



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ANTI-SARS-CoV-2 EN PACIENTES COVID-19 CHILENOS LEVES Y SEVEROS

POR ROMINA ANDREA QUIROGA SANZANA

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dra. Estefanía Nova-Lamperti
Laboratorio de Inmunología Molecular y Traslacional
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2022, Romina Andrea Quiroga Sanzana

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Estefanía Nova Lamperti, quien con su vocación, conocimientos y paciencia me ha guiado por este camino para lograr alcanzar los resultados que buscaba. A la Universidad de Concepción y al laboratorio clínico Prevegen, por recibirme y brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación y, también, a cada uno de los docentes por aportar en mi formación académica y profesional.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis compañeros, a mis hermanos y sobre todo a mis padres, por ser un pilar fundamental en mi vida, apoyarme cuando mis ánimos decaían y facilitar todos estos años de formación.

Muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDOS

1. AGRADECIMIENTOS	iii
2. ÍNDICE DE TABLAS	vii
3. ÍNDICE DE FIGURAS	viii
4. RESUMEN.....	xi
5. ABSTRACT	xiii
6. INTRODUCCIÓN.....	15
6.1 COVID-19 y su impacto en la población mundial	15
6.2 SARS-CoV-2	16
6.3 Dinámica de la producción de anticuerpos durante la infección.....	19
6.4 Diferencias en la producción de anticuerpos IgG según la especificidad del antígeno y la severidad	22
6.5 Producción de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2	30
6.6 Rol de las células B en la respuesta inmune humoral	37
6.7 Células B específicas contra SARS-CoV-2	40
6.8 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	43
6.9 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	43
6.10 HIPÓTESIS	44
6.11 OBJETIVO GENERAL	45
6.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45

7. MATERIALES Y MÉTODOS	46
7.1 Diseño del estudio.....	46
7.2 Definición de la población de estudio.....	46
7.3 Obtención de muestras de suero	47
7.4 Determinación de los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2.....	48
7.5 Determinación de los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2.....	51
7.6 Determinación del porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2.....	53
7.6.1 Tratamiento de las muestras	53
7.6.2 Uso del kit de análisis de células B anti-SARS-CoV-2.....	54
7.7 Asociación de los niveles de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y el porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 con la severidad de la enfermedad COVID-19	58
8. RESULTADOS.....	60
8.1 Características de la cohorte en estudio	60
8.2 Niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 a los 6 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.....	62
8.3 Niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 a los 12 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.....	73
8.4 Niveles de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 a los 12 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.....	85

8.5 Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 a los 6 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.....	92
9. DISCUSIÓN.....	109
10. GLOSARIO	123
11. BIBLIOGRAFÍA.....	125
12. ANEXOS	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Volúmenes en utilizados para la formación de los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770.	55
Tabla 2: Detalle de los anticuerpos y fluoróforos utilizados para el marcaje de células B RBD específicas y su medición mediante de citometría de flujo..	56
Tabla 3: Características de los pacientes COVID-19 seleccionados para el estudio	61
Tabla 4: Detalle del esquema de vacunación alcanzado a los 12 meses post infección.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquematización de la estructura del virus SARS-CoV-2 y su interacción con la célula huésped.....	18
Figura 2: Dinámica de la producción de anticuerpos IgM e IgG días luego del comienzo de los síntomas.	21
Figura 3: Cinética de la producción de anticuerpos IgG específicos contra la proteína N y S en pacientes críticos y no críticos.	24
Figura 4: Perfiles de anticuerpos IgG anti-N y anti-S-RBD en pacientes leves y severos.	28
Figura 5: Funciones efectoras de los anticuerpos.	31
Figura 6: Los anticuerpos neutralizantes impiden la unión del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 con el receptor ACE2.	33
Figura 7: Comparación de la capacidad de neutralización (ID50) de los individuos de gravedad 0-3 o 4-5.	36
Figura 8: Proceso de diferenciación de las células B hasta células plasmáticas o B de memoria mediante la activación del linfocito T CD4+.	39
Figura 9: Dinámica de las células B de memoria anti-SARS-CoV-2 a los meses 1, 3, 5 y 7 post infección.....	41
Figura 10: Dinámica de la respuesta humoral anti-SARS-CoV-2 a los 1.3 y 6.2 meses luego de la infección.	42
Figura 11: Esquematización de la metodología CLIA.....	50
Figura 12: Esquematización del Inmunoensayo de quimioluminiscencia competitivo para la detección de NAbs.	52
Figura 13: Los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770 reconocen a la célula B RBD específica.	57
Figura 14: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes severos, moderados y leves.	64

Figura 15: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.	67
Figura 16: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelados.	70
Figura 17: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes con MG normal o alterado pre o post COVID-19.	72
Figura 18: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes severos, moderados y leves.	76
Figura 19: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.	79
Figura 20: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelados.	82
Figura 21: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con MG normal o alterado pre o post COVID-19.	84
Figura 22: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección la según severidad de COVID-19.	86
Figura 23: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.	87
Figura 24: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelados.	89
Figura 25: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con MG normal o alterado pre o post COVID-19.	91
Figura 26: Estrategia de gating utilizada para seleccionar la población total de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2.	93

Figura 27: Estrategia de gating utilizada para seleccionar las subpoblaciones de células B IgM+ e IgG+ RBD específicas anti-SARS-CoV-2.	96
Figura 28: Estrategia de gating para la selección de células RBD+CD27+ y RBD+CD27-.	99
Figura 29: Porcentaje de la población de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección según severidad.	101
Figura 30: Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección según secuelas pulmonares y alteraciones metabólicas pre o post COVID-19.	103
Figura 31: Correlación entre los niveles de anticuerpos IgM o IgG y el porcentaje de células B RBD específicas (CD20+RBD+) 6 meses luego de la infección.	105
Figura 32: Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección.	106
Figura 33: Subpoblaciones de células B RBD específicas anti-SARS-COV-2 a los 6 meses post infección por COVID-19.	108

RESUMEN

La investigación sobre la producción de anticuerpos durante la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) ha cobrado importancia debido a su capacidad para potenciar la eliminación viral y el desarrollo de una respuesta de memoria. Recientes publicaciones han evidenciado diferencias en la generación de anticuerpos según la severidad del cuadro infeccioso, sin embargo, el rol de estos aún no está dilucidado. El objetivo de esta investigación fue analizar la respuesta humoral anti-SARS-CoV-2 en una cohorte de 60 pacientes chilenos que cursaron COVID-19 de forma severa, moderada y leves a los 6 y 12 meses post infección. Los niveles de anticuerpos IgM, IgG y neutralizantes (NAbs) se midieron mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia (CLIA) y sus niveles fueron relacionados con secuelas pulmonares estructurales, funcionales y alteraciones del metabolismo glucídico. Además, se determinó el porcentaje de células B anti-RBD para analizar la respuesta inmune de memoria a nivel celular por citometría de flujo. Los resultados revelaron que 6 meses posterior a la infección, los pacientes con cuadros severos presentaron mayores niveles de IgG que pacientes con cuadros leves, aumento asociado a daño pulmonar estructural y metabolismo glucídico alterado previo a la infección, pero no con disfunción pulmonar. Estas diferencias no se observaron a los 12 meses en los niveles de IgG, pero sí en NAbs. Todos los pacientes presentaron células B anti-RBD, pero éstas no se relacionaron con ningún parámetro analizado. Por lo tanto, la

producción de IgG se encuentra relacionada con la severidad en pacientes chilenos, no así la diferenciación a células B anti-RBD. Los resultados demuestran que todos los pacientes generaron una respuesta humoral antígeno-específica y que la severidad del cuadro no se asocia con una falla en la capacidad de generar anticuerpos totales o neutralizantes anti-SARS-CoV-2, ni con una falla en la generación de la respuesta de memoria de linfocitos B.

ABSTRACT

Research on antibody production during Coronavirus disease 2019 (COVID-19) has gained importance due to its ability to enhance viral shedding and the development of a memory response. Recent publications show differences in the generation of antibodies according to the severity of infection, however, the role of these has not been elucidated. The aim of this research was to analyze the humoral response anti-SARS-CoV-2 in a cohort of 60 Chilean patients who had severe, moderate, and mild COVID-19, at 6 and 12 months post-infection. The levels of IgM, IgG, and neutralizing antibodies (NAbs) were measured by chemiluminescence immunoassay (CLIA), and their levels were related to structural and functional pulmonary sequelae and alterations in glucose metabolism. In addition, the percentage of RBD-specific B cells was determined to analyze the memory immune response at the cellular level by flow cytometry. The results revealed that 6 months after infection, patients with severe symptoms presented higher levels of IgG than patients with mild conditions, a increased levels of IgG were associated with structural lung damage and altered glucose metabolism as comorbidity, but not with pulmonary dysfunction. These differences were observed in NAbs levels but not in IgG 12 months post-infection. All patients presented RBD-specific B cells, but these were not related to any parameter analyzed. Therefore, the production of IgG is related with the severity in Chilean patients, but not with the differentiation to RBD-specific B cells. The

results show that all patients generated an antigen-specific humoral response, and that the severity of the infection is not associated with a failure in the ability to generate total or neutralizing anti-SARS-CoV-2 antibodies, or with a failure in the generation of the memory response of B lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

6.1 COVID-19 y su impacto en la población mundial

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una enfermedad infecciosa provocada por una nueva cepa de coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, mundialmente conocido como SARS-CoV-2. El primer caso de infección por este virus fue reportado en diciembre de 2019 en Wuhan, China y rápidamente se ha propagado por transmisión de persona a persona a lo largo de todo el mundo llegando a afectar a más de 200 países y territorios, siendo declarado pandemia en marzo de 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Día tras días, el número de casos y las muertes asociadas a esta enfermedad siguen aumentando y hasta el día 24 de enero de 2022, el SARS-CoV-2 ha registrado un total de 352.796.704 de casos confirmados y 5.600.434 muertes asociadas, según los datos publicados por la OMS (WHO, 2022).

La información obtenida hasta la fecha ha permitido clasificar la clínica de los casos en leves, severos y críticos, de acuerdo con la sintomatología presentada por los pacientes. Se ha descrito que alrededor de un 81% de los pacientes infectados exhiben síntomas que van de leves a moderados, como fiebre, tos y, en algunos casos, neumonía leve; cerca del 14% cursa con un cuadro más severo caracterizado por disnea, frecuencia respiratoria mayor a 30 respiraciones por minuto, saturación de oxígeno $\leq 93\%$, relación entre presión arterial de

oxígeno y fracción inspirada de oxígeno ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) <300 y/o infiltrado pulmonar $> 50\%$ entre 24 a 48 horas, mientras que, aproximadamente un 5% sufre una sintomatología mucho más crítica exhibiendo insuficiencia pulmonar, shock séptico, y/o fallo multiorgánico y riesgo de muerte (The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team, 2020).

