



---

**Universidad de Valladolid**

**TRABAJO FÍN DE MÁSTER**

**“Caracterización del agotamiento de los  
linfocitos T en pacientes con síndrome  
*Long COVID*”**

Autora: Jimena Gutiérrez Benéitez

Director: David Bernardo Ordiz

**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
CURSO 2022/2023**



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

*A mi tutor, David, por su cercanía y confianza, y por haber sido mi estímulo durante la redacción de mi TFM.*

*A Carol, por contagiarme su pasión, acompañarme y guiarme dentro y fuera de este trabajo.*

*A mis compañeros de laboratorio por acogerme de forma inmejorable durante estos meses.*

*A mi madre, pareja y amigos por su apoyo incondicional.*

# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
3.1. Long COVID: definición, sintomatología y mecanismos.....	3
3.2. Hipótesis de trabajo .....	5
3.3. Objetivos .....	5
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
4.1. Reactivos, soluciones y estímulos .....	6
4.2. Equipos .....	6
4.3. Demografía y pacientes a estudio. ....	7
4.4. Obtención y procesamiento de las muestras .....	7
4.5. Enriquecimiento de linfocitos T .....	7
4.6. Preparación de las condiciones de la placa .....	8
4.7. Tinción.....	8
4.8. Citometría espectral .....	9
4.9. Tratamiento de datos .....	10
4.10. Análisis estadístico .....	10
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
5.1. Ausencia de diferencias en los niveles circulantes de linfocitos T de los pacientes con Long COVID .....	13
5.2. Ausencia de diferencias fenotípicas en los linfocitos T circulantes de los pacientes con Long COVID .....	13
5.3. Optimización de un protocolo de estimulación exvivo. ....	13
5.3.1. Donantes sanos .....	13
5.3.2. Caracterización de la respuesta funcional en pacientes control.....	14
5.3.3. Caracterización de la respuesta funcional en pacientes con Long COVID. ....	15
5.4. Análisis de los ratios.....	16
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>27</b>

## 1. ABREVIATURAS

- **BSA**, seroalbúmina bovina.
- **CMSP**, células mononucleares de sangre periférica.
- **COVID-19**, coronavirus 2019.
- **DMSO**, dimetilsulfóxido.
- **EDTA**, ácido etilendiaminotetraacético disódico.
- **FBS**, suero fetal bovino.
- **H**, hemaglutinina.
- **N**, neuraminidasa.
- **NS**, no estimulado.
- **OMS**, Organización Mundial de la Salud.
- **PBS**, Tampón fosfato salino.
- **PFA**, paraformaldehído.
- **Proteína S**, proteína Spike.
- **SARS-Cov-2**, Severe Acute Respiratory Síndrome Coronavirus-2.
- **UCI**, Unidad de Cuidados Intensivos.

## 2. RESUMEN

El Long COVID es la condición que ocurre en individuos con antecedentes de infección probable o confirmada por SARS-CoV-2, generalmente 3 meses después del inicio, con síntomas que duran al menos 2 meses y no pueden explicarse con un diagnóstico alternativo. Estudios previos habían revelado que estos pacientes presentaban una mayor pérdida de la memoria inmunológica que aquellos con COVID sin sintomatología Long COVID, pese a no haber diferencias inmunológicas significativas entre ambos. Por ello, nos planteamos que los pacientes Long COVID presentaban un perfil de linfocitos T exhaustos. Para comprobarlo se estudió el fenotipo, función y estado de agotamiento en 11 poblaciones de linfocitos T en pacientes con y sin Long COVID mediante citometría espectral, observando que no existían diferencias entre ellas. Además, se determinó la respuesta inmunológica frente a antígenos policlonales específicos e inespecíficos de cada cohorte, así como la magnitud de la respuesta que se establecía entre ambas. Se concluyó que los linfocitos T de los pacientes con y sin Long COVID mostraban niveles similares de agotamiento en respuesta a estímulos de COVID, y en menor medida de Influenza, aunque sin encontrarse diferencias entre cohortes. Esto pone de manifiesto la naturaleza persistente de los cambios producidos por COVID-19 en el sistema inmune adaptativo y abre el camino a futuras investigaciones para determinar si este agotamiento proviene de un fenómeno de memoria o es innato de los péptidos S del virus.

**Palabras clave:** SARS-Cov-2, COVID persistente, Citometría espectral, Agotamiento de linfocitos T.

## ABSTRACT

Long COVID is defined as the continuation or development of new symptoms 3 months after the initial SARS-CoV-2 infection, with these symptoms lasting for at least 2 months with no other explanation. Previous studies had revealed that these patients display a quicker loose of the immune memory referred to patients without Long COVID symptomatology, despite not being significant immunologic differences between them. Therefore, we hypothesize that Long COVID patients display a T-cell exhaustion phenotype. To address that, we studied the phenotype, function, and exhaustion status of 11 T-cells subsets in both cohorts by spectral cytometry, and there were no differences between them. In addition, the immune response against specific and non-specific polyclonal antigens in each cohort was determined and the existence of differences in magnitude between both cohorts was studied. As a conclusion, the levels of T lymphocytes exhaustion were similar comparing patients with and without Long COVID when stimulated with COVID and to a lesser extent with Influenza. Nevertheless, there were no differences between both cohorts. This highlights the persistent nature of the changes produced by COVID-19 in the adaptive immune system and opens the way for future research to determine whether this depletion stems from a memory phenomenon or is innate to the virus S-peptides.

**Key words:** SARS-Cov-2, long-COVID, Spectral cytometry, T-cell Exhaustion

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Long COVID: definición, sintomatología y mecanismos.

El **virus del SARS-CoV-2** (síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) surgió por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan (China)<sup>(1)</sup>. A pesar de los esfuerzos realizados para contenerlo, su rápida expansión provocó que se declarara en marzo de 2020 una pandemia global por enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) que se estima que hasta el momento ha registrado alrededor de 768 millones de contagios y 15 millones de muertes en el mundo según la OMS.

No obstante, la mayor parte de la población era asintomática o experimentó síntomas de leves a moderados siendo la fiebre, la tos, la disnea, la afectación musculoesquelética y la fatiga los más comúnmente reportados<sup>(2)</sup>; mientras que, aproximadamente un 15% necesitaron hospitalización y un 5% resultaron gravemente enfermos<sup>(3)</sup>.

Esta situación se vio mejorada con la llegada de las vacunas ya que fueron altamente eficaces frente a la infección por SARS-CoV-2 tanto en la población general con la pauta de vacunación completa<sup>(4)</sup> como en pacientes con enfermedades autoinmunes<sup>(5)</sup>.

No obstante, aunque la mayoría de la población consiguió recuperarse por completo, existe un grupo de personas que continúa sufriendo una serie de síntomas largo tiempo después de la infección por COVID-19 que diferían de las características epidemiológicas inicialmente propuestas desde Wuhan<sup>(6)</sup>.

Estos pacientes llevaron a cabo tareas de visibilización de su condición que no fueron tenidas en cuenta inicialmente por las organizaciones sanitarias<sup>(7)</sup>. Sin embargo, pronto se hizo patente la necesidad de definir a este nuevo grupo poblacional para su estudio. Esto motivó que mediante el proceso Delphi, llevado a cabo en Ginebra en 2021 con la participación de médicos e investigadores y coordinado por la OMS, se llegara a un consenso sobre su definición<sup>(8)</sup>.

Según esto, la OMS describió la primera **definición** clínica completa y oficial de la **enfermedad pos-COVID-19, también denominada COVID persistente o Long COVID**: *“Es la condición que ocurre en individuos con antecedentes de infección probable o confirmada por SARS-CoV-2, generalmente 3 meses después del inicio, con síntomas que duran al menos 2 meses y no pueden explicarse con un diagnóstico alternativo. Los síntomas comunes incluyen, entre otros, fatiga, dificultad para respirar y disfunción cognitiva, y generalmente tienen un impacto en el funcionamiento diario. Los síntomas pueden ser de nueva aparición después de la recuperación inicial de un episodio agudo de COVID-19 o persistir desde la enfermedad inicial. Los síntomas también pueden fluctuar o recaer con el tiempo”* <sup>(8)</sup>.

Varios estudios sugieren que alrededor de un 60% de los pacientes recuperados de infección aguda por COVID-19, tanto con aislamiento domiciliario<sup>(2)</sup> como con ingreso hospitalario<sup>(9)</sup>, presentaban uno o más **síntomas** persistentes de

COVID-19, siendo los más frecuentes la debilidad, el malestar general, la fatiga y la disnea<sup>(3)</sup> sumados a trastornos psicológicos, todos ellos de mayor gravedad en los pacientes que habían sido ingresados en UCI<sup>(10)</sup>.

Por ello, nos planteamos ahora las **causas** de estas diferencias en la sintomatología y gravedad presentadas por la población tras la infección por COVID-19. Por una parte, se han encontrado evidencias de factores de riesgo que determinan el desarrollo de síntomas post-COVID como son el sexo femenino, las infecciones agudas graves y la presencia de enfermedades comórbidas<sup>(11)</sup>. Por otra parte, actualmente se plantea que la causa de estas diferencias se basa en una infección conjunta de SARS-CoV-2 y otros patógenos intracelulares que pueden inducir disfunciones en las células inmunes como el agotamiento de los linfocitos T<sup>(12)</sup>.

En cuanto a la influencia de la vacunación, hay estudios que demuestran que cuando es anterior a la infección por SARS-CoV-2, muestra una reducción significativa en la incidencia por Long COVID al prevenir la infección inicial<sup>(13, 14)</sup>. De igual forma, el desarrollo de Long COVID se ha visto influenciado por la variante de SARS-CoV-2 y el nivel y tiempo desde la vacunación<sup>(15)</sup>. Asimismo, hay diferencias entre pacientes que ya presentan sintomatología de Long COVID, encontrando la misma proporción de casos en los que se reduce la gravedad de los síntomas desde la primera dosis<sup>(16)</sup> (hecho que anima a estos pacientes a la vacunación) que en los que se da un empeoramiento; mientras que la mayoría de los pacientes no experimenta diferencias<sup>(14, 15)</sup>.

Por otra parte, las reinfecciones son cada vez más frecuentes y con ellas se aumentan los riesgos de muerte, hospitalización y desarrollo de secuelas de Long COVID tras la segunda y tercera reinfección, incluso en personas doble y triplemente vacunadas<sup>(17)</sup>.

Los **mecanismos** que pueden contribuir a la fisiopatología del Long COVID no están claros. Se han propuesto dos mecanismos principales basados en los dos perfiles que se distinguen a nivel clínico para Long COVID: perfil inflamatorio (disminución de T CD4<sup>+</sup> y aumento de T CD8<sup>+</sup>) y perfil inmunitario (aumento de T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>)<sup>(18)</sup>.

El mecanismo de hiperinflamación crónica se basa en que el virus desencadena en el pulmón una cascada de citocinas que puede producir daños a nivel pulmonar, cardíaco y neurológico<sup>(18)</sup>. El mecanismo autoinmune plantea la existencia de autoanticuerpos contra las proteínas inmunomoduladoras que alteran la respuesta inmune dificultando la contención del virus<sup>(19)</sup>.

