudio, 8 de 20 pacientes habían sido hospitalizados como consecuencia de la COVID-19, y no se hallaron diferencias en los niveles de anticuerpos entre éstos y los que no habían requerido hospitalización (datos no mostrados). Es de notar que los anticuerpos afectados entre los enfermos son aquellos que se desarrollan frente a la infección natural (IgA anti-S e IgG anti-N) y no ante el estímulo vacunal inoculado por vía intramuscular (IgG anti-S).

La menor memoria humoral podría tener que ver con la disminución de la población de células T CD4⁺ totales en los pacientes con COVID Persistente. Si bien la fracción de células T CD4⁺ de memoria no parece alterada, su baja proporción respecto del total de los CD4⁺ puede hacer que escape al análisis jerarquizado. Niveles disminuidos en

células B, células T CD4⁺ y CD8⁺ se han visto en pacientes que han pasado una COVID-19 severa. Contrariamente, aquellos que han sufrido una enfermedad leve o moderada muestran una respuesta adaptativa robusta con altos niveles de células B productoras de anticuerpos contra la proteína S y células T de memoria frente a antígenos de las proteínas S y N, respuesta que perdura tras varios meses luego de la infección (Mohammed et al. 2022).

El hecho de que la disminución de la respuesta humoral se dé de forma significativa en los anticuerpos IgA y no en los demás, sumado a la evidente tendencia a una menor respuesta celular ante el estímulo viral en la prueba de ELISPOT, nos hace sospechar fuertemente que el mecanismo involucrado podría estar relacionado con una disminución de la capacidad reactiva de los linfocitos frente al virus, además de la depleción de los mismos. En pacientes con COVID-19 severa se ha visto que las células efectoras CD4⁺, CD8⁺ y NKT presentan un mayor grado de agotamiento e impedimento funcional comparados con controles sanos (Zhang et al. 2020; Zheng et al. 2020).

Respecto de las diferencias en las frecuencias relativas halladas en las diferentes sub poblaciones luego del análisis supervisado, el aumento de las células citotóxicas como las NKT CD2⁺ está en concordancia con estudios que señalan su aumento en pacientes durante la etapa aguda de la enfermedad así como en pacientes convalecientes (Zhang et al. 2020), aunque esto no sucedió en otras poblaciones citotóxicas. Particularmente, las NKT CD56⁺ se han visto enriquecidas en pacientes con COVID-19 severa (Zhang et al. 2020). La alteración en células Tregs también ha sido descrita en pacientes convalecientes, donde se ha visto que siguen alteradas luego de la recuperación clínica (Zhang et al. 2020). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias en otras poblaciones, tales como las de células B CD27⁻IgD⁻ y las de células T CD8⁺, como se ha descrito anteriormente en pacientes convalecientes con COVID Persistente (Anaya et al. 2021). Esto podría deberse a la normalización de estas alteraciones luego de un tiempo, ya que en dicho estudio los pacientes tenían una convalecencia de 3 a 6 meses, mientras que en éste la media desde la fecha de infección primaria por el virus fue de 522.7 días (463.4-581.9).

Las células T $\gamma\delta$ son un sub grupo particular de células que hacen de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, su accionar es CMH independiente en la mayoría de ellas. Se las ha asociado a varias enfermedades autoinmunes e infecciosas, como la gripe. También se han hallado elevadas en pacientes recuperados del SARS-CoV durante el brote de 2003. A comienzos de la pandemia, sus niveles disminuidos se han asociado a casos graves de COVID-19, como un posible factor de riesgo en personas ancianas (Rijkers, Vervenne, y van der Pol 2020).

Si analizamos todo el conjunto de resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de la memoria inmunológica y las poblaciones celulares afectadas, puede observarse que no existen grandes diferencias entre las cohortes, las poblaciones celulares tienen una distribución cuantitativa y cualitativa similar, aunque con diferencias puntuales (por ej., en los linfocitos T, en el metaclúster 4, etc.). Sin embargo, también podría decirse que existe una clara tendencia entre la cohorte de enfermos a presentar una pérdida de memoria, tanto humoral como celular, más rápida que los controles.