En la actualidad, la tasa de mortalidad varía en cada país, y varios informes han demostrado que la edad, el padecimiento de comorbilidades, como diabetes o hipertensión, y la existencia de algún grado de deficiencia inmunológica, están asociados con un mayor riesgo de desarrollar COVID-19 severa. En el margen de esto, se ha analizado la producción de anticuerpos como uno de los mecanismos de defensa contra la COVID-19, ya que juegan un papel importante en la eliminación viral y en la generación de inmunidad a largo plazo, siendo claves tanto en el tratamiento como en la protección frente a esta infección.

6.2 SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, específicamente al género de los betacoronavirus. Estos corresponden a virus envueltos, de ARN monocatenario de sentido positivo (+ssRNA) que cuentan con cuatro proteínas estructurales (Figura 1A). La proteína espiga (S), conocida como *spike* por su nombre en inglés, media la entrada del virus a la célula huésped; la proteína de la nucleocápside (N) se encuentra involucrada en la transcripción y replicación

del ARN, y las proteínas de la membrana (M) y de la envoltura (E), son más pequeñas y necesarias para el ensamblaje viral (Siracusano et al., 2020).

El ectodominio de la proteína S se encuentra organizado en dos subunidades (Figura 1B). La subunidad S1 N-terminal que contiene el dominio de unión al receptor (RBD), capaz de acoplarse con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) ubicado en las células epiteliales alveolares humanas del tracto respiratorio y facilitar la unión a la célula diana. Esta interacción ocasiona un cambio conformacional en la subunidad S2 C-terminal de la proteína S, siendo esta la porción responsable de la fusión de la membrana viral y la célula huésped, permitiendo la entrada del virus a la célula (Chambers et al., 2020).

La proteína S es considerada altamente inmunogénica, debido a su capacidad de interactuar con el receptor ACE2 para la unión celular y también a su ubicación en la superficie de las partículas virales (Hoffmann et al., 2020; Walls et al., 2020). Por su parte, la proteína N también posee una alta actividad inmunogénica, ya que es una de las principales proteínas estructurales del virus y, además, participa en la transcripción, replicación y el empaquetamiento del genoma, por lo que se expresa abundantemente durante la infección (Che et al., 2004). Por lo tanto, la producción de anticuerpos anti-S y anti-N han sido las más estudiadas y analizadas en los pacientes infectados con COVID-19.

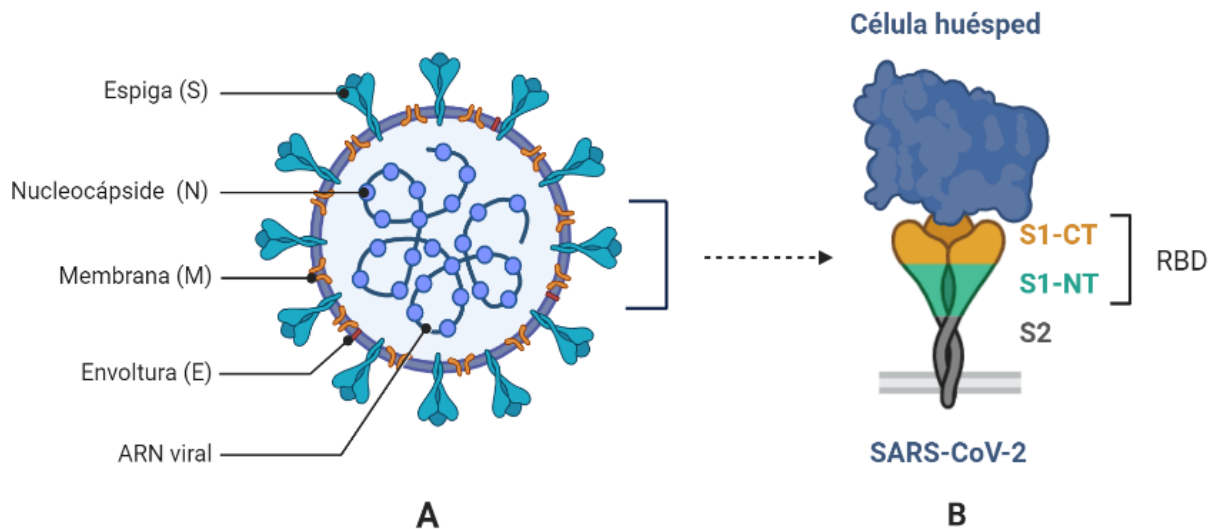


Figura 1: Esquematzación de la estructura del virus SARS-CoV-2 y su interacción con la célula huésped.

A. Esquema del SARS-CoV-2 formado por 4 proteínas estructurales: S, N, M y E. **B.** Esquema de la proteína S que detalla el dominio de unión al receptor (RBD) ubicado en la subunidad S1 y que es capaz de unirse al receptor ACE2 de las células epiteliales alveolares y mediar la entrada del virus. Figura realizada en Biorender.

6.3 Dinámica de la producción de anticuerpos durante la infección

Los primeros estudios sobre la cinética en la generación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, indicaron que la mayoría de los infectados presenta una seroconversión positiva entre los 10-15 días luego del comienzo de los síntomas. En el estudio realizado por Hou y colaboradores, se analizó la producción de anticuerpos de clase IgM e IgG frente a antígenos recombinantes de la proteína N y S del virus. Se concluyó que de un total de 338 pacientes hospitalizados en el hospital Tongji en China, clasificados en leves (64 casos), graves (119 casos) y críticos (75 casos), los niveles de IgM en la mayoría aumentaron durante la primera semana después de la infección, registrando un *peak* durante la segunda semana antes de volver al estado basal en gran parte de los pacientes. (Figura 2). Los anticuerpos IgG, por otro lado, fueron detectables después de la primera semana posterior a la infección, alcanzando su *peak* durante la tercera semana y manteniendo niveles altos durante un período prolongado, incluso durante 48 días luego del comienzo de los síntomas (Figura 2) (Hou et al., 2020). Estos resultados fueron apoyados por otro estudio en donde se analizaron un total de 342 muestras de suero de 67 pacientes en diferentes etapas de progresión de la enfermedad para detectar anticuerpos IgM e IgG específicos contra la proteína N del SARS-CoV-2 mediante ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Los pacientes fueron reclutados desde el Centro Médico de Salud Pública de Chongqing, China. Para el análisis se dividieron en 29 pacientes severos, quienes desarrollaron un cuadro de neumonía severo, y 35 pacientes

no severos que cursaron con un cuadro de neumonía leve o moderado. Los anticuerpos IgM se detectaron el día 7 después de la infección y la tasa positiva alcanzó su punto máximo el día 28 y luego disminuyó alrededor del 33,3% a los 42 días, mientras que IgG apareció el día 10 y alcanzó el máximo nivel el día 42 después del inicio de la enfermedad, permaneciendo alta. Curiosamente en este estudio, los niveles de IgM e IgG son significativamente más altos en pacientes severos en comparación a los pacientes no severos. Los autores indican que una respuesta de anticuerpos anti-N más fuerte se asocia con un *clearance* viral retrasado y mayor gravedad de la enfermedad, por lo tanto, la proteína N sería candidata para el diagnóstico temprano de la infección, debido a su alta inmunogenicidad y acumulación intracelular antes del empaquetamiento del virus (Tan et al., 2020).

Esta diferencia en la producción de anticuerpos comienza a ser un punto discrepante en las próximas investigaciones que comenzaron a publicarse. Por ejemplo, otro informe sobre la dinámica del perfil de anticuerpos en pacientes con COVID-19 mostró que la seroconversión apareció secuencialmente para anticuerpos totales IgM e IgG contra las proteínas S y N, con una mediana de tiempo de 11 y 12 días, respectivamente, y no se observaron diferencias entre pacientes críticos y no críticos (Zhao et al., 2020).

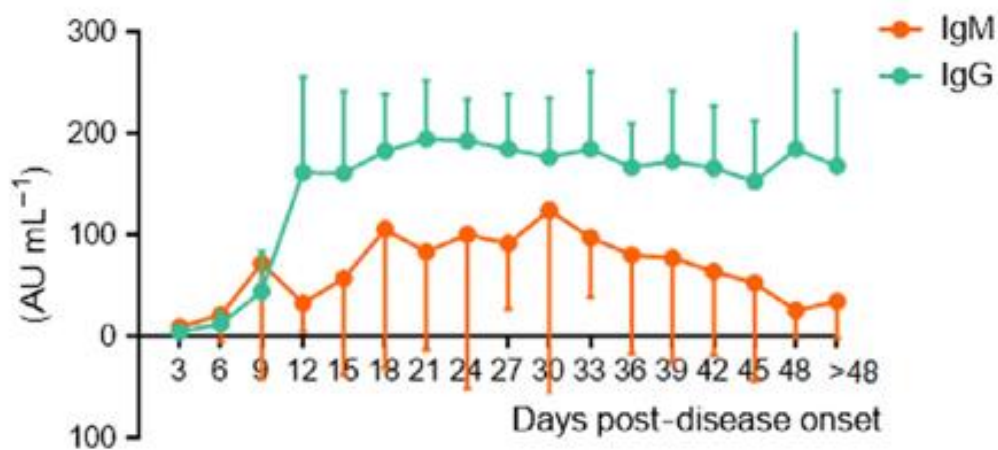


Figura 2: Dinámica de la producción de anticuerpos IgM e IgG días luego del comienzo de los síntomas.

En verde se observa la progresión para los anticuerpos IgG y en naranja para los IgM, ambos hasta el día 48 post comienzo de los síntomas. AU: Unidades arbitrarias. *Days post-disease onset*: Días luego del comienzo de la enfermedad. (Fuente: Hou et al., 2020).

6.4 Diferencias en la producción de anticuerpos IgG según la especificidad del antígeno y la severidad

La diferencia en la producción de anticuerpos contra la proteína N que comienza a presentarse en algunas publicaciones, cada vez es más recurrente y además se describen diferencias en la producción de anticuerpos IgG anti-S de acuerdo con la severidad del cuadro presentado por los pacientes.

Dentro de este contexto, uno de los estudios más interesantes es el realizado por Sun y colaboradores, en donde se colectaron 130 muestras de sangre de 38 pacientes entre 3 a 28 días después del inicio de los síntomas. Estas muestras de sangre se recolectaron de 27 pacientes no críticos, es decir, que no estuvieron internados en la UCI (Unidad de cuidados intensivos) lo que sería equivalente a pacientes leves y moderados, y de 11 pacientes críticos con sintomatología severa, internados en la UCI del Primer Hospital Afiliado de la Universidad Médica de Guangzhou en China. Los anticuerpos de unión específicos para las proteínas N y S se analizaron mediante ELISA.