Además, se han propuesto otros mecanismos como son la disfunción autonómica mediada por el virus o la continuidad del virus en el organismo debido a una baja respuesta inmune, reinfecciones u otras causas como son las alteraciones en la microbiota intestinal<sup>(18)</sup>. La disbiosis intestinal se ha demostrado que está involucrada tanto en la magnitud de la gravedad por COVID-19<sup>(20)</sup> como en la sintomatología presentada en Long COVID<sup>(21)</sup>.

Puesto que todos estos mecanismos tienen en común los desórdenes subyacentes del sistema inmune, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se caracterizó el inmunoma de pacientes Long COVID frente a pacientes COVID que no presentaban síntomas de Long COVID, y se concluyó que, pese a no existir diferencias inmunológicas significativas entre ambas cohortes, había una mayor pérdida de la memoria inmunológica en los pacientes que sufrían de Long COVID<sup>(22)</sup>.

Esta observación se podría explicar por la presencia en estos pacientes de **linfocitos T con un perfil exhausto o agotado** caracterizado por la pérdida jerárquica de funciones efectoras y propiedades de memoria en estas células, la expresión de receptores inhibitorios, la disminución en la proliferación y el uso alterado de los factores de transcripción; todo ello en respuesta a antígenos persistentes y señales inflamatorias tras infecciones como el COVID-19<sup>(23)</sup>.

Este agotamiento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estaría involucrado en la mortalidad por COVID-19 puesto que desencadena un control ineficiente de las infecciones por otros patógenos. Esto es debido a que un segundo patógeno podría inducir el agotamiento acelerado de las células T causando una respuesta insuficiente del sistema inmune frente a él<sup>(24)</sup>.

En este contexto, el presente trabajo se centra en el **estudio del fenotipo de los linfocitos T en pacientes con y sin Long COVID, así como en la caracterización funcional de su respuesta a diferentes estímulos**. Por una parte, como estímulo policlonal inespecífico se utiliza anti-CD3/CD28, ejerciendo además como control positivo debido a su elevada acción estimulante. Por otra parte, como estímulos específicos se utilizan virus respiratorios de COVID e Influenza. Pese a pertenecer a familias distintas, ambos presentan similitudes en cuanto a morfología, ruta de infección, modo y capacidad de transmisión y sintomatología<sup>(25)</sup>. Por ello, la utilización de ambos virus sirve para comprobar si la respuesta a la estimulación es COVID específica.

### 3.2. Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo que se plantea es que los pacientes que sufren Long COVID presentan un perfil de linfocitos T exhaustos (referido frente a los pacientes que no han desarrollado este síndrome) que explicaría la mayor pérdida de memoria humoral y celular observada en estos pacientes.

### 3.3. Objetivos

Para comprobar dicha hipótesis, se marcaron los siguientes objetivos para este trabajo:

- Estudiar el fenotipo, función y estado de agotamiento de las diversas poblaciones de linfocitos T en controles y en pacientes que han desarrollado Long COVID.
- Determinar, en ambas poblaciones a estudio, la respuesta inmunológica que se establece frente a antígenos policlonales inespecíficos (anti-CD3/CD28) y antígenos específicos (COVID e Influenza).
- Determinar si existen diferencias en la magnitud de respuesta inmunológica en distintas condiciones de estimulación entre ambas cohortes.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos, soluciones y estímulos

**Tabla 1.** Lista de reactivos utilizados, junto a su casa comercial.

Reactivos	Casa comercial
PBS: Phosphate Buffered Saline 1x 0,0067 M	Cytiva Hyclone
AIM-V: Serum Free Medium 1x	Gibco
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético disódico	Sigma-Aldrich
BSA: Bovine Serum Albumin Fraction V Ig free	Gibco
DMSO: Dimetilsulfóxido	MP Biomedicals
Pan T Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec
Catch Reagent (IL4+1L10+IFNg), human	Miltenyi Biotec
Human BD Fc Block™ (0,5 mg/ml)	BD Biosciences
PFA: Paraformaldehído 10%	Protocol
FBS: Suero fetal bovino	Gibco
Ficoll-Paque™ PLUS	Cytiva

**Tabla 2.** Lista de soluciones empleadas, junto a su composición.

Soluciones	Composición
MACS Buffer	2 Mm EDTA + 0,5% BSA en PBS
PFA	Al 0,8% en PBS
Medio de congelación	90% FBS + 10% DMSO

**Tabla 3.** Lista de estímulos (anticuerpos) utilizados, junto a su casa comercial.

Estímulos	Casa comercial
Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD3	BioLegend
Anti-human CD28 mAb	MABTECH
PepPool SARS-CoV-2	MABTECH
PepMix™ Influenza A (HA/California (H1N1))	JPT Peptide Technologies
PepMix™ Influenza A (HA/Peth (H3N2))	JPT Peptide Technologies

### 4.2. Equipos

**Tabla 4.** Lista de equipos de laboratorio utilizados, junto a su casa comercial.

Equipo	Casa comercial
Citómetro Spectral Aurora 5 láseres	Cytek
Centrífuga 5424 R	Eppendorf
Centrífuga GT 2R	Fisher Brand
Agitador tipo vórtex	Heidolph Reax Top
Baño térmico	Wendigen w6
Campana de flujo	Thermo Scientific™
Incubador	Fisher Brand
Ultracongelador serie TSX	Thermo Scientific™
Sistema de almacenamiento de muestras CryoPlus™	Thermo Scientific™

#### 4.3. Demografía y pacientes a estudio.

En este estudio, se han analizado muestras biológicas de 3 cohortes: cohorte Long COVID, cohorte control y donantes sanos.

La **cohorte Long COVID** estaba constituida por 19 pacientes adultos, que habían sido diagnosticados de Long COVID. Entre ellos, 16 eran mujeres y 3 eran hombres, con una edad media de 44,4 años y un tiempo medio desde primoinfección hasta la recogida de muestra de 496 días. Esta cohorte ya había sido utilizada en estudios previos de determinación de memoria humoral, celular e inmunofenotipaje de las poblaciones celulares<sup>(22)</sup> cuyos resultados sentaron las bases del actual estudio. Para ello, se contaba con duplicados de los viales criopreservados para cada paciente.

La **cohorte control** consistía en 22 pacientes adultos y diagnosticados de haber sufrido infección por SARS-Cov-2 pero que no presentaban, en el momento del estudio, sintomatología compatible con Long COVID. De estos, 16 eran mujeres y 6 eran hombres, con una edad media de 45,5 años y un tiempo medio desde primoinfección hasta la recogida de muestra de 630 días estando por tanto pareada en género, edad y tiempo desde primoinfección con la cohorte a estudio.

Por otro lado, las 8 muestras de sangre periférica procedentes de **donantes sanos** se obtuvieron a partir de “buffy coats” proporcionados por el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

En todos los casos, la presencia de patologías previas conocidas de tipo inflamatorio, neoplásicas malignas y autoinmunes, así como el tratamiento con fármacos inmunosupresores fueron criterios de exclusión en ambas cohortes.

#### 4.4. Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras utilizadas en este estudio habían sido previamente preparadas en crioviales y preservadas en nitrógeno líquido hasta su utilización<sup>(22)</sup>. Brevemente, se extrajeron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de muestras de sangre en heparina-litio mediante Cytiva Ficoll-Paque™ PLUS.

#### 4.5. Enriquecimiento de linfocitos T

Se procedió a enriquecer los linfocitos T de las muestras a estudio. Para ello, se descongelaron y prepararon las células para ser incubadas con el kit Pan T Cell Isolation Kit human consistente, en primer lugar, en un T-cell biotin-Antibody Cocktail que se une selectivamente al resto de células que no son linfocitos T; y en segundo, en un T Cell MicroBead Cocktail, responsable de la unión a las células marcadas con los anticuerpos para conferirles propiedades magnéticas que son la base de la posterior separación.

La suspensión celular se pasó por una columna LS (Miltenyi biotec) acoplada a imán (Quadro MACS Miltenyi biotec) que había sido previamente acondicionada utilizando tampón MACS. La capacidad máxima de cada columna es de 10 millones de células, por tanto, es necesario un contaje previo y el reparto en varias columnas si procede. Tras el paso por la columna, se consigue la eliminación de las células marcadas ya que se quedan retenidas debido a sus propiedades magnéticas; y la elución de las células de interés, los linfocitos T

totales enriquecidos. En todos los casos se siguió el flujo de trabajo establecido por el fabricante confirmando que la pureza final de linfocitos T era superior al 95% (datos no mostrados).

#### 4.6. Preparación de las condiciones de la placa

Una vez enriquecidos, los linfocitos T se cultivaron ex-vivo en **4 condiciones por muestra**: NS (no estimulado), anti-CD3/CD28 como estímulo policlonal inespecífico, y COVID e Influenza como estímulos específicos para determinar el tipo de respuesta que establecían los linfocitos de las 2 cohortes a estudio.

El pool de péptidos de SARS-CoV-2 utilizado contiene 166 péptidos del virus SARS-CoV-2 humano. Estos péptidos, de 15 aminoácidos de longitud, cubren el dominio S1 de la proteína spike (S) del virus de forma solapante con 11 aminoácidos de separación. La utilización de la proteína S como diana de la respuesta inmune se debe a que se ha observado una gran respuesta de las células T ayudantes y citotóxicas a esta proteína<sup>(26)</sup> que podría venir determinada por su gran tamaño o su alto nivel de expresión<sup>(27)</sup>. De forma que, si hay clones que reconocen los epítomos de la proteína S, se van a activar, induciendo así la secreción de citocinas a partir de células T humanas antígeno-específicas.

Para la estimulación con Influenza, se ha empleado una mezcla de dos pools de péptidos que actúan sobre las proteínas de superficie hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) de los dos subtipos de virus de influenza A que circulan en la actualidad de forma más habitual entre la población: HA (H1N1) y HA (H3N2)<sup>(26)</sup>. Cada pool contenía 61 péptidos de 15 aminoácidos de longitud que abarcan la secuencia completa de dichas proteínas con un solapamiento de 11 aminoácidos entre péptidos adyacentes.

Para ello, en todos los casos, y tras enriquecer los linfocitos T, se procedió al conteo celular y al sembrado de 200.000 células/pocillo por muestra y condición en una placa Petri de 96 pocillos (Corning). Para la condición anti-CD3/CD28 se incubaron los pocillos toda la noche a 4°C con anti-CD3 (10 µg/ml) previo a añadir anti-CD28 (1 µg/ml). Por su parte, los estímulos con péptidos de COVID e Influenza se realizaron a una concentración de 1 µg/ml. Las células se incubaron durante 18 horas a 37°C en un incubador (95% CO<sub>2</sub>) antes de su recuperación y posterior análisis.

#### 4.7. Tinción

Tras finalizar el cultivo, se recogieron los sobrenadantes (que fueron criopreservados) y las células de la placa. Estas últimas se transfirieron a tubos de citometría (5 mL, Falcon-A Corning Brand) donde se añadieron 50 µl/tubo de una mix de Catch Reagent (3:22 en AIM-V) y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Este paso facilita la detección de las citocinas a estudio en ausencia de una tinción intracelular. Posteriormente, se añadieron 100 µl de AIM-V/tubo y se volvieron a incubar durante 90 min a 37°C en un incubador (95% CO<sub>2</sub>).

Una vez finalizada la incubación, se procedió a realizar la tinción con los anticuerpos descritos en la Tabla 5. En primer lugar, se añadieron 5 µl de solución de viabilidad (**Viability Blue**, dilución 1:40 en PBS) como marcador que identifica

las células muertas y se incubó (15 minutos, temperatura ambiente, oscuridad). Se lavaron añadiendo 1 ml de Wash Buffer y centrifugando (500 g, 5 min, 4°C).