5. Conclusiones

Por un lado, se puede decir que la combinación de técnicas supervisadas y no supervisadas en este tipo de conjunto complejos mejora notablemente los resultados y simplifica bastante la tarea del investigador (Weijler et al. 2020). Los análisis no sesgados exploratorios nos orientan dándonos una visión macro de la disposición y características de las muestras, grandes diferencias entre grupos, etc. Son útiles para indicar dónde poner el foco o buscar manualmente más en detalle diferencias entre grupos o dentro de estos, o caracterizar poblaciones raras o no esperadas. Se pudo demostrar que el análisis manual jerarquizado obtuvo resultados que complementan y mejoran el análisis no sesgado. Ejemplo de ello es el hallazgo del metaclúster 4 a través de estos algoritmos no supervisados, que luego procedimos a caracterizamos manualmente.

Por otro lado, podemos decir que el presente estudio posee varias limitaciones. El corte transversal del estudio nos permite caracterizar el cuadro en el momento de la toma de muestras, pero no nos otorga información sobre su evolución. Son también limitaciones, el tamaño muestral pequeño y la alta variabilidad entre individuos, como es de esperar en muestras biológicas obtenidas de pacientes. Sin embargo, y a pesar de esto, creemos que los resultados obtenidos son más representativos de lo que realmente les sucede a las personas que lo padecen que si hubiésemos trabajado con modelos experimentales donde, además, un síndrome es difícilmente reproducible.

Finalmente, dado que todavía los estudios sobre el síndrome de COVID Persistente son escasos en cuanto a la descripción de su fisiopatología, este es una aproximación para tratar de determinar cuáles podrían ser los mecanismos etiopatogénicos subyacentes, a partir del análisis de las alteraciones halladas, para llegar a dar con la naturaleza de esta afección. Si bien se han propuesto como mecanismos aquellos derivados del daño tisular a largo plazo (como el pulmonar, cardíaco o cerebral) y también los que se originan a partir de la inflamación patológica producto de procesos autoinmunes, persistencia viral o desregulación inmunológica (Yong 2021; Mehandru y Merad 2022), hasta el momento sigue sin ser dilucidado por completo. Describimos que los pacientes con COVID Persistente presentan una menor memoria inmunológica y también alteraciones cuantitativas en ciertas poblaciones de linfocitos, sin embargo, no podemos afirmar si esto es una causa o una consecuencia del síndrome. Por eso, como continuación de este estudio y para obtener un panorama más completo de lo que sucede con estos pacientes, se llevará a cabo el análisis de las citocinas circulantes en los plasmas y la presencia de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 en las mucosas. También estudiaremos la capacidad de respuesta de los linfocitos T en diferentes condiciones y frente a otros patógenos ante los cuales la población se halla normalmente inmunizada, para evaluar si efectivamente hay un impedimento funcional y en ese caso, si esto podría afectar también el equilibrio patógeno-hospedador en otras situaciones.

6. Bibliografía

- Anaya, Juan Manuel, Manuel Rojas, Martha L. Salinas, Yhojan Rodríguez, Geraldine Roa, Marcela Lozano, Mónica Rodríguez-Jiménez, et al. 2021. «Post-COVID syndrome. A case series and comprehensive review». *Autoimmunity Reviews* 20 (11). <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2021.102947>.
- Becht, Etienne, Leland McInnes, John Healy, Charles Antoine Dutertre, Immanuel W.H. Kwok, Lai Guan Ng, Florent Ginhoux, y Evan W. Newell. 2019. «Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP». *Nature Biotechnology* 37 (1): 38-47. <https://doi.org/10.1038/NBT.4314>.
- Castanares-Zapatero, D., P. Chalon, L. Kohn, M. Dauvrin, J. Detollenaere, C. Maertens de Noordhout, C. Primus-de Jong, I. Cleemput, y K. Van den Heede. 2022. «Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review». *Annals of Medicine* 54 (1): 1473-87. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2076901>.
- Czerkinsky, Cecil, Gudrun Andersson, Hans Peter Ekre, Lars Åke Nilsson, Lars Klareskog, y Örjan Ouchterlony. 1988. «Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells». *Journal of Immunological Methods* 110 (1): 29-36. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90079-8).
- Fernández de las Peñas, César, Oscar J. Pellicer-Valero, Esperanza Navarro-Pardo, Domingo Palacios-Ceña, Lidiane L. Florencio, Carlos Guijarro, y José D. Martín-Guerrero. 2022. «Symptoms Experienced at the Acute Phase of SARS-CoV-2 Infection as Risk Factor of Long-term Post-COVID Symptoms: The LONG-COVID-EXP-CM Multicenter Study». *International Journal of Infectious Diseases* 116: 241-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.01.007>.
- Larijani, Mona Sadat, Fatemeh Ashrafian, Fahimeh Bagheri Amiri, Mohammad Banifazl, Anahita Bavand, Afsaneh Karami, Fatemeh Asgari Shokooh, y Amitis Ramezani. 2022. «Characterization of long COVID-19 manifestations and its associated factors: A prospective cohort study from Iran». *Microbial Pathogenesis* 169 (June): 105618. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105618>.
- Mehandru, Saurabh, y Miriam Merad. 2022. «Pathological sequelae of long-haul COVID». *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01104-y>.
- Melsen, Janine E., Monique M. van Ostaijen-ten Dam, Arjan C. Lankester, Marco W. Schilham, y Erik B. van den Akker. 2020. «A Comprehensive Workflow for Applying Single-Cell Clustering and Pseudotime Analysis to Flow Cytometry Data». *The Journal of Immunology* 205 (3): 864-71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901530>.
- Mohammed, Rebar N, Rozita Tamjidifar, Heshu Sulaiman Rahman, Ali Adili, Shadi Ghoreishizadeh, Hossein Saeedi, Lakshmi Thangavelu, et al. 2022. «A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19)». *Cell Communication and Signaling* 20 (1). <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00856-w>.
- Moreno-Pérez, Oscar, Esperanza Merino, Jose Manuel Leon-Ramirez, Mariano Andres, Jose Manuel Ramos, Juan Arenas-Jiménez, Santos Asensio, et al. 2021. «Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: A Mediterranean cohort study». *Journal of Infection* 82 (3): 378-83. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.004>.
- Ogbe, Ane, Barbara Kronsteiner, Donal T. Skelly, Matthew Pace, Anthony Brown,