Los resultados mostraron que, en la mayoría de los pacientes no críticos, la producción de anticuerpos obedecía a lo ya publicado en estudios anteriores, en donde los anticuerpos IgG anti-N y anti-S lograron sobrepasar los niveles de los IgM tras las dos semanas luego del comienzo de los síntomas, mostrándose dinámicas similares para ambos antígenos. Sin embargo, los autores describen que la dinámica observada en pacientes críticos es más irregular. Los niveles de

anticuerpos N-IgG en todos los pacientes críticos alcanzaron niveles altos dentro de las 2 semanas posteriores al inicio de los síntomas (Figura 3A) sobrepasando los niveles alcanzados para pacientes no críticos (Figura 3B). Sin embargo, los niveles de anticuerpos S-IgG en pacientes críticos (Figura 3C) parecieron aumentar lentamente en comparación con el aumento de N-IgG en estos mismos pacientes y la producción de S-IgG en pacientes no críticos (Figura 3D). Por otro lado, la producción de anticuerpos se comparó con los niveles de proteína C reactiva. La proteína C reactiva es una proteína de fase aguda que aumenta bruscamente en el plasma cuando el cuerpo está infectado o el tejido está dañado, siendo un marcador no específico de inflamación. Los hallazgos demostraron, a medida que avanzaba la enfermedad, el aumento de IgG anti-S se correlacionó positivamente con la disminución de la proteína C reactiva en pacientes no críticos, lo que no sucedió en pacientes críticos. En pocas palabras, mientras que los pacientes críticos tendían a producir mayores niveles de IgG anti-N que los pacientes no críticos, estos evidencian un cambio de clase de IgM a IgG anti-S más rápido y de niveles más altos que los pacientes críticos. Este resultado sugirió que el cambio de clase de IgM a IgG anti-S es vital para eliminar el virus y podría usarse como un indicador para predecir el resultado y el pronóstico de la enfermedad COVID-19, según proponen los autores (Sun et al., 2020).

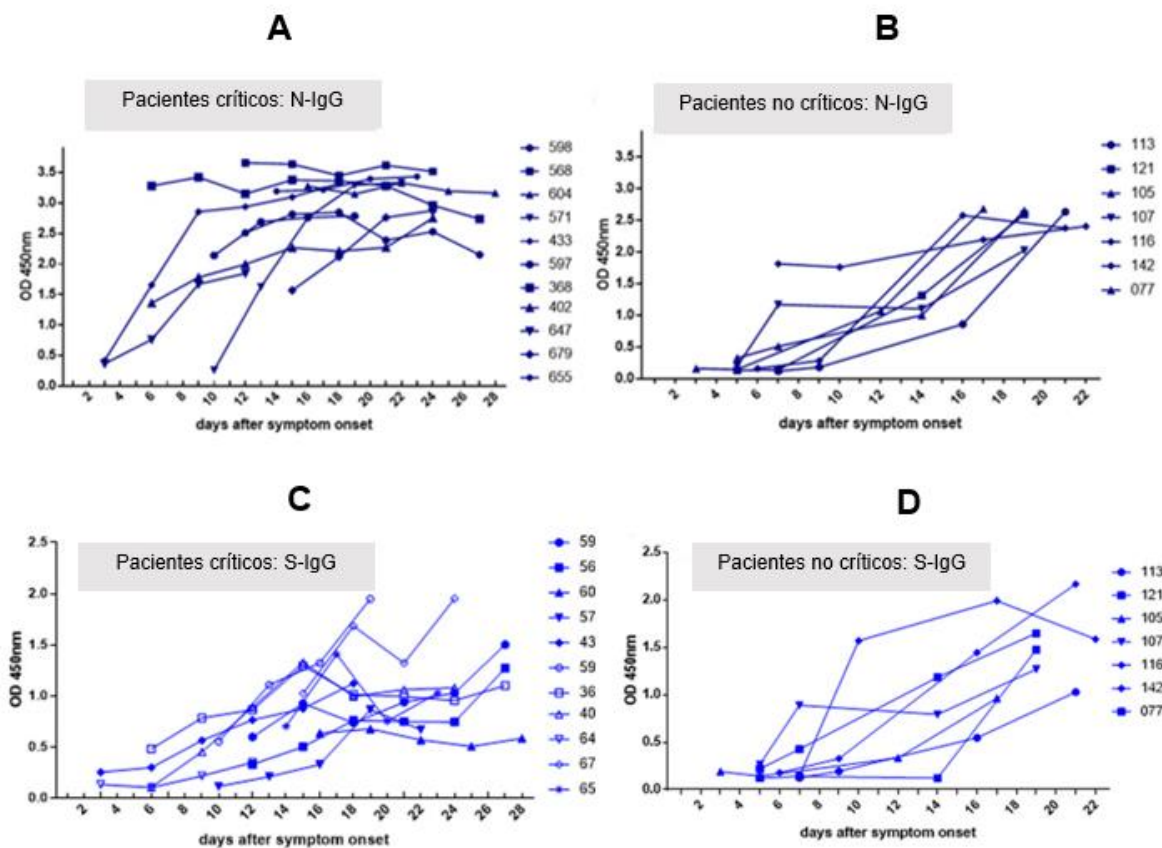


Figura 3: Cinética de la producción de anticuerpos IgG específicos contra la proteína N y S en pacientes críticos y no críticos.

A. Gráficos de la producción de anticuerpos N-IgG (IgG anti-N) en el tiempo en 11 pacientes críticos y **B.** 7 pacientes no críticos. **C.** Gráficos de la producción de anticuerpos S-IgG (IgG anti-S) en el tiempo en 11 pacientes críticos y **D.** 7 pacientes no críticos. (Fuente: Sun et al., 2020)

El análisis de la respuesta humoral en los niños también es importante. A diferencia de los adultos infectados, los niños tienen tasas de infección más bajas y síntomas más leves y, curiosamente, la presencia de anticuerpo IgG anti-S podría volver a ser importante (Lu et al., 2020). Un estudio en pacientes pediátricos detectó que los niveles de IgM anti-RBD de la proteína S no fueron medibles una semana después del inicio de la enfermedad, no así como los anticuerpos de clase IgG anti-RBD. Esto sugiere que la mayor parte del cambio de clase de células B específicas para este antígeno se completó dentro de una semana después de la primera exposición a virus. Además, una de las muestras de suero de un caso infectado que contenía una alta concentración de IgG para la proteína S-RBD, tenía alta actividad neutralizante contra el SARS-CoV-2. Esta eficaz respuesta inmune humoral podría ser una de las razones de por qué la mayoría de los niños infectados con SARS-CoV-2 cursan con síntomas más leves y se recuperan más fácilmente que los adultos (Zhang Y et al., 2020).

Además de la diferencia entre la severidad del cuadro infeccioso de niños versus el de los adultos, también se han observado diferencias entre hombres y mujeres. Un estudio que comparó la producción de anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 en pacientes masculinos y femeninos con COVID-19 mostró resultados diferentes entre ambos sexos. Los datos mostraron que la concentración de IgG entre pacientes leves, moderados y en recuperación de distinto sexo no exhibía diferencias. Sin embargo, en el estado grave, más pacientes femeninas tenían una concentración relativamente más alta de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2

en suero en comparación a los pacientes masculinos. Además, la generación de anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 en pacientes femeninas fue más rápida que en pacientes masculinos en la fase temprana de la enfermedad (Zeng et al., 2020). Estos resultados nuevamente sugieren que un cambio de clase temprano podría ser un proceso esencial para una evolución positiva de la enfermedad COVID-19.

A pesar de que estos hallazgos insinúan que esta diferencia entre la producción de anticuerpos IgG es fundamental en pacientes leves y severos, existen otros estudios que reportan que no se evidencia una diferencia significativa según la severidad del cuadro. Un estudio de cohorte en dos hospitales de Hong Kong, China, incluyó a 23 pacientes con COVID-19: diez tenían COVID-19 grave (todos con requerimiento de oxígeno suplementario) y trece tenían una enfermedad leve (sin requerimiento de oxígeno suplementario). Para la mayoría de los pacientes, se observó un aumento en los niveles de anticuerpos IgG anti-N o anti-RBD a los 10 días o después de la aparición de los síntomas. Al comparar el inicio de la seropositividad entre anti-RBD y anti-N, se observó una seropositividad más temprana para anti-RBD en comparación a anticuerpos IgG anti-N en la mayoría de los casos. Sin embargo, los niveles de anticuerpos séricos no se correlacionaron con la gravedad clínica (Figura 4). Incluso se observó que pacientes con comorbilidades (como diabetes e hipertensión), arrojaron valores menores de IgG anti-RBD que aquellos sin comorbilidades, pero la diferencia no

fue significativa y tampoco se observó asociación entre comorbilidad y la producción de anticuerpos IgG anti-N (To et al., 2020).

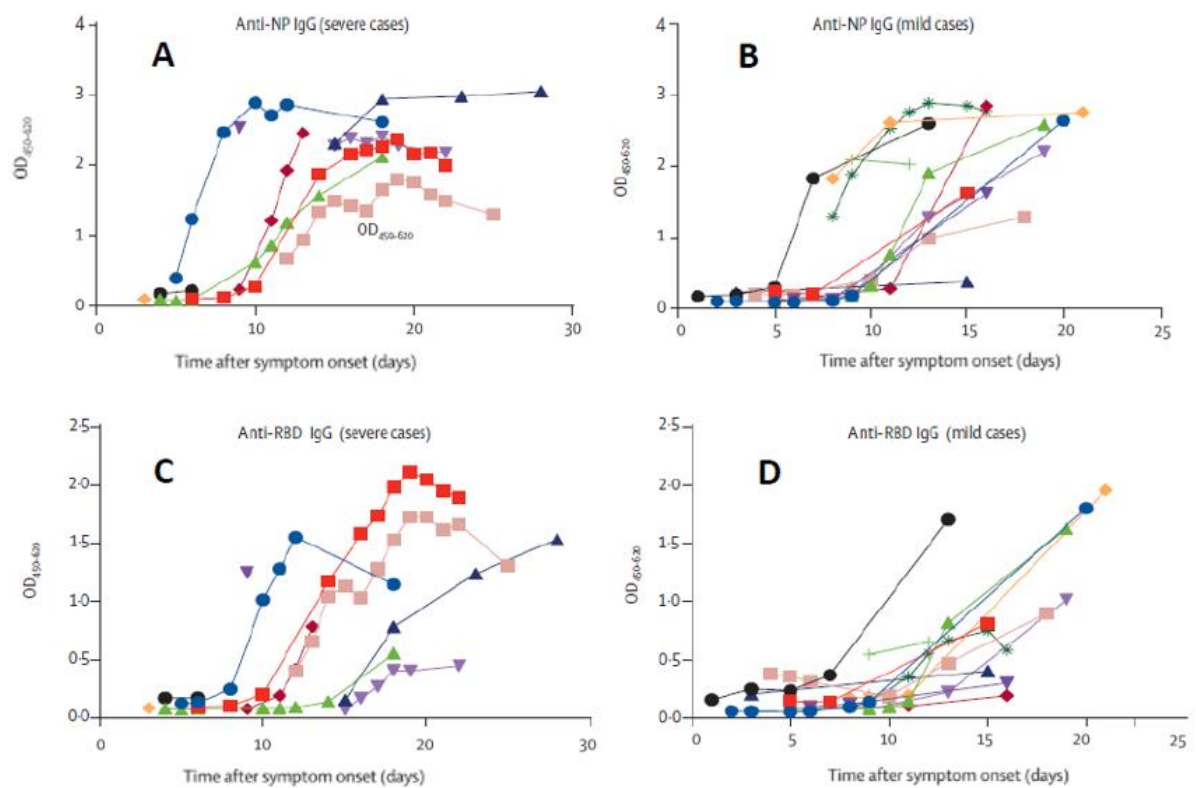


Figura 4: Perfiles de anticuerpos IgG anti-N y anti-S-RBD en pacientes leves y severos.