A continuación, se retiró el sobrenadante y se bloquearon las uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo mediante la adición de 2 µl de **Fc Block** (dilución 1:50 en Wash Buffer). Se incubaron (10 minutos, temperatura ambiente, oscuridad) y se realizó otro lavado en las mismas condiciones para eliminar el exceso de Fc Block.

Tras el lavado, se retiró nuevamente el sobrenadante y se añadieron 100 µl/tubo de una **mix de anticuerpos** preparada según la dilución en Wash Buffer que se especifica en la Tabla 5. Se incubaron (20 minutos a 4°C) y se realizó otro ciclo de lavado añadiendo 1 ml de Wash Buffer, centrifugando (500 g, 5 min, 4°C) y retirando el sobrenadante.

Por último, se añadió paraformaldehído (PFA) al 0,8% para llevar a cabo la fijación (10 minutos a 4°C). Finalmente, las células se lavaron como se ha descrito anteriormente y se preservaron en un volumen mínimo de 500 µl a 4°C para realizar la adquisición en el citómetro en un plazo máximo de 24 horas.

#### 4.8. Citometría espectral

*Tabla 5. Panel de tinción para ensayos de agotamiento de linfocitos T.*

	Fluorocromo	Especificidad	Dilución	Casa comercial	Propósito
<b>Marcadores de linaje</b>	PerCP	<b>CD45</b>	10/421	BioLegend	Leucocitos
	CFluor YG584	<b>CD4</b>	2/421	Cytex	Células T Helpers
	BUV805	<b>CD8</b>	5/842	BD Biosciences	Células T Citotóxicas
	BUV395	<b>CD45RA</b>	5/421	BD Biosciences	Diferenciación de células T naïve y de memoria
	BV421	<b>CCR7</b>	20/421	BioLegend	Diferenciación de células T de memoria central y efectora
<b>Marcadores funcionales</b>	BV711	<b>CTLA-4</b>	1/50	BioLegend	Marcadores de agotamiento
	BV480	<b>LAG-3</b>	1/50	BD Biosciences	
	BV650	<b>TIM-3</b>	1/50	BioLegend	
	BV785	<b>PD-1</b>	20/421	BioLegend	
	PE-Cy7	<b>CD69</b>	1/800	BioLegend	Marcador de activación
	PE	<b>IL-4</b>	1/50	Miltenyi Biotec	Perfil de producción de citocinas
	APC	<b>IL-10</b>	1/50	Miltenyi Biotec	
	FITC	<b>IFN <math>\gamma</math></b>	1/50	Miltenyi Biotec	
<b>LIVE/DEAD Fixable Blue Dead</b>			1/40	Thermo Fisher Scientific	Viabilidad

La caracterización de las muestras se llevó a cabo mediante citometría espectral en un equipo CyTek Aurora de 5 láseres, utilizando un panel de agotamiento de linfocitos T. Se trata de un panel de 14 marcadores (Tabla 5) creado para la identificación de las 11 poblaciones de linfocitos T presentes en las CMSP y la medición de su estado de agotamiento, nivel de activación y producción de citocinas.

#### 4.9. Tratamiento de datos

El análisis de los datos y la caracterización del perfil linfocitario se llevó a cabo utilizando la plataforma OMIQ Data Science (© Omiq, Inc. 2023). En ella se definió la estrategia de identificación (Figura 1) que, tras eliminar a las células muertas y los dobles, permite identificar al total de linfocitos T.

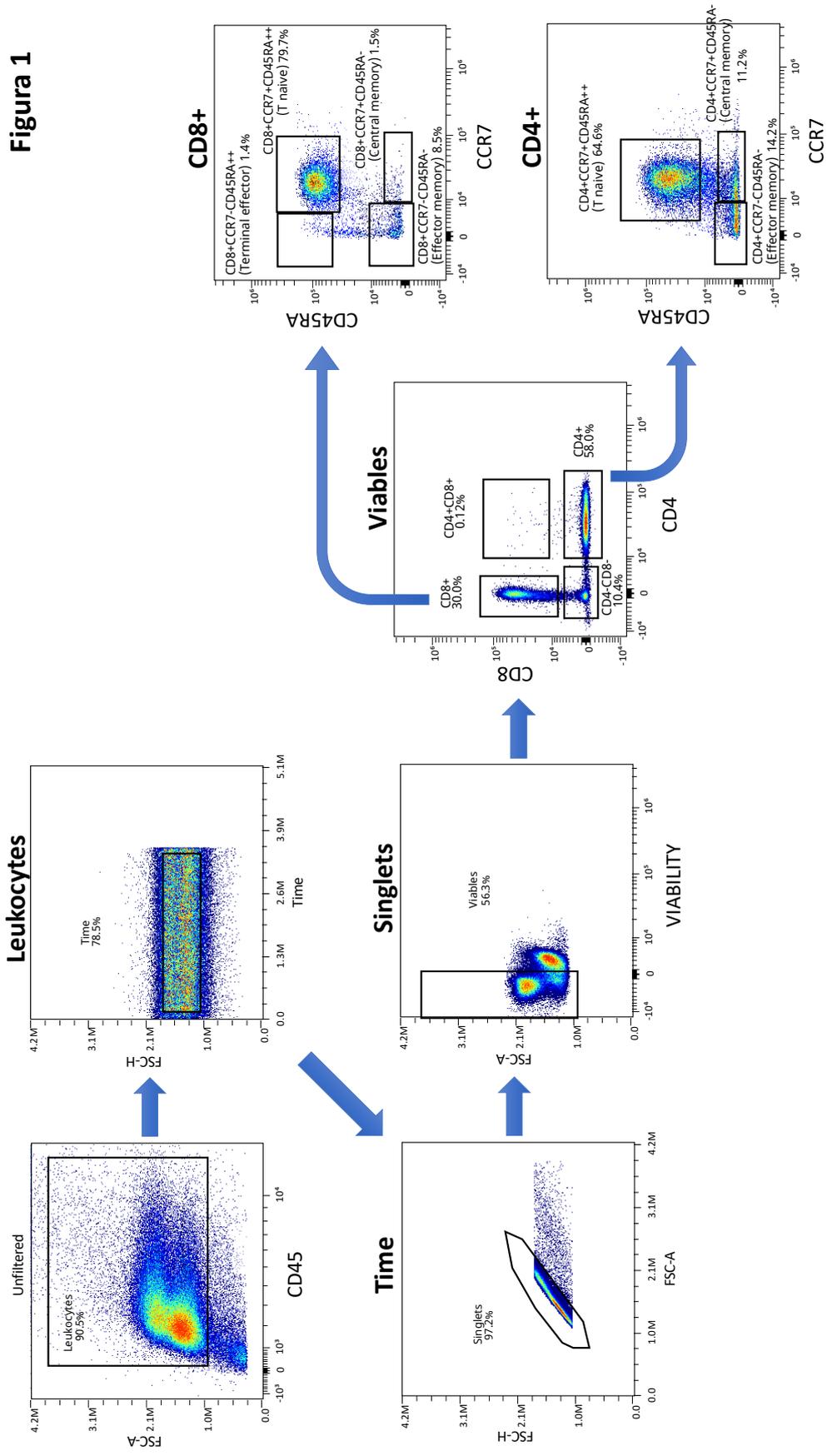
A su vez, y dentro de ellos, se pueden identificar 11 poblaciones totales de linfocitos T: CD4<sup>+</sup> totales, CD4 naive (CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>++</sup>), CD4 Effector memory (CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>), CD4 Central memory (CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), CD8<sup>+</sup> totales, CD8 naive (CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>++</sup>), CD8 Effector memory (CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>), CD8 Central memory (CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), CD8 Terminal effector (CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>++</sup>), CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> totales y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> totales.

Finalmente, y dentro de cada una de las 11 poblaciones a estudio, se definieron los niveles de expresión de los marcadores de agotamiento (CTLA-4, LAG-3, TIM-3 y PD-1), activación (CD69) y producción de citocinas (IFN  $\gamma$ , IL-4 e IL-10).

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de identificación de los niveles de expresión los 8 marcadores a estudio dentro del total de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

#### 4.10. Análisis estadístico

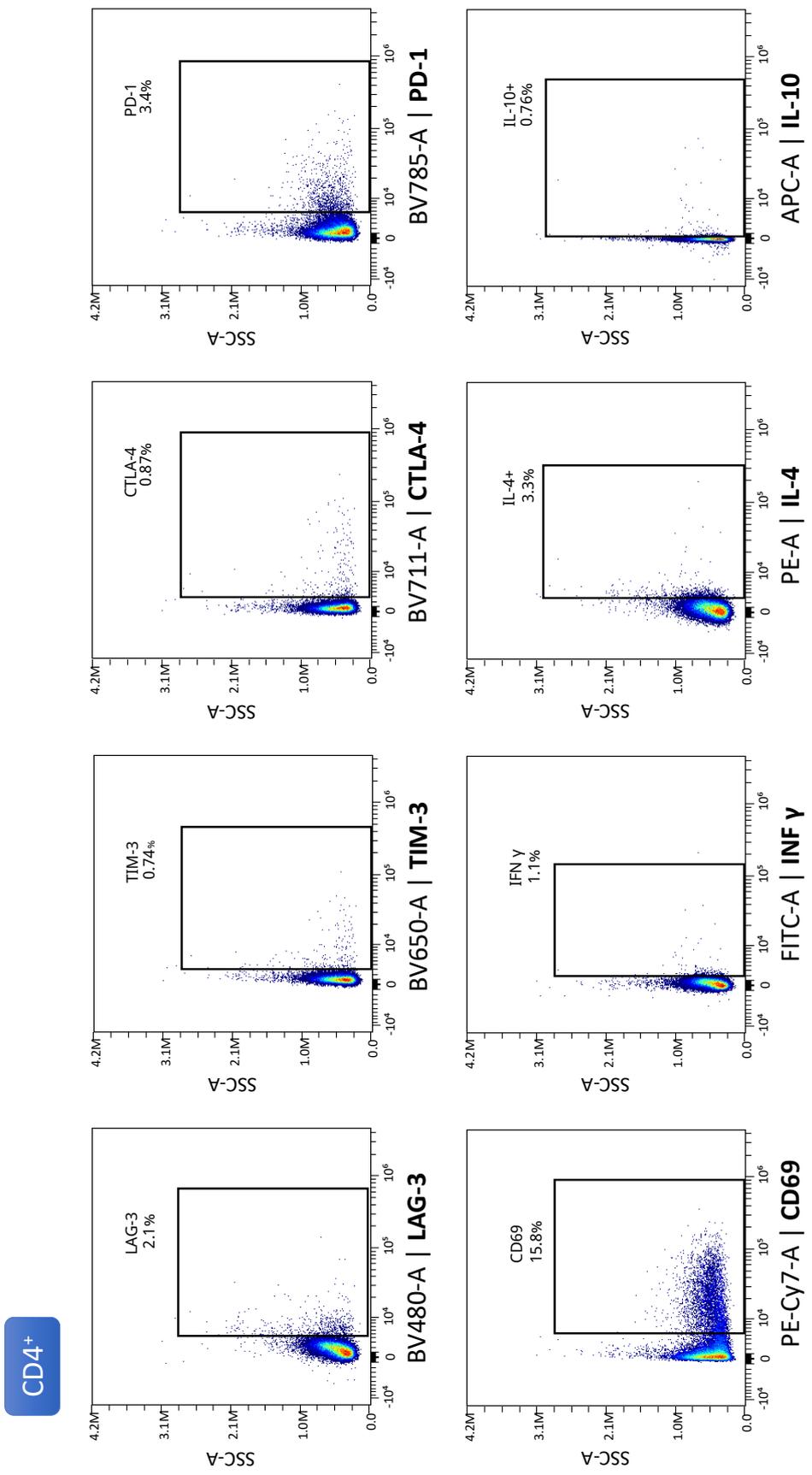
El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 9.5.1 mediante T-Test no pareado para la comparación de las poblaciones y los marcadores en estado basal entre cohortes (Figura 3 y Figura 4, respectivamente), T-Test pareado para la comparación de los marcadores en estado basal y con estímulo en donantes sanos (Figura 5), ANOVA de una vía de muestras pareadas para la comparación de los marcadores en estado basal con los estimulados para cada una de las cohortes (Figura 6 y Figura 7), y ANOVA de dos vías para la comparación de los ratios estímulo/basal de las cohortes control y Long COVID (Figura 8). El nivel de significación estadística utilizado en todos casos fue de  $p < 0,05$ .