- Emily Adland, Kareena Adair, et al. 2021. «T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses». *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21856-3>.
- Organizacion Mundial de la Salud. 2020. «Emergency use ICD codes for COVID-19 disease outbreak». Who. 2020. <https://www.who.int/standards/classifications/classification-of-diseases/emergency-use-icd-codes-for-covid-19-disease-outbreak%0Ahttps://www.who.int/classifications/icd/covid19/en/>.
- Park, Lily M., Joanne Lannigan, y Maria C. Jaimes. 2020. «OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood». *Cytometry Part A* 97 (10): 1044-51. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24213>.
- Parlato, Marianna, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes, François Philippart, Benoît Misset, Minou Adib-Conquy, y Jean-Marc Cavaillon. 2014. «CD24-Triggered Caspase-Dependent Apoptosis via Mitochondrial Membrane Depolarization and Reactive Oxygen Species Production of Human Neutrophils Is Impaired in Sepsis». *The Journal of Immunology* 192 (5): 2449-59. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301055>.
- Rigoni, Marta, Emanuele Torri, Giandomenico Nollo, Livia Delle Donne, Sebastiano Rizzardo, Lorenza Lenzi, Andrea Falzone, y Susanna Cozzio. 2022. «“Long COVID” results after hospitalization for SARS-CoV-2 infection». *Scientific Reports* 12 (1): 9581. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13077-5>.
- Rijkers, Ger, Trees Vervenne, y Pieter van der Pol. 2020. «More bricks in the wall against SARS-CoV-2 infection: involvement of $\gamma\delta$ T cells». *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0473-0>.
- Soriano, Joan B, Srinivas Murthy, John C Marshall, Pryanka Relan, y Janet V Diaz. 2021. «A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus». *The Lancet Infectious Diseases* 3099 (21): 19-24. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00703-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00703-9).
- Weijler, Lisa, Markus Diem, Michael Reiter, Margarita Maurer-Granofszky, Angela Schumich, y Michael Dworzak. 2020. «Detecting rare cell populations in flow cytometry data using UMAP». *Proceedings - International Conference on Pattern Recognition*, 4903-9. <https://doi.org/10.1109/ICPR48806.2021.9413180>.
- Yong, Shin Jie. 2021. «Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments». *Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1924397>.
- Zhang, Ji Yuan, Xiang Ming Wang, Xudong Xing, Zhe Xu, Chao Zhang, Jin Wen Song, Xing Fan, et al. 2020. «Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19». *Nature Immunology* 21 (9): 1107-18. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0762-x>.
- Zheng, Hong-Yi, Mi Zhang, Cui-Xian Yang, Nian Zhang, Xi-Cheng Wang, Xin-Ping Yang, Xing-Qi Dong, y Yong-Tang Zheng. 2020. «Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients». *Cellular & Molecular Immunology* 17: 541-43. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0401-3>.