A. Gráficos de la producción de anticuerpos IgG anti-N en pacientes severos y **B.** pacientes leves en el tiempo. **C.** Gráficos de la producción de anticuerpos IgG anti-RBD en pacientes severos y **D.** pacientes leves en el tiempo. No se observan diferencias significativas en ningún caso. (Fuente: To et al., 2020).

Si bien algunos de los estudios mencionados brindan a los anticuerpos IgG anti-S un rol protector dentro de la patología, estudios más actuales relacionan los altos niveles de estos anticuerpos con un progreso hacia un estadio severo y la necesidad de ventilación mecánica. García-González y colaboradores, diseñaron un estudio para caracterizar la respuesta inmunológica de 66 pacientes COVID-19 ingresados al Hospital Clínico de la Universidad de Chile entre julio de 2020 hasta agosto de 2021. De esta manera, 29 pacientes fueron clasificados con un estado de enfermedad moderado al presentar infección por SARS-CoV-2 y requerir hospitalización sin oxígeno suplementario o requerir oxígeno suplementario no invasivo, mientras que 37 pacientes fueron calificados como graves tras requerir ingreso en la UCI y ventilación no invasiva o ventilación mecánica invasiva. Los datos recolectados durante la investigación revelaron que aquellos pacientes que requirieron ventilación mecánica invasiva muestran una respuesta inmune innata y adaptativa exacerbada caracterizada por frecuencias aumentadas de plasmoblastos, monocitos, células Th1, destacando también niveles elevados de IgG anti-S mediante medición por ELISA, desregulación que en su conjunto puede proporcionar información relevante con respecto a la progresión de la patología grave de COVID-19. Por otro lado, se observó que pacientes que logran recuperarse de COVID-19 grave comienzan a reestablecer las proporciones normales de células inmunitarias 100 días después del alta hospitalaria, pero mantienen niveles altos de IgG específica para SARS-CoV-2

durante todo el estudio, lo que es un signo indicativo de memoria inmunológica (García-González et al., 2021).

6.5 Producción de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2

Una respuesta de anticuerpos óptima contra una infección viral está determinada, principalmente, por las funciones que éstos sean capaces de cumplir tanto contra la célula infectada como contra el virus propiamente tal. Entre ellas, destacan las funciones efectoras como la opsonización y fagocitosis mediada por anticuerpos, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la activación del sistema complemento en donde se encuentra la fagocitosis de microorganismos opsonizados por fragmentos del complemento, inflamación y lisis (Figura 5) (Hua et al., 2017). Sin embargo, un aspecto muy importante también es la neutralización del virus, ya que previene la infección inicial y la diseminación viral (Murin et al., 2019).

En este contexto, la neutralización es definida como la reducción de la infectividad viral tras la unión del anticuerpo a la superficie de las partículas virales, bloqueando el ciclo de replicación viral (Klasse et al., 2002). Generalmente, bloquean la unión del virus a los receptores celulares; sin embargo, en algunos casos, pueden prevenir los cambios conformacionales necesarios para la fusión del virus con la membrana celular o la escisión proteolítica (Bachmann et al., 2021).

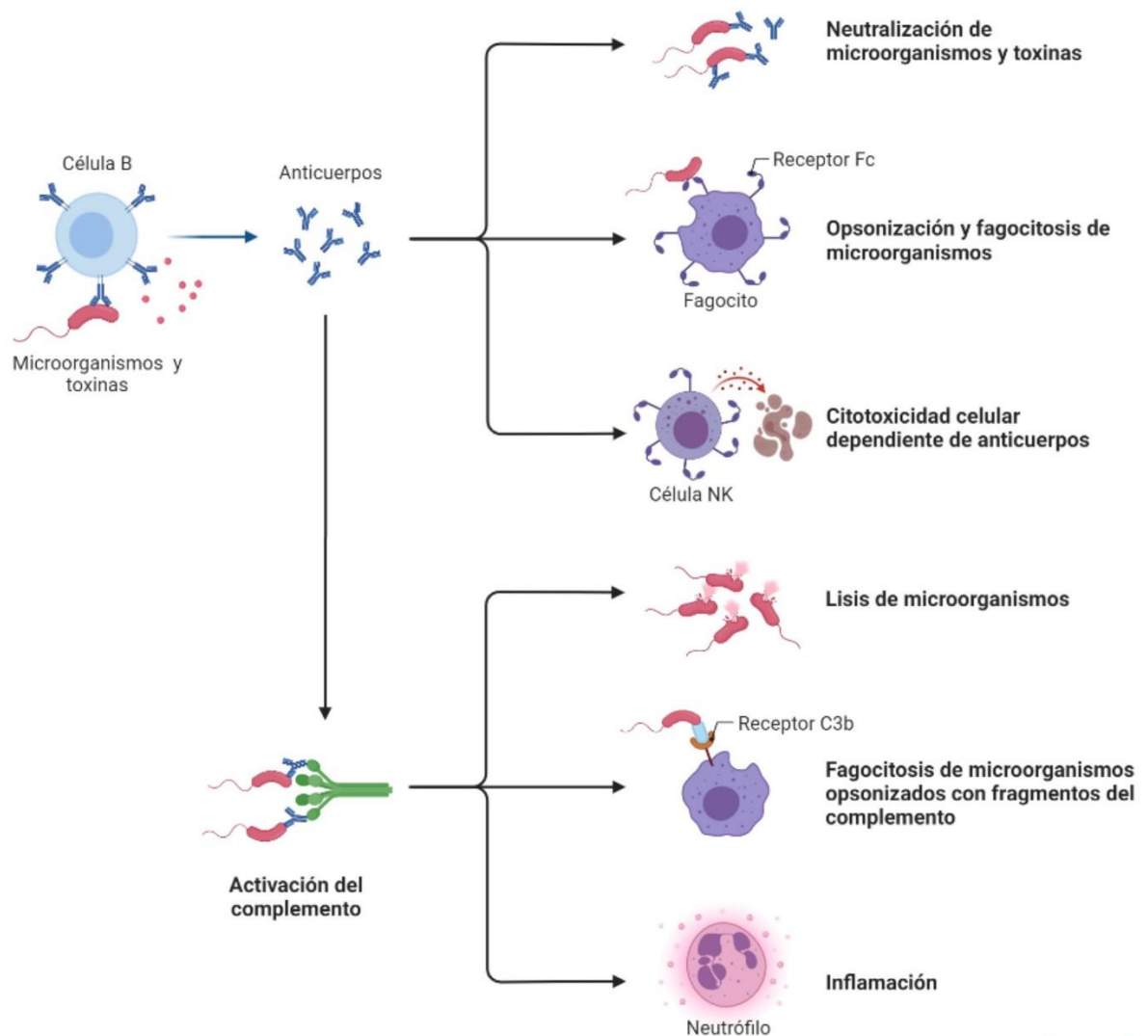


Figura 5: Funciones efectoras de los anticuerpos.

Los anticuerpos producidos por la célula plasmática productora de anticuerpos son capaces de actuar contra microorganismos y toxinas, neutralizarlos, opsonizarlos para la fagocitosis, sensibilizarlos para la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y activar el sistema complemento. Figura obtenida desde Biorender (Créditos: PhD. Akiko Iwasaki y PhD. Ruslan Medzhitov).

En el caso del SARS-CoV-2, los epítomos que se unen a los anticuerpos neutralizantes se encuentran predominantemente en el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del virus (Figura 6), impidiendo así su interacción con el receptor ACE2 y su posterior internalización en la célula huésped (Putcharoen et al., 2021).

Las investigaciones realizadas hasta el momento indican que la mayoría de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 desarrollan títulos variables de anticuerpos neutralizantes entre los días 14 y 20 post infección (Lau et al., 2021). Sin embargo, la duración que tendrían estos anticuerpos es un tema que ha generado controversia, ya que algunas investigaciones han reportado que los niveles de anticuerpos neutralizantes comienzan a disminuir después de aproximadamente 6 a 8 meses después de los síntomas iniciales (Dan et al. 2021), reportándose también niveles sólidos de anticuerpos neutralizantes que duran más de seis meses en la mayoría de los individuos (Lau et al., 2021). Sin embargo, Marot y colaboradores observaron que los niveles de anticuerpos neutralizantes comienzan a caer de 2 a 3 meses después de la infección (Marot et al., 2021).

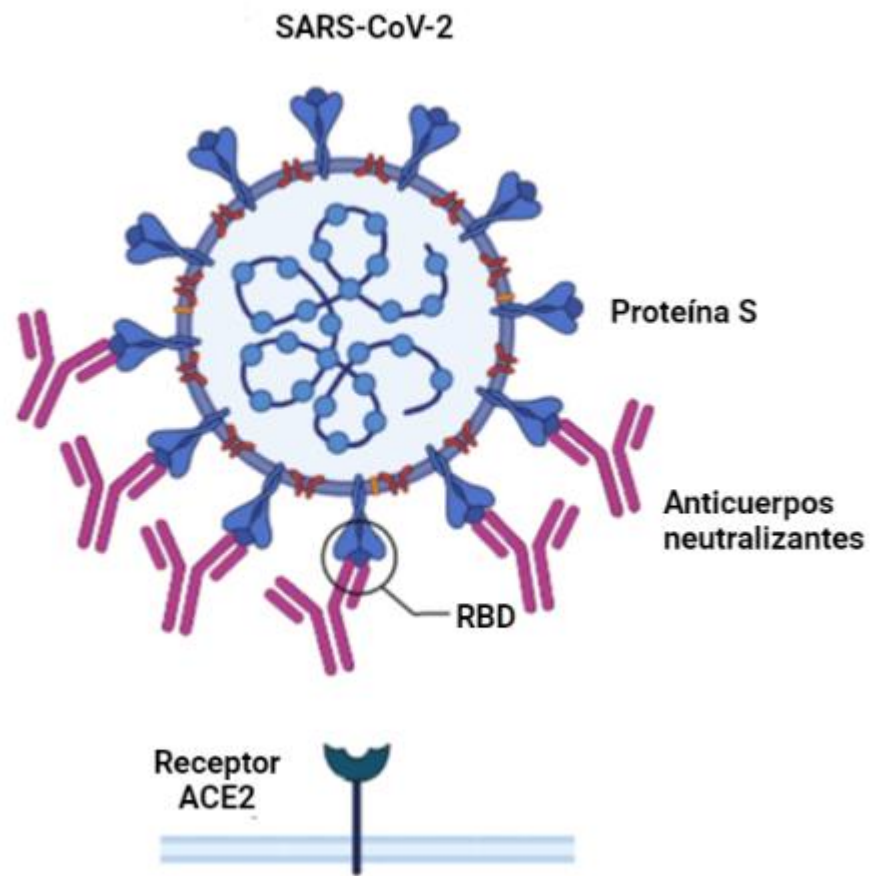


Figura 6: Los anticuerpos neutralizantes impiden la unión del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 con el receptor ACE2.