**Figura 1**

**Figura 1. Estrategia de identificación.** Abordaje de citometría para la identificación de las 11 poblaciones de linfocitos T dentro de los eventos singletes y viables tras su enriquecimiento: CD4<sup>+</sup> totales, CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>++</sup> (CD4 naive), CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> (CD4 Effector memory), CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (CD8 Central memory), CD8<sup>+</sup> totales, CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>++</sup> (CD8 naive), CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> (CD8 Effector memory), CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (CD8 Central memory), CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>++</sup> (CD8 Terminal effector), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> totales y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> totales.

**Figura 2**



**Figura 2. Niveles de expresión de cada marcador. Niveles de expresión de los diferentes marcadores en linfocitos T CD4+ totales en respuesta a un estímulo policlonal (anti-CD3/CD28).**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ausencia de diferencias en los niveles circulantes de linfocitos T de los pacientes con Long COVID

En primer lugar, se realizó un estudio de los niveles de expresión de las diferentes poblaciones identificadas mediante la estrategia de identificación (Figura 1) tanto en pacientes control como en Long COVID, en condiciones de no estimulación. Se observa que no existe diferencia en los niveles circulantes de las diversas sub-poblaciones de linfocitos T entre ambas cohortes (Figura 3) (algo previamente sugerido por investigaciones anteriores de nuestro grupo<sup>(22)</sup>).

### 5.2. Ausencia de diferencias fenotípicas en los linfocitos T circulantes de los pacientes con Long COVID

Dado que no había diferencias en los niveles circulantes de las diversas poblaciones de linfocitos T entre ambas cohortes, lo siguiente que se realizó fue determinar los niveles de expresión, para cada población a estudio, de los marcadores de senescencia, activación y producción de citocinas.

Con el objetivo de simplificar los resultados obtenidos, únicamente se muestran los niveles de expresión de los 8 marcadores a estudio en las 4 poblaciones principales: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Figura 4) demostrándose como, de forma general no existen diferencias fenotípicas en estado de agotamiento, activación o producción de citocinas de forma basal entre pacientes con Long COVID y el grupo control.

Un análisis más en profundidad en el resto de las poblaciones de linfocitos T demostró la ausencia de diferencias significativas entre ambas cohortes con la excepción de LAG-3 que estaba ligeramente aumentado en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (p-valor = 0,0473) y T CD4 naive (p-valor = 0,0241), e IFN  $\gamma$ , que estaba disminuido en los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (p-valor = 0,0113) de los pacientes Long COVID.

### 5.3. Optimización de un protocolo de estimulación ex vivo.

Tras haber realizado los análisis en condiciones basales y habiendo confirmado la ausencia de diferencias no sólo en la distribución de las poblaciones celulares (Figura 3), en concordancia con las observaciones previas realizadas por nuestro grupo, sino tampoco en su estado de activación (Figura 4), se procedió a evaluar la presencia de diferencias no tanto fenotípicas sino funcionales entre ambas cohortes.

Para tal fin, los linfocitos T de los pacientes control y Long COVID fueron estimulados en presencia de diversos estímulos de activación, incluyendo estímulos poli-clonales inespecíficos (antiCD3/CD28) y estímulos específicos (COVID e Influenza).

#### 5.3.1. Donantes sanos

Previo a realizar dichos experimentos, se procedió a establecer el modelo de cultivo. Para ello se sometió a los linfocitos T procedentes de alícuotas criopreservadas de CMSP de donantes sanos a estimulación mediante anti-

CD3/CD28 y se comparó la expresión de los marcadores en estimulación (control positivo) frente a condiciones basales (control negativo).

Como se ve en la Figura 5, todas las poblaciones de linfocitos aumentan la expresión de CD69 en respuesta a un estímulo policlonal e inespecífico, así como la expresión de IFN  $\gamma$  e IL-10 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales, CD8<sup>+</sup> totales y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> confirmando, por tanto, la respuesta de los linfocitos en presencia de un estímulo.

### 5.3.2. Caracterización de la respuesta funcional en pacientes control.

Tras haber puesto a punto el modelo de cultivo, se evaluó la respuesta que el grupo control (pacientes post-COVID sin Long COVID) establecían frente a un estímulo policlonal y 2 estímulos específicos, uno frente a la proteína S del SARS-CoV-2 y otro frente a las proteínas H1N1 y H3N2 del virus de la Influenza (Figura 6).

Relativo a los **marcadores de agotamiento**, encontramos como LAG-3 aumentaba su expresión en respuesta a los estímulos de COVID en las principales poblaciones, respondiendo en menor medida en las poblaciones CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> para Influenza. Por su parte, TIM-3 también aumentó su expresión en las 4 poblaciones principales en respuesta a COVID, y en menor medida en los linfocitos dobles positivos y dobles negativos en respuesta a influenza. Un perfil similar mostró PD-1, que también aumento su expresión en todas las poblaciones en respuesta a COVID y en menor medida (restringido a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) en respuesta a influenza. Finalmente, CTLA-4 aumentó su expresión en todas las poblaciones en respuesta a COVID, pero no así a Influenza (Figura 6).

Por su parte, el **marcador de activación** CD69 aumentó su expresión en todas las poblaciones en respuesta a un estímulo policlonal (anti-CD3/antiCD28) pero no así en respuesta a los estímulos de COVID e influenza.

Por último, en los **marcadores de producción de citocinas** se observó un perfil más variado que va a diferir en función de cada marcador. En cuanto a IFN  $\gamma$ , aumentó en respuesta a los estímulos de COVID en tres poblaciones (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) que difieren en una de ellas de las tres estimuladas en menor medida por Influenza (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Por su parte, IL-4 aumentó su expresión en las poblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en respuesta a estímulos de COVID; y, solamente y en menor medida a estímulos de Influenza en CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Por el contrario, con IL-10 se observa un aumento de expresión con CD3CD28 de todas las poblaciones; y, únicamente de CD8<sup>+</sup>, en respuesta a estímulos de COVID.

Dicho esto, en la Tabla 6 se muestra un análisis más en profundidad de todas las poblaciones de linfocitos T estudiadas, centrándonos en la respuesta que se establece a estímulos de COVID, referido siempre al cultivo basal. Como se puede observar, y de forma general, prácticamente todas las poblaciones (excepto las CD8 Terminal effector) muestran un aumento de sus niveles de agotamiento en respuesta a estímulos de COVID; mientras que únicamente se mostró activación de los linfocitos T CD8 naive. Además, el tipo de respuesta

inmune que se estableció tras la estimulación por COVID fue de tipo mixto generando tanto citocinas de tipo Th1 (IFN  $\gamma$ ) como de tipo Th2 (IL-4).

**Tabla 6.** P-valores obtenidos para la expresión de los marcadores en las 11 poblaciones de pacientes control mediante ANOVA de una vía comparando los resultados de estimulación por COVID con los de estado basal donde ns indica no significativo, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . La flecha  $\uparrow$  indica que el sentido del cambio es en aumento para la condición de estimulación frente a la basal.

POBLACIONES	MARCADORES							
	LAG-3	TIM-3	CTLA-4	PD-1	CD69	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
CD4 <sup>+</sup>	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	ns	$\uparrow$ *	$\uparrow$ **	ns
CD4 naive	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	ns	$\uparrow$ *	$\uparrow$ **	ns
CD4 Effector memory	ns	$\uparrow$ *	ns	$\uparrow$ *	ns	$\uparrow$ *	$\uparrow$ **	ns
CD4 Central memory	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	ns	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ ***	ns
CD8 <sup>+</sup>	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	ns	$\uparrow$ *	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ *
CD8 naive	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ *	$\uparrow$ *	$\uparrow$ ****	ns
CD8 Effector memory	$\uparrow$ *	ns	$\uparrow$ *	ns	ns	ns	$\uparrow$ ***	ns
CD8 Central memory	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	ns	$\uparrow$ **	$\uparrow$ ***	ns
CD8 Terminal effector	ns	ns	ns	ns	ns	ns	$\uparrow$ ****	ns
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ****	$\uparrow$ ***	ns	$\uparrow$ ****	ns	ns
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	$\uparrow$ **	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ ***	$\uparrow$ **	ns	ns	$\uparrow$ ***	ns

**5.3.3. Caracterización de la respuesta funcional en pacientes con Long COVID.** De forma similar a la sección previa, se observó que, en general, los linfocitos T de los pacientes Long COVID mostraban el mismo tipo de respuesta funcional que la cohorte control.

Por una parte, los **marcadores de agotamiento** LAG-3, TIM-3 y PD-1 presentaron el mismo patrón ya que todos se encontraban aumentados en las 4 poblaciones frente a estímulos de COVID, y en menor medida en CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> tras estimularse con Influenza. El aumento de CTLA-4, al igual que en los pacientes control, es COVID específico en las 4 poblaciones. Aunque en este caso, en CD4<sup>+</sup> también se ve aumentado al estimular con CD3CD28.

Por otra parte, el **marcador de activación** rápida CD69 aumentó su expresión de forma estadísticamente significativa en todas las poblaciones en respuesta al estímulo poli-clonal, pero no hay aumento en ninguna población frente a los estímulos monoclonales. Este hecho ya se observaba en los pacientes control.

Por último, en los **marcadores de producción de citoquinas** se comprueba nuevamente como hay cierta similitud entre ambas cohortes. IFN  $\gamma$  aumentó

solamente su expresión frente a COVID en dos de las tres poblaciones en las que lo hacía en los controles (CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), mientras que vio reducida su expresión frente a Influenza debido a que estimula sólo y en menor medida a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. IL-4 también aumentó su expresión en las poblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en respuesta a estímulos de COVID, pero no de Influenza. Con IL-10 la expresión es similar: aumentó su expresión con CD3CD28 de todas las poblaciones y con COVID en CD8<sup>+</sup>.

Partiendo de estos resultados, en la Tabla 7 se muestra un análisis más detallado de todas las poblaciones de linfocitos T estudiadas, centrándonos en la respuesta que se establece a estímulos de COVID, referido siempre al cultivo basal. Como se puede apreciar, todas las poblaciones mostraron un aumento de su expresión en al menos uno de los marcadores de agotamiento en respuesta a estímulos de COVID; activándose a su vez los linfocitos T CD4 Effector memory. Al igual que en la población control, los linfocitos T establecieron un perfil mixto de respuesta inmune Th1 y Th2, aumentándose incluso la producción de IL-10 por parte de diversas sub-poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

**Tabla 7.** P-valores obtenidos para la expresión de los marcadores en las 11 poblaciones de pacientes Long COVID mediante ANOVA de una vía comparando los resultados de estimulación por COVID con los de estado basal donde ns indica no significativo, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. La flecha ↑ indica que el sentido del cambio es en aumento para la condición de estimulación frente a la basal.

POBLACIONES	MARCADORES							
	LAG-3	TIM-3	CTLA-4	PD-1	CD69	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
CD4 <sup>+</sup>	↑ ****	↑ ****	↑ ****	↑ **	ns	↑ *	↑ **	ns
CD4 naive	↑ ****	↑ ****	↑ ****	↑ ***	ns	↑ *	↑ ***	ns
CD4 Effector memory	↑ *	ns	ns	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	ns
CD4 Central memory	↑ ****	↑ ****	↑ ****	↑ **	ns	↑ *	↑ **	ns
CD8 <sup>+</sup>	↑ ****	↑ ****	↑ **	↑ ***	ns	ns	↑ **	↑ **
CD8 naive	↑ ***	↑ ***	↑ **	↑ ***	ns	↑ *	↑ **	↑ *
CD8 Effector memory	↑ *	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑ *
CD8 Central memory	↑ ****	↑ ****	↑ ****	↑ **	ns	ns	↑ ***	ns
CD8 Terminal effector	ns	↑ *	ns	ns	ns	ns	ns	↑ *
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	↑ ****	↑ ****	↑ ****	↑ ****	ns	↑ *	ns	ns
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	↑ ***	↑ ****	↑ ***	↑ **	ns	ns	↑ ****	ns

#### 5.4. Análisis de los ratios.

En base a los resultados previamente observados, estos sugieren que los linfocitos T de los pacientes con y sin Long COVID adquieren un fenotipo exhausto con un perfil de citocinas mixto en respuesta a la estimulación con

antígenos de la proteína S del COVID. Sin embargo, se desconoce si existen diferencias en la magnitud de la respuesta que se establece frente a dicho estímulo. Por tanto, se decidió analizar, para cada cohorte, la magnitud de la respuesta que se establecía para cada estímulo frente al cultivo basal y compararlos entre sí.

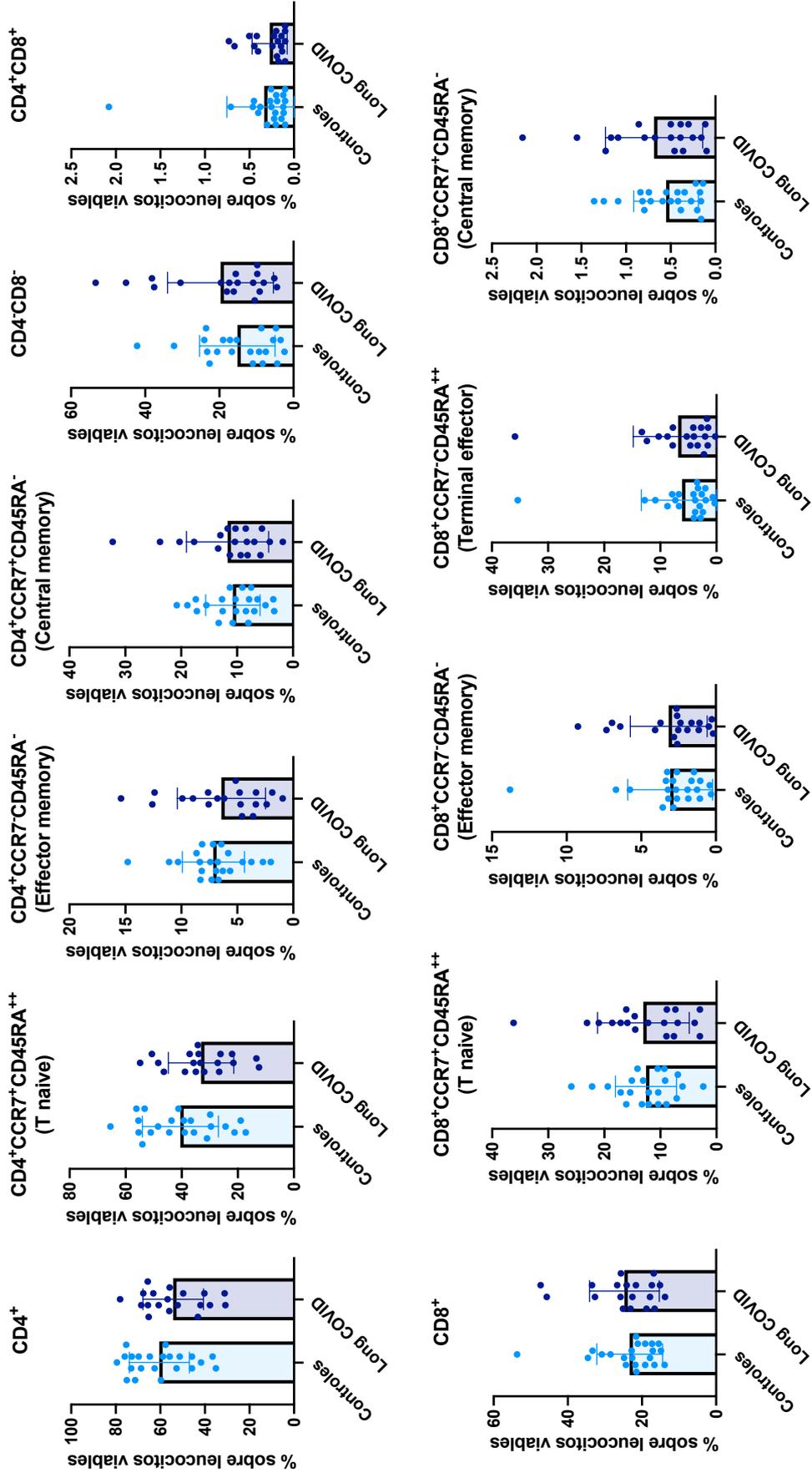
Como se muestra en la Figura 8, no existen diferencias en el nivel de magnitud de la respuesta que se estableció entre las principales poblaciones de cada cohorte en respuesta tanto a un estímulo poli-clonal inespecífico como específico.

De igual forma, al realizar un análisis pormenorizado de la respuesta de cada población al estímulo con péptidos de SARS-CoV-2 (Tabla 8), tampoco se encontraron diferencias en la magnitud de la respuesta entre ambas cohortes. Se confirma así la ausencia no sólo de diferencias fenotípicas, sino también funcionales entre ambas cohortes.

**Tabla 8.** P-valores obtenidos para los ratios de expresión de los marcadores en las 11 poblaciones de linfocitos T de pacientes control y Long COVID mediante ANOVA de dos vías comparando los resultados de estimulación por COVID con los de estado basal donde ns indica no significativo, Se consideró estadísticamente significativo un p-valor<0,05.

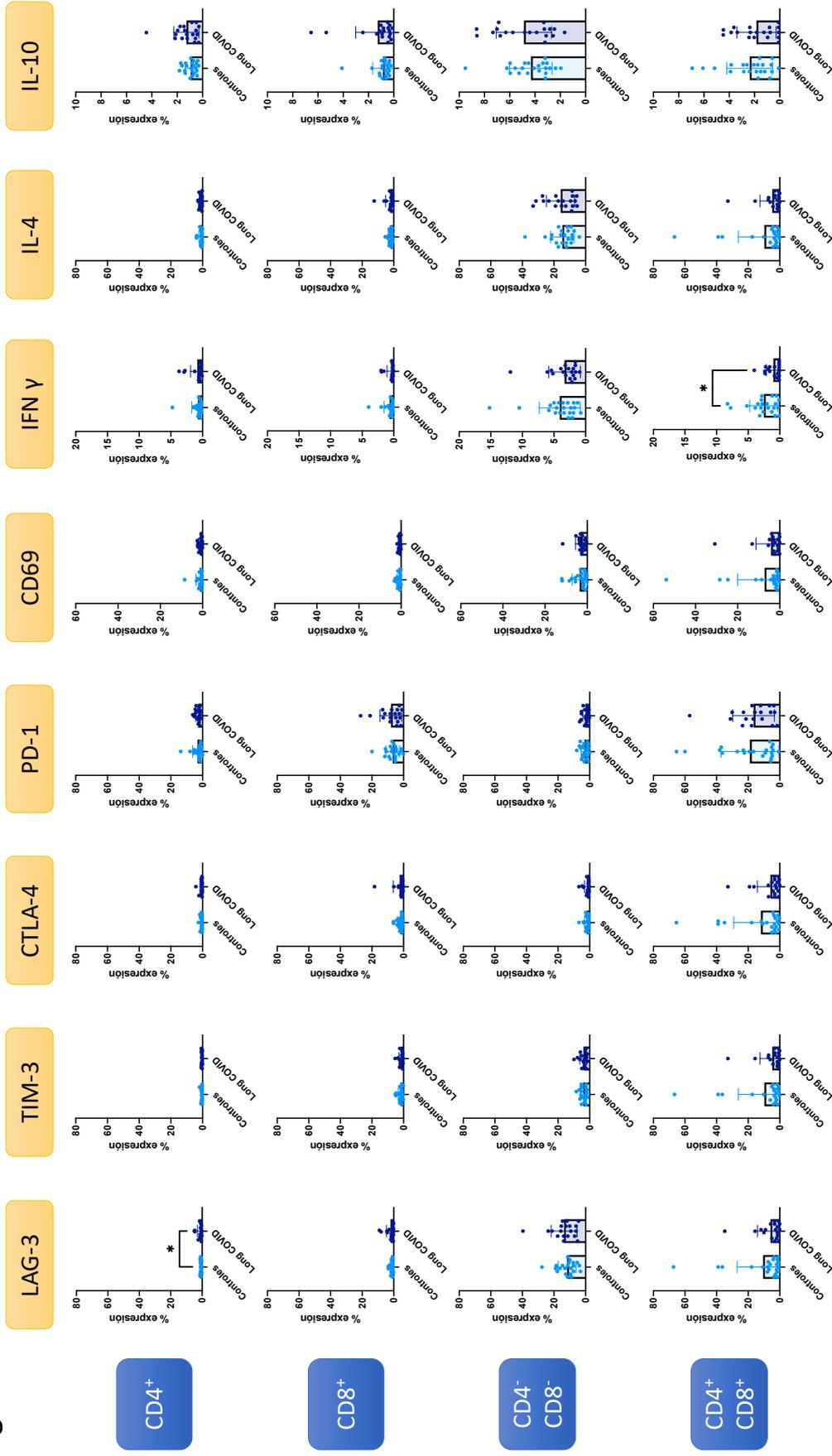
POBLACIONES	MARCADORES							
	LAG-3	TIM-3	CTLA-4	PD-1	CD69	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
CD4 <sup>+</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4 naive	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4 Effector memory	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4 Central memory	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8 <sup>+</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8 naive	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8 Effector memory	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8 Central memory	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8 Terminal effector	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Figura 3**