Figura realizada en Biorender.

Respecto a las diferencias de producción de anticuerpos según gravedad de la patología, varias investigaciones indican que la respuesta de anticuerpos neutralizantes es más elevada en pacientes graves que han requerido VMI (Ventilación Mecánica Invasiva). En el estudio realizado por Seow y colaboradores, reclutaron a 59 pacientes admitidos en el Fideicomiso de la Fundación NHS de Guy's and St. Thomas. Los investigadores asignaron una puntuación de gravedad a los pacientes en función del nivel máximo de asistencia respiratoria que requerían durante su período de hospitalización, obteniendo así 5 grupos. El grupo 0 que corresponde a pacientes asintomáticos o que no requirieron oxígeno suplementario; grupo 1 en donde se encuentran aquellos pacientes que requirieron de oxígeno suplementario ($FiO_2 < 0,4$) durante al menos 12 horas; grupo 2 en el cual pacientes requirieron oxígeno suplementario ($FiO_2 \geq 0,4$) durante al menos 12 horas, grupo 3 con requisito de ventilación no invasiva (VNI); grupo 4 con requerimiento de intubación y ventilación mecánica u oxígeno suplementario ($FiO_2 > 0,8$) y, finalmente, grupo 5 con requisito de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO). De acuerdo con la severidad, agruparon estos 5 grupos dentro de 2 clasificaciones más grandes (del 0 al 3 y del 4 al 5) para comparar los valores obtenidos en la determinación de los anticuerpos neutralizantes realizada por medio de un ensayo de inhibición de entrada viral con partículas de virus a base de VIH-1 pseudotipadas con la proteína S del SARS-CoV-2. Se observó que la magnitud de la respuesta de NABs (Anticuerpos neutralizantes) depende de la gravedad de la enfermedad, ya que es

significativamente mayor en los pacientes correspondientes a los grupos 4 y 5 en comparación a los de los grupos del 0 al 3 (Figura 7) (Seow et al., 2020). Estos resultados sustentan otros estudios con resultados similares en donde se ha observado que los pacientes que se han recuperado de una enfermedad grave tienen NAbs más altos que los pacientes que han cursado la infección con síntomas leves o siendo asintomáticos, además que se ha registrado, que títulos más altos de neutralización podrían ser buenos predictores de supervivencia en pacientes con COVID-19 grave (García-Beltrán et al., 2021).

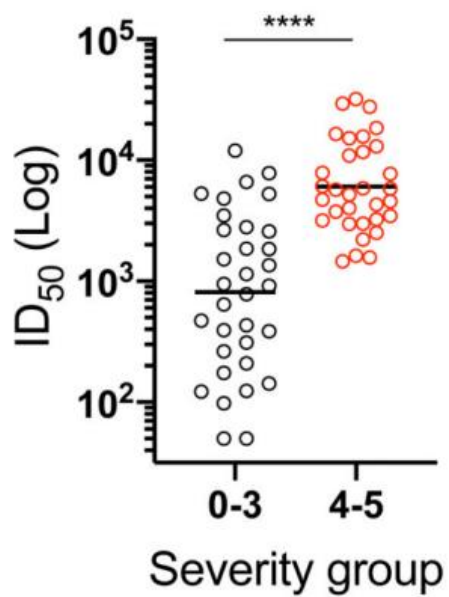


Figura 7: Comparación de la capacidad de neutralización (ID₅₀) de los individuos de gravedad 0-3 o 4-5.

ID₅₀ corresponde a la dilución del suero que inhibe el 50% del virus.

(****= $p < 0,0001$). (Fuente: Seow et al., 2020).

6.6 Rol de las células B en la respuesta inmune humoral

No solo los anticuerpos con funciones efectoras o neutralizantes cumplen un rol fundamental en la respuesta humoral. No podemos dejar de lado que ésta comienza por el reconocimiento del antígeno por parte del BCR de la célula B virgen que ocurre en los órganos linfoides periféricos. La unión del antígeno al receptor produce señales bioquímicas hacia los linfocitos B, iniciando así su proceso de activación. Por otro lado, se encuentra los linfocitos T CD4+ vírgenes quienes también se activan en los órganos linfoides (específicamente en las zonas de linfocitos T) gracias a la presentación antigénica mediada por las células dendríticas en el contexto del MHC de clase II. Así, por medio del gradiente de secreción de ciertas quimioquinas como CCL19 y CCL21 y la regulación en la expresión de receptores, es que linfocitos B y T CD4+ comienzan a acercarse (Abbas et al., 2018). El antígeno reconocido por el BCR del linfocito B es internalizado y es procesado con el fin de generar fragmentos peptídicos que serán presentados en asociación a moléculas del MHC de clase II al linfocito T CD4+. El linfocito T CD4+ reconoce el complejo MHC II-peptido en los linfocitos B, estimulando la respuesta en estas células. Además, al activarse el linfocito T CD4+ expresa el ligando para CD40 (CD40L) que se une a su receptor CD40 situado en la superficie del linfocito B, e induce la proliferación y diferenciación de éstos en focos extra foliculares y luego en los centros germinales. A su vez, los linfocitos T CD4+ secretan citoquinas que permiten la proliferación y el cambio de isotipo en los linfocitos B y mantienen los centros germinales. Tras este

proceso de activación, la célula B podrá diferenciarse a una célula plasmática productora de anticuerpos o a células B de memoria, que guardan información sobre el patógeno para proporcionar inmunidad en el futuro (Figura 8) (Bishop et al., 2001).

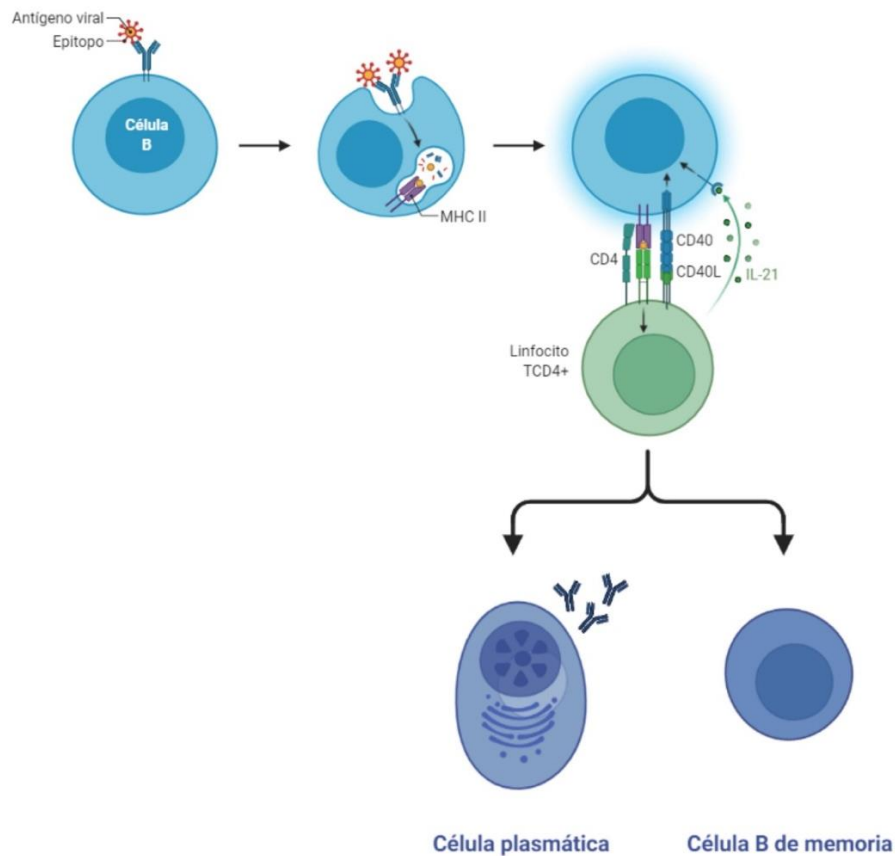


Figura 8: Proceso de diferenciación de las células B hasta células plasmáticas o B de memoria mediante la activación del linfocito T CD4+.

El BCR de las células B es capaz de reconocer el antígeno e internalizarlo para ser procesado y luego presentado en el contexto del MHC II al linfocito T CD4+. La interacción del CD40/CD40L e IL-21 produce la activación y proliferación de la célula B que posteriormente es capaz de diferenciarse a una célula plasmática productora de anticuerpos o a una célula B de memoria. Figura obtenida desde Biorender (Créditos: PhD. Akiko Iwasaki y PhD. Ruslan Medzhitov).

6.7 Células B específicas contra SARS-CoV-2

Los estudios publicados a la fecha destacan la sobrevivencia de las células B de memoria específicas contra el virus en circulación entre 6 a 7 meses tras la infección natural. Gurevich y colaboradores estudiaron la población de células B de memoria contra SARS-CoV-2 en 64 pacientes convalecientes que cursaron la infección con síntomas leves. Los resultados mostraron que las células B de memoria específicas anti-RBD aumentaron gradualmente y alcanzaron un nivel significativamente más alto en comparación con los controles sanos a los 3 meses y permaneciendo elevadas a los 5 y 7 meses, mientras que no se observaron diferencias entre los diferentes puntos de tiempo (Figura 9), concluyendo así que la respuesta de células B es robusta en el tiempo (Gurevich et al., 2021). Gaebler y colaboradores, por su parte, realizaron un estudio sobre la inmunidad humoral de 87 pacientes adultos convalecientes de COVID-19, realizándoles un seguimiento por 6 meses. Observaron una disminución significativa de anticuerpos IgM e IgG anti-RBD al comparar los valores obtenidos a las 1.3 meses y 6.2 meses post infección (Figura 10A y B). Además, según indican, la capacidad neutralizante de estos anticuerpos disminuyó aproximadamente 5 veces. Sin embargo, el número de células B RBD específicas no disminuyó entre las mediciones a los 1.3 meses y 6.2 meses (Figura 10C), lo que evidenciaría una renovación clonal y una evolución continua de la respuesta humoral (Gaebler et al., 2021).

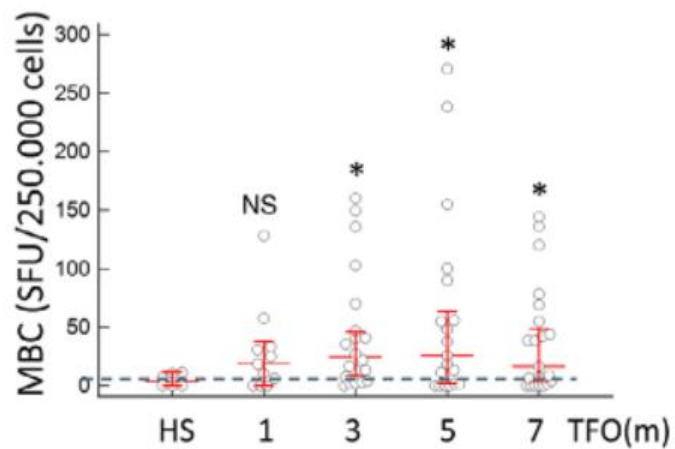


Figura 9: Dinámica de las células B de memoria anti-SARS-CoV-2 a los meses 1, 3, 5 y 7 post infección.