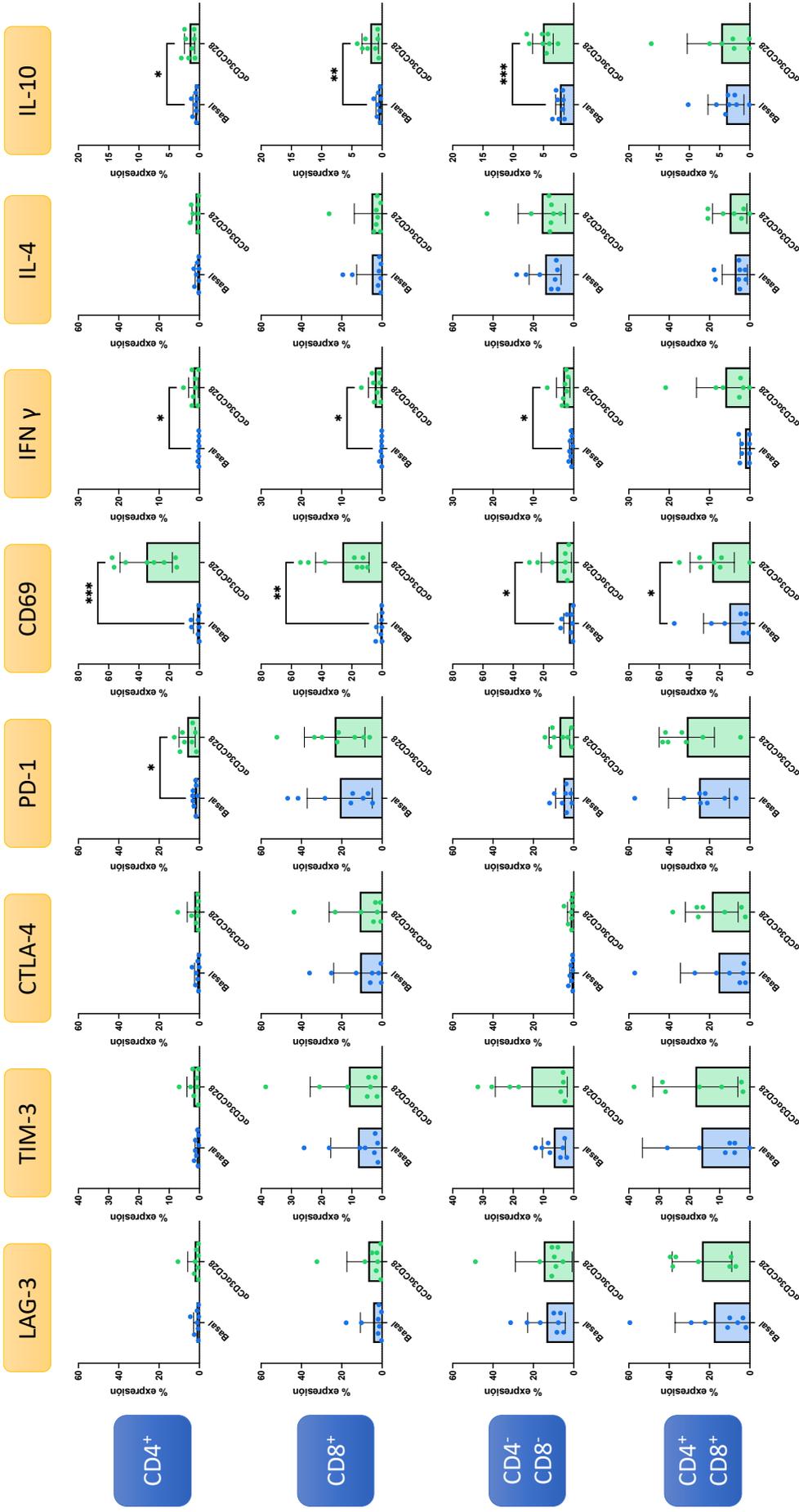
**Figura 3. Porcentaje de cada sub-población circulante de linfocitos T en pacientes con y sin Long COVID.** Proporción de cada una de las 11 poblaciones de linfocitos T de muestras procedentes de pacientes control y pacientes Long COVID en condiciones basales. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un t-Test clásico. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05.

**Figura 4**



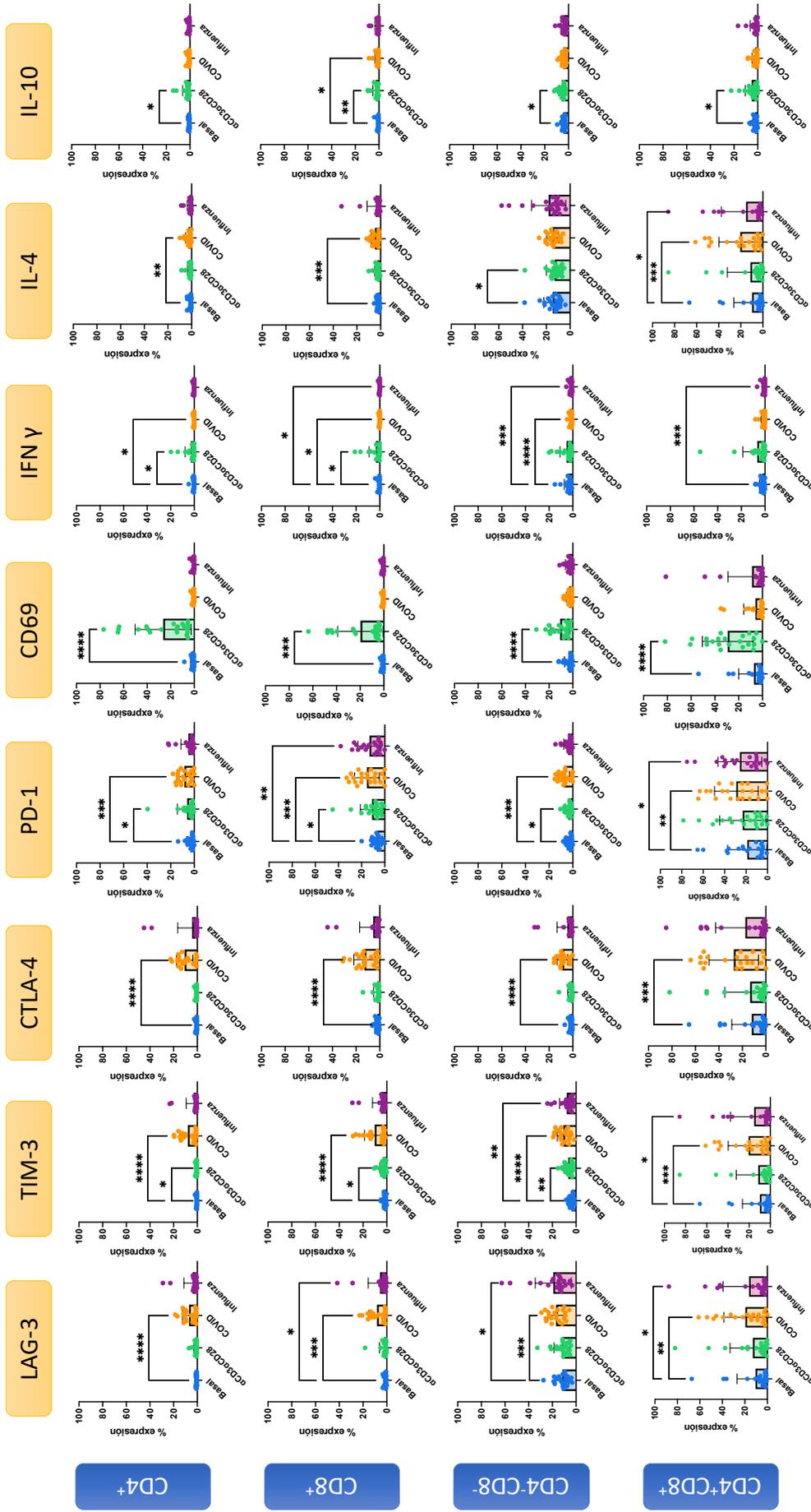
**Figura 4. Fenotipo de los linfocitos T circulantes en pacientes con y sin Long COVID.** Niveles de expresión de los marcadores de agotamiento (LAG-3, TIM-3, CTLA-4 y PD-1), activación (CD69) y producción de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, en condiciones basales, en control y pacientes Long COVID en condiciones basales. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un t-Test clásico. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05.

**Figura 5**



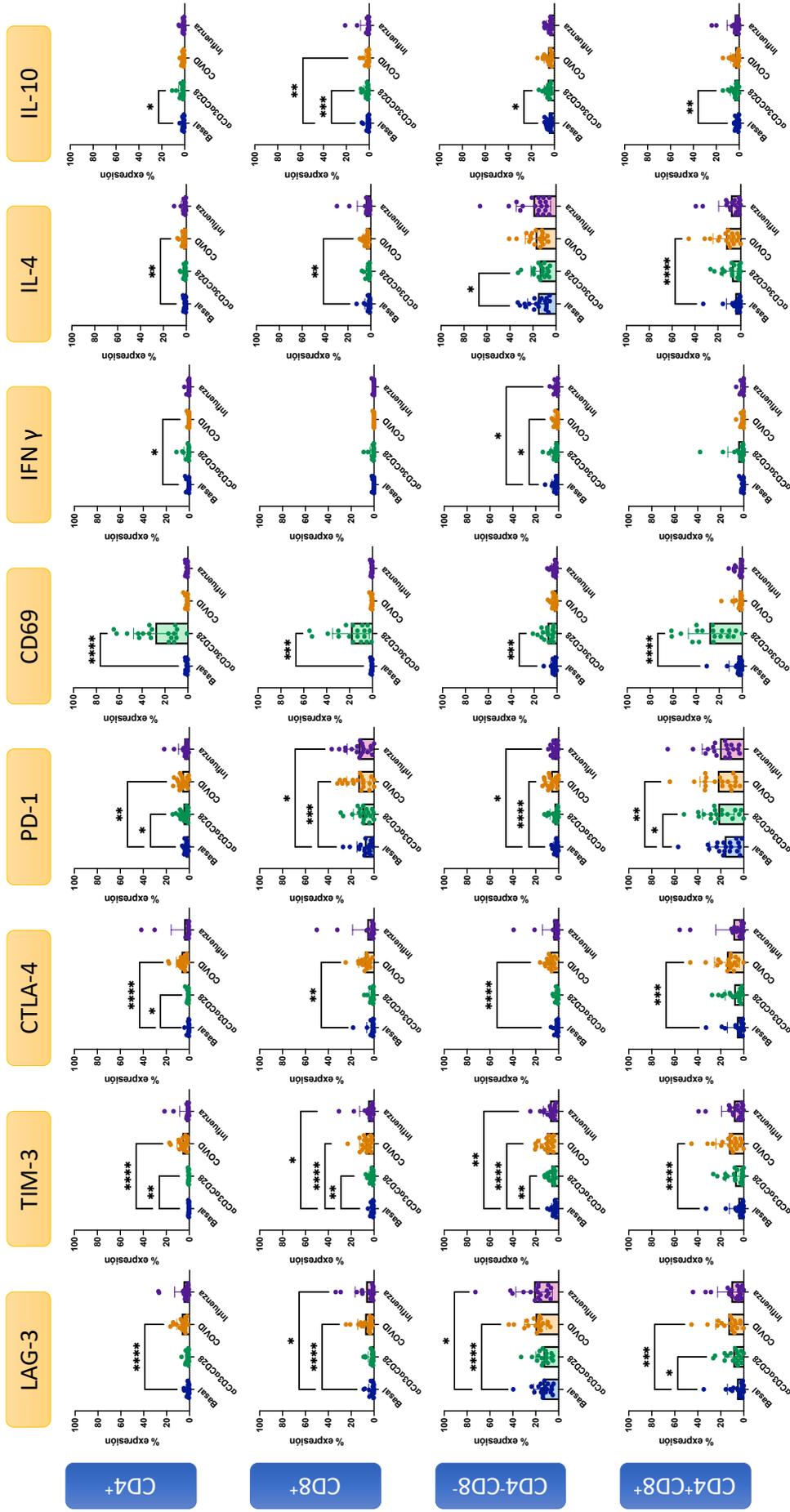
**Figura 5. Optimización del cultivo y puesta a punto del panel de citometría.** Niveles de expresión de los marcadores de agotamiento (LAG-3, TIM-3, CTLA-4 y PD-1), activación (CD69) y producción de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> de muestras procedentes de donantes sanos en condiciones basales y tras un estímulo policlonal (anti-CD3/CD28). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la realización t-Test pareado. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