La gráfica describe el número de células B anti-RBD de memoria formadoras de puntos (SFU)/250.000 células en el tiempo (1, 3, 5 y 7 meses post comienzo de los síntomas). El número de sujetos por grupo fue el siguiente: HS n = 16; 1 mes n = 13; 3 meses n = 21; 5 meses n = 19; 7 meses n = 15. La línea punteada indica el nivel de corte en HS. HS: corresponde a los sujetos sanos. MBC: Células B de memoria. TFO: corresponde al tiempo luego del comienzo de la COVID-19. *p<0.03 por la prueba de Mann–Whitney U en comparación con los sujetos sanos. (Fuente: Gurevich et al., 2021).

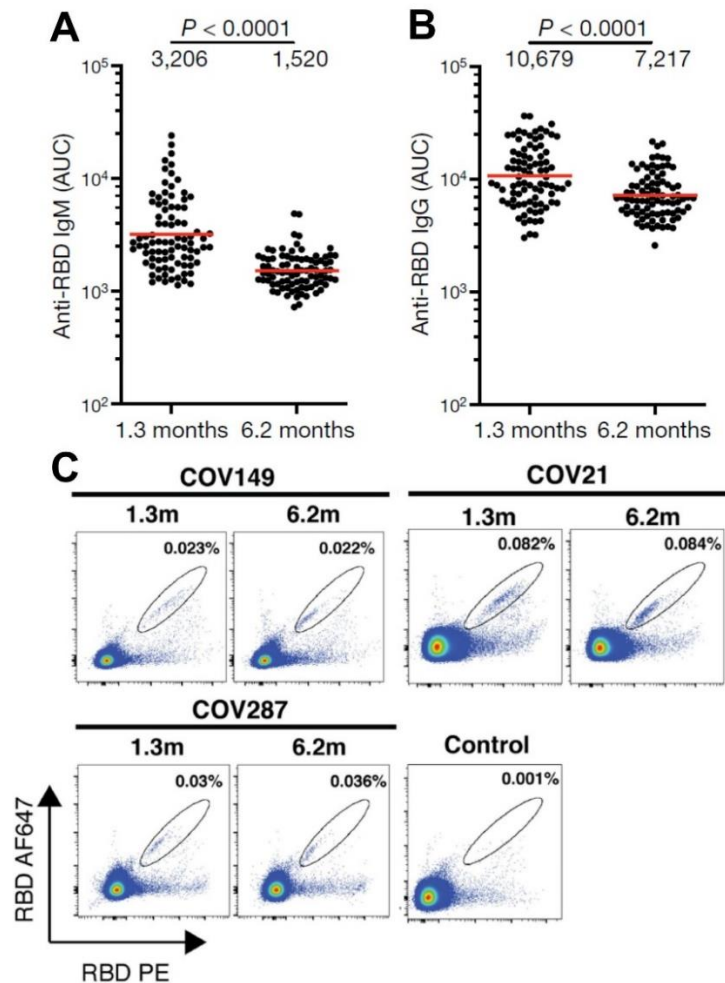


Figura 10: Dinámica de la respuesta humoral anti-SARS-CoV-2 a los 1.3 y 6.2 meses luego de la infección.

A. Resultados de test ELISA para la reactividad plasmática de anticuerpos IgM e **B.** IgG frente a RBD a los 1.3 y 6.2 meses post infección. **C.** Dot plots de citometría de flujo que evidencian el porcentaje de células B de memoria doble positivas para RBD en el mes 1.3 o 6.2 después de la infección en 3 participantes seleccionados al azar y muestra control. (Fuente: Gaebler et al., 2021).

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En relación con los datos presentados, si bien hay estudios que demuestran diferencias en la producción de IgG contra SARS-CoV-2 según el grado de severidad de la enfermedad, también existe evidencia que contradice estos hallazgos, por lo que aún no se logra comprender el rol de estos anticuerpos en la infección. Además, la población de células B necesita ser más estudiada para dilucidar el papel de la respuesta inmune humoral en la COVID-19. Por otro lado, la mayoría de los estudios han sido realizados en población china o europea, por lo que se requiere mayor data en la población chilena.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

A raíz de este problema, surge la pregunta que da origen a este proyecto la cual es ¿Cuál es la relación entre los niveles de IgG y la población de células B RBD-específicas con el grado de severidad de la enfermedad COVID-19 en la población chilena?

HIPÓTESIS

Pacientes chilenos con COVID-19 severo presentan mayores niveles de anticuerpos IgG y un mayor porcentaje de células B RBD-específicas en comparación a pacientes con COVID-19 leve.

OBJETIVO GENERAL

Relacionar la respuesta inmune humoral anti-SARS-CoV-2 con la severidad de la enfermedad COVID-19 en una cohorte de pacientes chilenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 en una cohorte de 60 pacientes chilenos que padecieron COVID-19.
2. Determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 en una cohorte de 60 pacientes chilenos que padecieron COVID-19.
3. Determinar el porcentaje de células B RBD específicas contra SARS-CoV-2 en una cohorte de pacientes chilenos que padecieron COVID-19.
4. Asociar los niveles de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y el porcentaje de células B RBD específicas contra SARS-CoV-2 con la severidad de la enfermedad en una cohorte de 60 pacientes chilenos que padecieron COVID-19.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Esta tesis se encuentra enmarcada dentro del proyecto COVID1005 financiado por ANID, que lleva por título “El efecto colateral de la defensa frente al COVID-19: Análisis de la respuesta inflamatoria y su asociación con un potencial daño pulmonar en pacientes recuperados que cursaron COVID-19 severo, moderado y asintomático” y corresponde a un estudio observacional y de cohorte prospectivo. El protocolo del estudio fue previamente registrado en el registro ISRCTN (ID: ISRCTN16865246) y fue aprobado por el comité ético científico (CEC) del Servicio de Salud Bio Bío (código: CEC113). Los pacientes fueron reclutados desde el Hospital Regional Dr. Guillermo Grant Benavente de Concepción y el Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz de Los Ángeles siguiendo las directrices sugeridas por el tratado STROBE. Al momento de la inclusión en el estudio, se obtuvo el consentimiento informado firmado, y todos los métodos se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki y las buenas prácticas clínicas (Anexos 1 y 2).

7.2 Definición de la población de estudio

Se incluyeron 60 pacientes con edad mayor o igual a 18 años y confirmados de infección por SARS-CoV-2 mediante PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) positiva durante los meses de abril a julio de 2020. Los pacientes se

clasificaron en tres grupos distintos según la severidad del cuadro agudo. Así, se incluyeron un total de 18 pacientes con COVID-19 de sintomatología leve (sintomáticos, sin diagnóstico de neumonía o hipoxemia), 17 con sintomatología moderada (sintomáticos, con diagnóstico de neumonía que requirió hospitalización, sin conexión a ventilación mecánica invasiva (VMI) y 25 con sintomatología severa (con hipoxemia severa, necesidad de VMI y estaba en UCI). Se excluyeron aquellos pacientes con comorbilidad respiratoria previa (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica u otra), pacientes mayores de 70 años, además de participantes con pérdida de seguimiento, historia de trasladado a otro hospital o ciudad posterior al alta, aquellos en cuidados paliativos o que tuvieran una discapacidad mental que impidiera completar las evaluaciones. Además, se incluyeron 10 a 12 individuos controles que no presentaron COVID-19 confirmado por PCR negativo semanal y ausencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 al momento de toma de muestra.

7.3 Obtención de muestras de suero

Para la toma de muestras, se recolectaron muestras de sangre en tubos con gel separador a los 6 y 12 meses post infección. Posteriormente, estas muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 12 minutos para separar el coágulo del suero. El suero obtenido se utilizó inmediatamente para realizar las mediciones de anticuerpos según la metodología correspondiente señalada a continuación. Cabe mencionar que con las muestras recolectadas a los 6 meses se realizaron

mediciones de los niveles de IgM, IgG y la determinación del porcentaje de las células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2, mientras que con las muestras obtenidas a los 12 meses se realizó la medición de IgM, IgG y anticuerpos neutralizantes (NAbs).

7.4 Determinación de los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2

Para determinar los niveles de anticuerpos de clase IgM se llevó a cabo un inmunoensayo de quimioluminiscencia de captura que fue realizado utilizando el kit MAGLUMI 2019-nCoV IgM (CLIA) comercializado por la empresa SNIBE. Este ensayo se aplicó de forma automatizada utilizando el analizador MAGLUMI 800 para su medición. El kit cuenta con microperlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-IgM humana a las que se agrega 10 µL del suero de cada paciente junto con el buffer, en donde los anticuerpos generados deben unirse a las microperlas luego de ser incubados, formando así inmunocomplejos. Después de la precipitación de las perlas en un campo magnético, el sobrenadante decanta y se realiza un ciclo de lavado. Posteriormente, se agrega el antígeno recombinante 2019-nCoV marcado con ABEI (N-(4-aminobutill)-N-etilisoluminol) y se incuba nuevamente para la formación de complejos. ABEI es una pequeña molécula no enzimática con una fórmula molecular especial para mejorar la estabilidad en soluciones ácidas y alcalinas. Nuevamente, las perlas precipitan en un campo magnético, el sobrenadante decanta y debe realizarse

otro ciclo de lavado. Posteriormente, se agregan los starters 1 + 2 (hidróxido de sodio (NaOH) al 4% + peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al + 0,12%) para dar inicio a la reacción quimioluminiscente (Figura 11A). La señal generada es medida por el analizador como unidades de luz relativas, la cual es proporcional a la concentración de IgM anti-SARS-CoV-2 de la muestra (SNIBE, 2020).

Para la determinación de los niveles de anticuerpos de clase IgG se realizó un inmunoensayo de quimioluminiscencia indirecto, el cual fue realizado utilizando el kit MAGLUMI 2019-nCoV IgG (CLIA) distribuido también por la empresa SNIBE. Este kit, a diferencia del anterior, cuenta con microperlas magnéticas recubiertas con los antígenos recombinantes N y S del SARS-CoV-2. El procedimiento es el mismo que en el caso del kit anterior, sin embargo, para detectar los anticuerpos IgG producidos por el paciente se utilizan anticuerpos anti-IgG humanos marcados también con ABEI, como se indica en la Figura 11B. La señal generada fue medida por el analizador MAGLUMI 800 y fue proporcional a la concentración de IgG anti-SARS-CoV-2 de la muestra (SNIBE, 2020). Cabe destacar que para ambos kits se considera reactivo un resultado mayor o igual a 1.00 AU/mL (≥ 1.00 AU/ mL) (SNIBE, 2020).