**Figura 6**



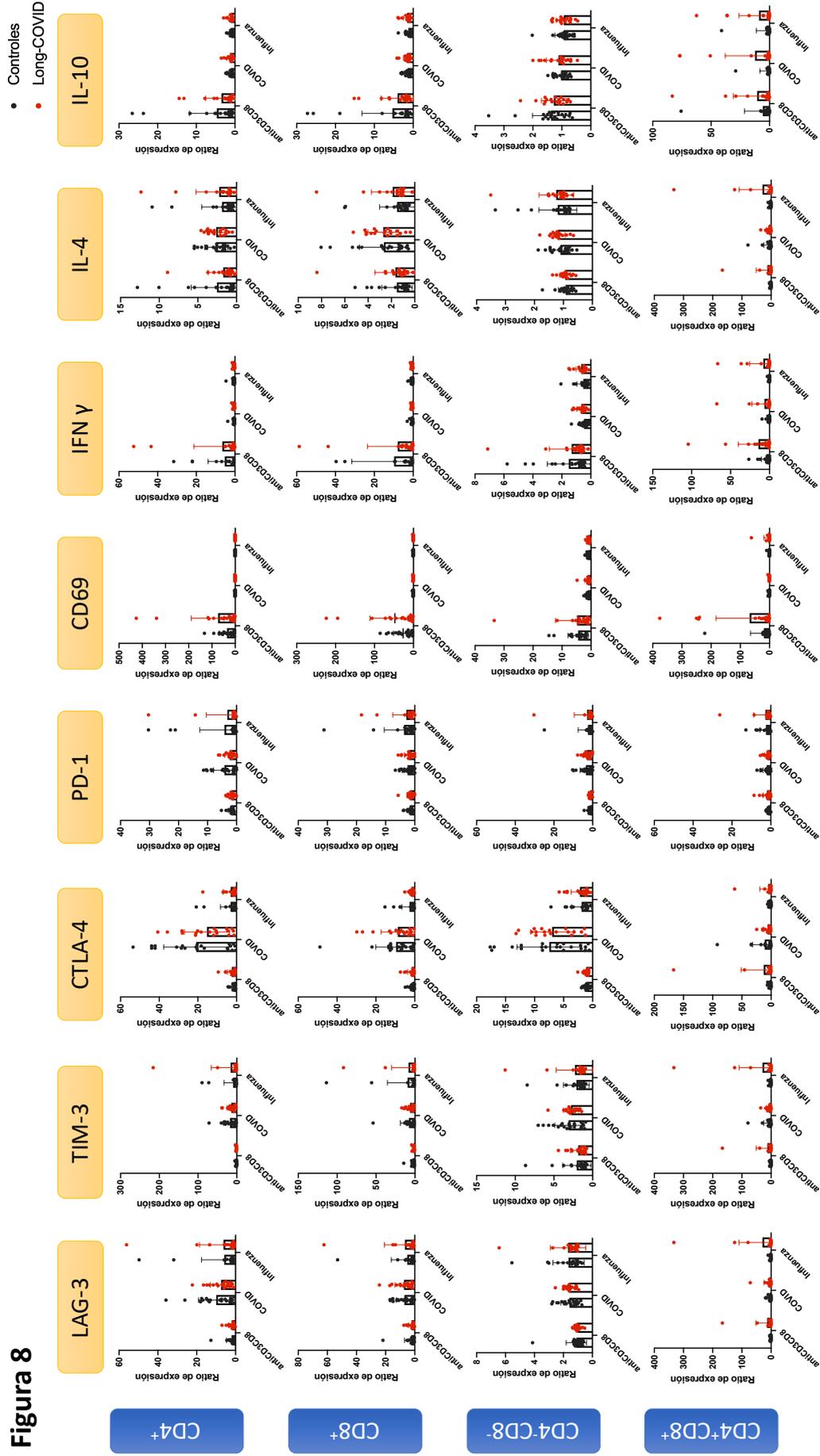
**Figura 6. Estimulación de linfocitos T en pacientes control.** Niveles de expresión de los marcadores de agotamiento (LAG-3, TIM-3, CTLA-4 y PD-1), activación (CD69) y producción de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> de muestras procedentes de pacientes control en condiciones basales, así como tras se estimularon de forma policlonal (anti-CD3/CD28) o bien con antígenos de COVID o Influenza. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la realización de un ANOVA pareado de una vía realizando comparaciones frente al cultivo basal. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

**Figura 7**



**Figura 7. Estimulación de linfocitos T en pacientes Long COVID.** Niveles de expresión de los marcadores de agotamiento (LAG-3, TIM-3, CTLA-4 y PD-1), activación (CD69) y producción de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> de muestras procedentes de pacientes long COVID en condiciones basales, así como tras se estimularon de forma policlonal (anti-CD3/CD28) o bien con antígenos de COVID o Influenza. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la realización de un ANOVA pareado de una vía realizando comparaciones frente al cultivo basal. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

**Figura 8**



**Figura 8. Comparación de los niveles de activación de los linfocitos T en pacientes control y pacientes Long COVID.** Ratio de expresión (referido al cultivo basal) de los marcadores de agotamiento (LAG-3, TIM-3, CTLA-4 y PD-1), activación (CD69) y producción de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> de muestras procedentes de pacientes control y pacientes Long COVID en respuesta a un estímulo policlonal (anti-CD3/CD28) o bien con antígenos de COVID o Influenza. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la realización de un ANOVA de dos vías para cada condición. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

## 6. DISCUSIÓN

Para la realización de este trabajo se ha partido de estudios previos<sup>(22)</sup> realizados en nuestro grupo de investigación donde se concluía que no existen diferencias entre los niveles circulantes de las diferentes poblaciones del sistema inmune entre pacientes COVID y Long COVID, hecho que se ha confirmado durante la realización del presente trabajo centrado específicamente en linfocitos T.

Además, estos estudios sugerían la existencia de pérdidas de memoria humoral y celular en pacientes con Long COVID frente a aquellos post-COVID, pero no Long COVID. Sin embargo, se ha demostrado que la memoria celular se mantiene en los pacientes COVID tras 20 meses de la exposición al antígeno S del SARS-CoV-2, constituyendo así una respuesta inmune de larga duración frente a esta enfermedad<sup>(28)</sup>. Por tanto, las observaciones realizadas podrían explicarse como resultado del agotamiento que sufren los linfocitos T en los pacientes con Long COVID debido a la estimulación viral de forma persistente que sufren estas células. Como consecuencia, estas perderían progresivamente su potencial efector y es probable que las poblaciones de células T se pierdan con el tiempo o, como se intuye en este caso, entren en un estado disfuncional permanente que disminuya su respuesta antiviral<sup>(29)</sup>.

Para la validación de estos resultados, se estudió la respuesta de los linfocitos T tanto a estímulos monoclonales de COVID e Influenza, como a estímulos policlonales en respuesta a anti-CD3/CD28. Se observó que todos los linfocitos se activaron al verse aumentada la expresión de CD69 en respuesta a un estímulo policlonal. Este ensayo sirvió de confirmación del correcto funcionamiento del modelo propuesto.

Sin embargo, para nuestra sorpresa, tanto en pacientes control como en Long COVID, los linfocitos T no sólo no se activan frente a estímulos con virus respiratorios, sino que los niveles de agotamiento se ven aumentados en respuesta a COVID y en menor medida a Influenza, no encontrándose diferencias entre cohortes.

En estudios actuales se han encontrado diferencias en las respuestas frente a infecciones respiratorias humanas. En el caso de una infección típica de gripe, la sintomatología y la replicación viral se resuelven durante la primera semana, momento en el que la activación inmune de las células alcanza su nivel máximo. Sin embargo, en infecciones por SARS-CoV-2, estos tiempos se alargan y se mantiene la activación del sistema inmune tras el aclaramiento viral, distinguiéndose así de otras infecciones respiratorias por la presencia a largo plazo de los antígenos virales, el agotamiento de las células T y el mayor riesgo de infecciones secundarias<sup>(24)</sup>. Esto es consistente con los resultados significativamente mayores obtenidos en los marcadores de agotamiento con COVID respecto a Influenza.

En resumen, no se encontraron diferencias en los niveles circulantes, fenotipo y función de los linfocitos T entre pacientes control y Long COVID, hecho que desarma nuestra hipótesis de partida.

El hallazgo más relevante es que no existen diferencias entre cohortes puesto que tanto los pacientes control como los Long COVID expresan niveles aumentados de los marcadores de agotamiento. Esto pone de manifiesto la naturaleza persistente de los cambios producidos por COVID-19 en el sistema inmune adaptativo<sup>(24)</sup>, hecho por el cual, presumiblemente no se han encontrado diferencias entre cohortes.

Por el momento, desconocemos el significado biológico de este hecho, abriendo así tres futuros escenarios para la experimentación todos ellos basados en la proteína S, reconocida como inmunodominante tras la infección por SARS-CoV-2 puesto que se ha demostrado que las respuestas celulares específicas a ella estaban presentes en >80% de la población estudiada 6 meses después de la infección leve a moderada<sup>(30)</sup>.

- El primero de ellos consistiría en aplicar el panel de agotamiento tras la estimulación de linfocitos T procedentes de muestras pre-pandémicas para comprobar si el aumento en los niveles de agotamiento es derivado de un fenómeno de memoria (presente en pacientes con y sin Long COVID) o si, por el contrario, es un efecto innato de los péptidos S en todos los individuos.
- El segundo, implicaría la obtención de muestras de población general del Centro de Hemoterapia y Hemodonación con el objetivo de repetir estos ensayos en una cohorte externa para confirmar que existe agotamiento en respuesta a la proteína S en la población general.
- El tercer y último abordaje, se basaría en identificar cuáles son los epítomos de la proteína S que están realizando esa función puesto que actualmente se desconoce el o los epítomo(s) que median el agotamiento. Para ello, se repetirían los experimentos con péptidos más restringidos de forma que se puedan identificar la(s) región(es) que están mediando este efecto, y posteriormente comparar con la tasa de evolución/mutación del virus.