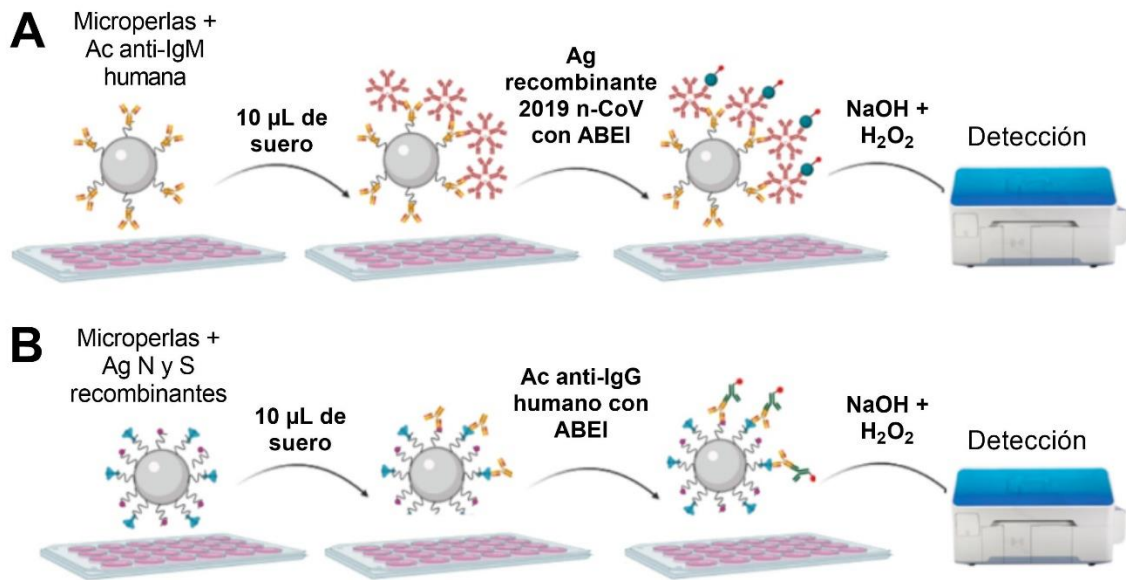


Figura 11: Esquematización de la metodología CLIA.

A. Inmunoensayo de quimioluminiscencia de captura para IgM. **B.** Inmunoensayo de quimioluminiscencia indirecto para IgG. Ac: anticuerpo. Ag: Antígeno. Figura realizada en Biorender.

7.5 Determinación de los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2

Para la determinación de los niveles de anticuerpos neutralizantes (NABs), se realizó un ensayo de quimioluminiscencia competitivo, mediante el kit MAGLUMI® SARS-CoV-2 *Neutralizing Antibody* (CLIA), el cual también se hizo de forma automatizada utilizando el analizador MAGLUMI 800. Esta prueba se basa en el principio de que los anticuerpos neutralizantes son capaces de bloquear la interacción del dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 y el receptor ACE2. Es por esto que para llevarse a cabo, la muestra de suero, las microperlas magnéticas unidas al antígeno ACE2 y la porción RBD recombinante del SARS-CoV-2 unida a ABEI se mezclan y son incubadas. Aquí es cuando los NABs presentes en la muestra compiten con el antígeno ACE2 inmovilizado en las perlas magnéticas para unirse a la porción RBD recombinante del virus. Luego de la precipitación en un campo magnético, el sobrenadante decanta y se realiza un ciclo de lavado. En seguida, se agregan los starters 1 y 2 para que ABEI inicie la reacción quimioluminiscente que será cuantificada por el analizador. La señal fue medida como unidades de luz relativas, la cual es inversamente proporcional a la concentración de NABs presentes en la muestra (Figura 12) El analizador automático es capaz de calcular la concentración de cada muestra por medio de una curva de calibración de 2 puntos, expresando los resultados en $\mu\text{g/mL}$ (Rango lineal de 0.050-30 $\mu\text{g/mL}$) (SNIBE, 2020)

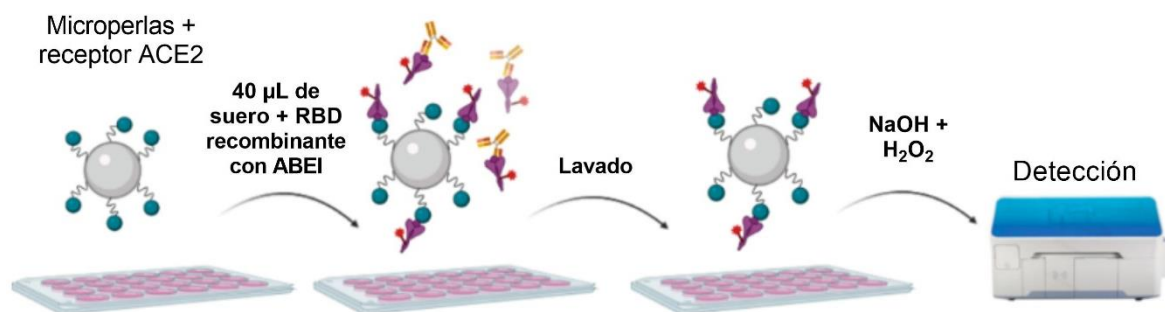


Figura 12: Esquematización del Inmunoensayo de quimioluminiscencia competitivo para la detección de NAbs.

7.6 Determinación del porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2.

Para realizar la determinación de las células B RBD-específicas, se utilizaron solo 34 muestras de células mononucleares previamente aisladas desde sangre periférica de los participantes y almacenadas a -80°C. De estas muestras, 10 correspondían a pacientes leves, 8 a moderados y 16 a severos.

7.6.1 Tratamiento de las muestras

Las células mononucleares criopreservadas a -80°C fueron descongeladas en un baño termorregulado, rápidamente se les agregó medio RPMI enriquecido al 10% con suero fisiológico antes de realizarse una separación mediante Ficoll a 2000 rpm por 20 minutos con el fin de eliminar las células muertas. Tras la separación, se extrajo el anillo correspondiendo a las células mononucleares y posteriormente se lavaron con buffer PBS (del inglés, *phosphate buffered saline*) durante una centrifugación a 1400 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante tras la centrifugación y el pellet obtenido se resuspendió en 800 µL de MACS buffer.

A continuación, el recuento celular se realizó utilizando 10 µL de muestra y 90 µL del reactivo azul de tripano como indicador de muerte celular. Una pequeña alícuota de esta mezcla fue utilizada para realizar el recuento en el microscopio y por medio del uso de una cámara de Neubauer.

7.6.2 Uso del kit de análisis de células B anti-SARS-CoV-2

El primer paso para la implementación de este kit fue resuspender 10 µg del RBD recombinante del SARS-CoV-2 asociado a biotina en 100 µL de agua desionizada, filtrada y estéril con el fin de obtener una concentración de 0,1 mg/mL de la proteína recombinante.

Tras la reconstitución de la proteína, se procedió a preparar dos soluciones del tetrámero-RBD por medio de la mezcla del RBD recombinante del SARS-CoV-2 asociado a biotina y estreptavidina PE o PE-Vio 770 (50 µL/mL), respectivamente, con los valores que se indican en la Tabla 1. Una vez preparadas las soluciones de ambos tetrámeros, se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos (Miltenyi Biotec, 2021).

Posteriormente, se procedió a realizar la mezcla de anticuerpos y sus fluoróforos respectivos a utilizar para el marcaje de células B (Tabla 2), además de los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770 encargados del reconocimiento específico de las células B RBD específicas (Figura 13).

Esta mezcla se repartió entre las 34 muestras y, además, se consideró una muestra control la cual posee el marcaje con anticuerpos y estreptavidina unida a los fluoróforos PE y PE-Vio 770, pero no la presencia de la proteína RBD recombinante.

Las muestras preparadas se incubaron a 4°C por 2 horas antes de su medición en el citómetro de flujo.

Tabla 1: Volúmenes en utilizados para la formación de los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770.

Solución tetrámero-RBD	RBD recombinante unido a biotina (μL)	Streptavidina-PE o PE-Vio 770 (μL)	PEB buffer (μL)
Tetrámero-RBD-PE	6,8	5,4	32,9
Tetrámero-RBD-PE-Vio 770	13,5	10,8	65,7

Tabla 2: Detalle de los anticuerpos y fluoróforos utilizados para el marcaje de células B RBD específicas y su medición mediante de citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluoróforo
Anti-CD20	APC Vio770
Anti-IgM	APC
Anti-IgG	VioBlue
Anti-CD27	VioBright B5
Tetrámero-RBD-PE	PE
Tetrámero RBD-PE-Vio 770	PEVio770

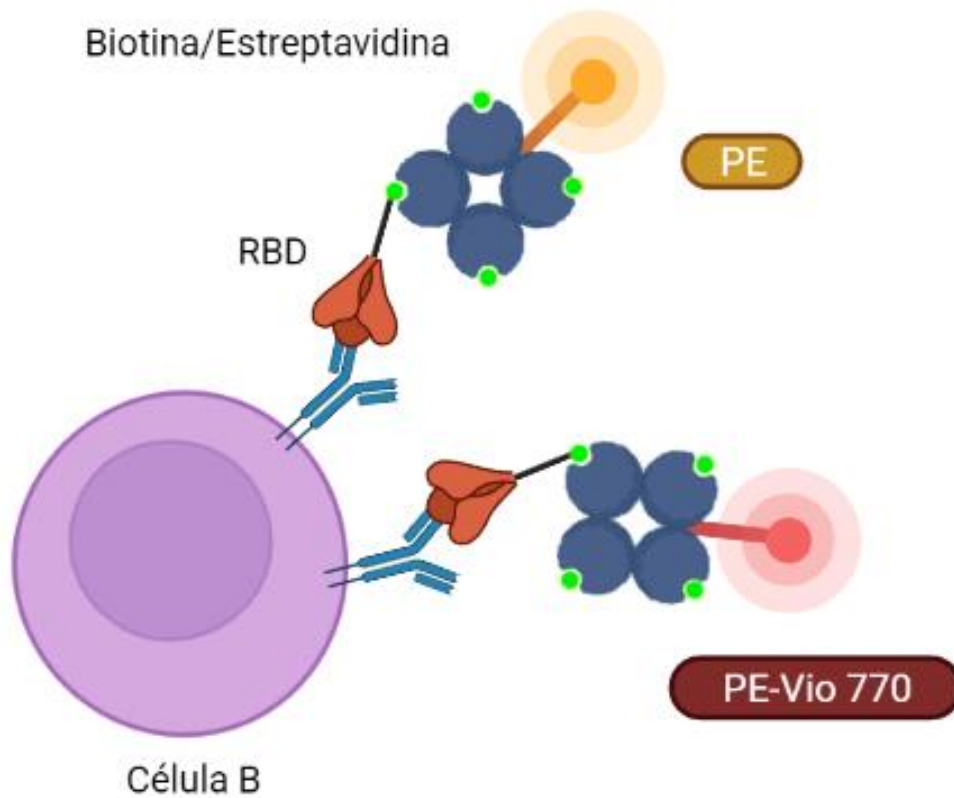


Figura 13: Los tetrámeros RBD-PE y RBD-PE-Vio 770 reconocen a la célula B RBD específica.