## 7. CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto un modelo de cultivo y se ha optimizado un protocolo para la estimulación ex-vivo de los linfocitos T.
- Se ha comprobado que no existen diferencias significativas en el fenotipo, función y niveles circulantes de las diversas poblaciones de linfocitos T entre controles y pacientes que han desarrollado Long COVID.
- Los linfocitos T de los pacientes con y sin Long COVID muestran activación en condiciones de estimulación con anti-CD3/CD28.
- Los linfocitos T de los pacientes con y sin Long COVID muestran niveles similares de agotamiento tras ser activados con estímulos de COVID.
- El nivel de agotamiento de los linfocitos T en ambas cohortes es mayor frente a estímulos de COVID que de Influenza.
- Se hace patente la necesidad de futuros estudios que permitan confirmar, definir el origen y caracterizar el mecanismo por el que sucede este agotamiento.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Eastin C, Eastin T. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China: Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. *N Engl J Med*. 2020 Feb 28 [Online ahead of print] DOI: 10.1056/NEJMoa2002032. *J Emerg Med*. 2020 Apr;58(4):711–2. doi: 10.1016/j.jemermed.2020.04.004. Epub 2020 Jun 3. PMID: PMC7266766.
2. Abdelrahman MM, Abd-Elrahman NM, Bakheet TM. Persistence of symptoms after improvement of acute COVID19 infection, a longitudinal study. *J Med Virol*. 2021 Oct;93(10):5942-5946. doi: 10.1002/jmv.27156. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34171139; PMID: PMC8426945.
3. Michelen M, Manoharan L, Elkheir N, Cheng V, Dagens A, Hastie C, O'Hara M, Suett J, Dahmash D, Bugaeva P, Rigby I, Munblit D, Harriss E, Burls A, Foote C, Scott J, Carson G, Olliaro P, Sigfrid L, Stavropoulou C. Characterising long COVID: a living systematic review. *BMJ Glob Health*. 2021 Sep;6(9):e005427. doi: 10.1136/bmjgh-2021-005427. PMID: 34580069; PMID: PMC8478580.
4. Zheng C, Shao W, Chen X, Zhang B, Wang G, Zhang W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2022 Jan;114:252-260. doi: 10.1016/j.ijid.2021.11.009. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34800687; PMID: PMC8595975.
5. Filippini F, Giacomelli M, Bazzani C, Fredi M, Semeraro P, Tomasi C, Franceschini F, Caruso A, Cavazzana I, Giagulli C. Efficacy of COVID-19 mRNA vaccination in patients with autoimmune disorders: humoral and cellular immune response. *BMC Med*. 2023 Jun 14;21(1):210. doi: 10.1186/s12916-023-02868-w. PMID: 37316832; PMID: PMC10266318.
6. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) - China, 2020. *China CDC Wkly*. 2020 Feb 21;2(8):113-122. PMID: 34594836; PMID: PMC8392929.
7. Callard F, Perego E. How and why patients made Long Covid. *Soc Sci Med*. 2021 Jan;268:113426. doi: 10.1016/j.socscimed.2020.113426. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33199035; PMID: PMC7539940.
8. Soriano JB, Murthy S, Marshall JC, Relan P, Diaz JV; WHO Clinical Case Definition Working Group on Post-COVID-19 Condition. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis*. 2022 Apr;22(4):e102-e107. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00703-9. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34951953; PMID: PMC8691845.
9. Rosales-Castillo A, García de Los Ríos C, Mediavilla García JD. Persistent symptoms after acute COVID-19 infection: importance of follow-up. *Med Clin (Engl Ed)*. 2021 Jan 10;156(1):35-36. doi: 10.1016/j.medcle.2020.08.003. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33521308; PMID: PMC7833449.
10. Shanbehzadeh S, Tavahomi M, Zanjari N, Ebrahimi-Takamjani I, Amiri-Arimi S. Physical and mental health complications post-COVID-19: Scoping review. *J Psychosom Res*. 2021 Aug;147:110525. doi: 10.1016/j.jpsychores.2021.110525. Epub 2021 May 20. PMID: 34051516; PMID: PMC8133797.
11. Han Q, Zheng B, Daines L, Sheikh A. Long-Term Sequelae of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of One-Year Follow-Up Studies on Post-COVID Symptoms. *Pathogens*. 2022 Feb 19;11(2):269. doi: 10.3390/pathogens11020269. PMID: 35215212; PMID: PMC8875269.
12. Roe K. A role for T-cell exhaustion in Long COVID-19 and severe outcomes for several categories of COVID-19 patients. *J Neurosci Res*. 2021 Oct;99(10):2367-2376. doi: 10.1002/jnr.24917. Epub 2021 Jul 19. PMID: 34288064; PMID: PMC8427009.
13. Byambasuren O, Stehlik P, Clark J, Alcorn K, Glasziou P. Effect of covid-19 vaccination on long covid: systematic review. *BMJ Med*. 2023 Feb 1;2(1):e000385. doi: 10.1136/bmjmed-2022-000385. PMID: 36936268; PMID: PMC9978692.

14. Notarte KI, Catahay JA, Velasco JV, Pastrana A, Ver AT, Pangilinan FC, Peligro PJ, Casimiro M, Guerrero JJ, Gellaco MML, Lippi G, Henry BM, Fernández-de-Las-Peñas C. Impact of COVID-19 vaccination on the risk of developing long-COVID and on existing long-COVID symptoms: A systematic review. *EClinicalMedicine*. 2022 Aug 27;53:101624. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101624. PMID: 36051247; PMCID: PMC9417563.
15. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Mar;21(3):133-146. doi: 10.1038/s41579-022-00846-2. Epub 2023 Jan 13. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2023 Jun;21(6):408. PMID: 36639608; PMCID: PMC9839201.
16. Tran VT, Perrodeau E, Saldanha J, Pane I, Ravaud P. Efficacy of first dose of covid-19 vaccine versus no vaccination on symptoms of patients with long covid: target trial emulation based on ComPaRe e-cohort. *BMJ Med*. 2023 Feb 1;2(1):e000229. doi: 10.1136/bmjmed-2022-000229. PMID: 36910458; PMCID: PMC9978748.
17. Bowe B, Xie Y, Al-Aly Z. Acute and postacute sequelae associated with SARS-CoV-2 reinfection. *Nat Med*. 2022 Nov;28(11):2398-2405. doi: 10.1038/s41591-022-02051-3. Epub 2022 Nov 10. PMID: 36357676; PMCID: PMC9671810.
18. López-Sampalo A, Bernal-López MR, Gómez-Huelgas R. Persistent COVID-19 syndrome. A narrative review. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2022 Apr;222(4):241-250. doi: 10.1016/j.rceng.2021.10.001. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35260380; PMCID: PMC8882405.
19. Wang EY, Mao T, Klein J, Dai Y, Huck JD, Liu F, Zheng NS, Zhou T, Israelow B, Wong P, Lucas C, Silva J, Oh JE, Song E, Perotti ES, Fischer S, Campbell M, Fournier JB, Wyllie AL, Vogels CBF, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Watkins AE; Yale IMPACT Team; Cruz CD, Farhadian SF, Schulz WL, Grubaugh ND, Ko AI, Iwasaki A, Ring AM. Diverse Functional Autoantibodies in Patients with COVID-19. *medRxiv [Preprint]*. 2021 Feb 1:2020.12.10.20247205. doi: 10.1101/2020.12.10.20247205. Update in: *Nature*. 2021 Jul;595(7866):283-288. PMID: 33330894; PMCID: PMC7743105.
20. Nagata N, Takeuchi T, Masuoka H, Aoki R, Ishikane M, Iwamoto N, Sugiyama M, Suda W, Nakanishi Y, Terada-Hirashima J, Kimura M, Nishijima T, Inooka H, Miyoshi-Akiyama T, Kojima Y, Shimokawa C, Hisaeda H, Zhang F, Yeoh YK, Ng SC, Uemura N, Itoi T, Mizokami M, Kawai T, Sugiyama H, Ohmagari N, Ohno H. Human Gut Microbiota and Its Metabolites Impact Immune Responses in COVID-19 and Its Complications. *Gastroenterology*. 2023 Feb;164(2):272-288. doi: 10.1053/j.gastro.2022.09.024. Epub 2022 Sep 23. PMID: 36155191; PMCID: PMC9499989.
21. Zhang D, Zhou Y, Ma Y, Chen P, Tang J, Yang B, Li H, Liang M, Xue Y, Liu Y, Zhang J, Wang X. Gut Microbiota Dysbiosis Correlates With Long COVID-19 at One-Year After Discharge. *J Korean Med Sci*. 2023 Apr 17;38(15):e120. doi: 10.3346/jkms.2023.38.e120. PMID: 37069814; PMCID: PMC10111044.
22. Perez-Mazzali Marina. Caracterización del síndrome COVID persistente: estudio del inmunoma por citometría espectral y evaluación de la memoria inmunológica. 2022.
23. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug;15(8):486-99. doi: 10.1038/nri3862. PMID: 26205583; PMCID: PMC4889009.
24. Mudd PA, Remy KE. Prolonged adaptive immune activation in COVID-19: implications for maintenance of long-term immunity? *J Clin Invest*. 2021 Jan 4;131(1):e143928. doi: 10.1172/JCI143928. PMID: 33104057; PMCID: PMC7773393.
25. Luo J, Zhang Z, Zhao S, Gao R. A Comparison of Etiology, Pathogenesis, Vaccinal and Antiviral Drug Development between Influenza and COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 28;24(7):6369. doi: 10.3390/ijms24076369. PMID: 37047339; PMCID: PMC10094131.

26. Sette A, Sidney J, Crotty S. T Cell Responses to SARS-CoV-2 Annual Rev Immunol. 2023 41:1, 343-373. Doi: 10.1146/annurev-immunol-101721-061120.
27. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, Rawlings SA, Sutherland A, Premkumar L, Jadi RS, Marrama D, de Silva AM, Frazier A, Carlin AF, Greenbaum JA, Peters B, Krammer F, Smith DM, Crotty S, Sette A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. Cell. 2020 Jun 25;181(7):1489-1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015. Epub 2020 May 20. PMID: 32473127; PMCID: PMC7237901.
28. Primorac D, Brlek P, Matišić V, Molnar V, Vrdoljak K, Zadro R, Parčina M. Inmunidad celular: la clave para la protección a largo plazo en personas recuperadas del SARS-CoV-2 y después de la vacunación. Vacunas (Basel). 2022 14 de marzo;10(3):442. doi: 10.3390/vacunas10030442. PMID: 35335076; PMCID: PMC8953558.
29. Jarjour NN, Masopust D, Jameson SC. T Cell Memory: Understanding COVID-19. Immunity. 2021 Jan 12;54(1):14-18. doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.009. Epub 2020 Dec 19. PMID: 33406391; PMCID: PMC7749639.
30. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, Aiano F, Amin-Chowdhury Z, Hoschler K, Brooks T, Taylor S, Hewson J, Hallis B, Stapley L, Borrow R, Linley E, Ahmad S, Parker B, Horsley A, Amirthalingam G, Brown K, Ramsay ME, Ladhani S, Moss P. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. Nat Immunol. 2021 May;22(5):620-626. doi: 10.1038/s41590-021-00902-8. Epub 2021 Mar 5. Erratum in: Nat Immunol. 2021 Jul;22(7):928. PMID: 33674800; PMCID: PMC7610739.