Los tetrámeros de RBD se forman cuando la biotina que viene unida a la porción RBD es capaz de unirse a la estreptavidina conjugada con los fluoróforos PE o PE-Vio 770. Si la célula es capaz de unirse a ambos tetrámeros entonces se considera una célula RBD específica anti-SARS-CoV-2. Figura realizada en Biorender.

7.7 Asociación de los niveles de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y el porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 con la severidad de la enfermedad COVID-19

Para llevar a cabo este objetivo, se realizó un análisis de cada uno de los resultados obtenidos en los experimentos realizados por cada metodología y se compararon de acuerdo con los niveles de severidad del cuadro que cada paciente haya presentado (severo, moderado o leve). Además, se utilizó una segunda clasificación en donde se dividieron según el padecimiento o no del síndrome de distrés respiratorio agudo o ARDS (por sus siglas en inglés, *Acute respiratory distress syndrome*). También se incluyeron como marcadores de severidad el haber presentado secuelas pulmonares estructurales, las que fueron determinadas por un médico mediante la observación y la detección de anomalías en tomografías computarizadas (TC) de tórax que fueron tomadas para cada paciente, o secuelas pulmonares funcionales que fueron determinadas gracias al puntaje obtenido por cada paciente luego del examen DLCO (Prueba de difusión de monóxido de carbono) que corresponde a una prueba funcional del aparato respiratorio en donde se realiza una evaluación de la capacidad de los pulmones para transferir el oxígeno a la sangre. Finalmente, también se incluyeron comorbilidades como alteraciones del metabolismo glucídico (resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2) notificadas pre y post infección por COVID-19. Las alteraciones del metabolismo glucídico pre-COVID-19 fueron consideradas según lo notificado por cada paciente, mientras que las

alteraciones del metabolismo glucídico post-COVID-19 fueron calculadas utilizando un valor de glicemia mayor a 100 mg/dL en ayuna para diabetes mellitus tipo 2 y un valor de HOMA-IR mayor a 2,5 para resistencia a la insulina. Los valores para estos parámetros fueron recaudados según los exámenes de laboratorio realizados a los pacientes durante su participación en el proyecto COVID1005.

Las comparaciones fueron realizadas mediante análisis estadístico utilizando el software GraphPad Prism 9, con el fin de establecer relación entre el desarrollo de la respuesta inmune humoral y la severidad de la enfermedad COVID-19 en pacientes chilenos.

Cabe destacar que todos los ensayos fueron realizados bajo los protocolos correspondientes de bioseguridad y bioética, y la eliminación de los desechos y restos biológicos fueron realizados bajo lo estipulado por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Universidad de Concepción. (Anexo 3).

RESULTADOS

8.1 Características de la cohorte en estudio

El estudio incluyó 60 pacientes que padecieron COVID-19, los cuáles cursaron la enfermedad con distintos niveles de severidad clasificados en leves, moderados y severos. En la Tabla 3 se describen detalladamente sus características donde se considera severidad, sexo, edad, IMC (Índice de Masa Corporal), padecimiento de ARDS, antecedentes de metabolismo glucídico alterado pre o post infección por COVID-19 (diabetes o resistencia a la insulina), tomografía computarizada de tórax alterada y DLCO alterado.

Tabla 3: Características de los pacientes COVID-19 seleccionados para el estudio

	Total (n= 60)	Leve (n=18)	Moderado (n=17)	Severo (n=25)
Sexo				
Masculino	32 (53,33%)	6 (33,33%)	11 (64,71%)	15 (60,00%)
Femenino	28 (46,67%)	12 (66,66%)	6 (35,29%)	10 (40,00%)
Edad (años)	46,42 ± 13,13 (20-74)	39,28 ± 14,36 (20-69)	47,53 ± 11,19 (27-66)	50,80 ± 11,62 (27-74)
IMC (kg/m ²)	31,07 ± 4,97 (18,50-42,50)	29,47 ± 5,13 (18,50-38,04)	31,30 ± 2,61 (27,50-36,40)	32,06 ± 5,88 (20,86-42,50)
ARDS	34 (56,67%)	0 (0%)	10 (58,82%)	24 (96,00%)
MGA pre COVID-19 (RI y DM2)	19 (31,67%)	0 (0%)	10 (58,82)	9 (36,00%)
Secuelas pulmonares (TC y DLCO)	14 (23,33%)	1 (5,56%)	6 (25,00%)	7 (28,00%)
TC alterada	23 (38,33%)	3 (16,67%)	5 (29,41%)	15 (60,00%)
DLCO alterado	5 (8,33%)	3 (16,67%)	2 (11,77%)	0 (0%)
MGA post COVID-19 (RI y DM2)	25 (41,67%)	9 (50,00%)	5 (29,41%)	11 (44,00%)

Valores expresados en promedio (porcentaje respecto al total de pacientes) ± desviación estándar (rango). ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo. MGA: Metabolismo glucídico alterado. RI: Resistencia a la insulina. DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

8.2 Niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 a los 6 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.

Luego de realizada la primera toma de muestra a los 6 meses post infección, se procedió a hacer la determinación de los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 mediante la metodología CLIA antes mencionada. Los resultados obtenidos fueron analizados en el software GraphPad Prism 9, relacionando los valores con parámetros como la severidad de los síntomas presentados durante la infección, el haber cursado con o sin ARDS, secuelas pulmonares estructurales (TC) y funcionales (DLCO) y alteraciones en el metabolismo glucídico pre y post infección por COVID-19.

En cuanto a los anticuerpos IgM y la severidad presentada por los pacientes, no se observaron diferencias significativas de estos en los valores entre los 3 grupos de pacientes (Figura 14A y B). Sin embargo, los pacientes con sintomatología moderada obtuvieron niveles significativamente más altos que los controles sanos (Figura 14A) ($p=0,0487$). También cabe mencionar que una gran parte de los pacientes, independiente de la severidad, presentan niveles de IgM inferiores a 1.00 AU/mL, considerándose valores no reactivos o negativos según el kit utilizado.

Por otro lado, en cuanto a los resultados obtenidos luego del análisis de los niveles de IgG, no se registraron diferencias significativas entre los pacientes que

cursaron un cuadro severo versus los que sufrieron uno moderado. No obstante, sí se registraron diferencias importantes entre los pacientes que padecieron COVID-19 severo versus los pacientes leves, donde los primeros tienen niveles de IgG significativamente mayores ($p=0,0002$) (Figura 14C y D). Algo similar se observó tras la comparación de los niveles de anticuerpos IgG entre los pacientes moderados y leves, donde los moderados también registraron niveles de anticuerpos IgG mayores a los generados en pacientes leves ($p= 0,0006$).

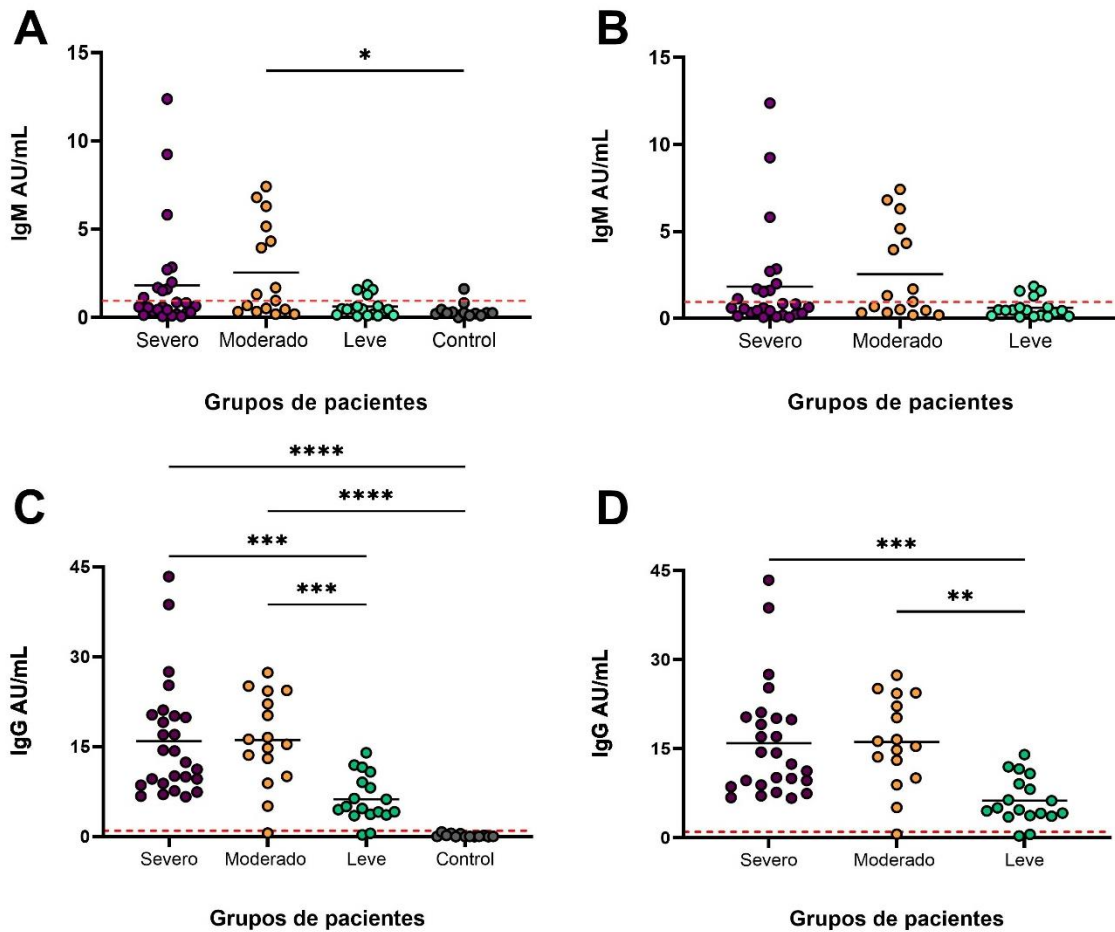


Figura 14: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes severos, moderados y leves.

A. Niveles de IgM según severidad tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgM según severidad tras 6 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. **C.** Niveles de IgG según severidad tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. **D.** Niveles de IgG según severidad tras 6 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. La línea roja

punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente.

A continuación, los niveles de anticuerpos IgG e IgM a los 6 meses post infección se compararon según el padecimiento del síndrome de distrés agudo (ARDS) durante el cuadro infeccioso. Para anticuerpos IgM, no se observaron diferencias entre ambos grupos (Figura 15A y B). Sin embargo, para anticuerpos IgG se observa que los pacientes que padecieron ARDS durante la COVID-19 tienen niveles significativamente más alto que aquellos que no (Figura 15C y D) ($p=0,0004$).

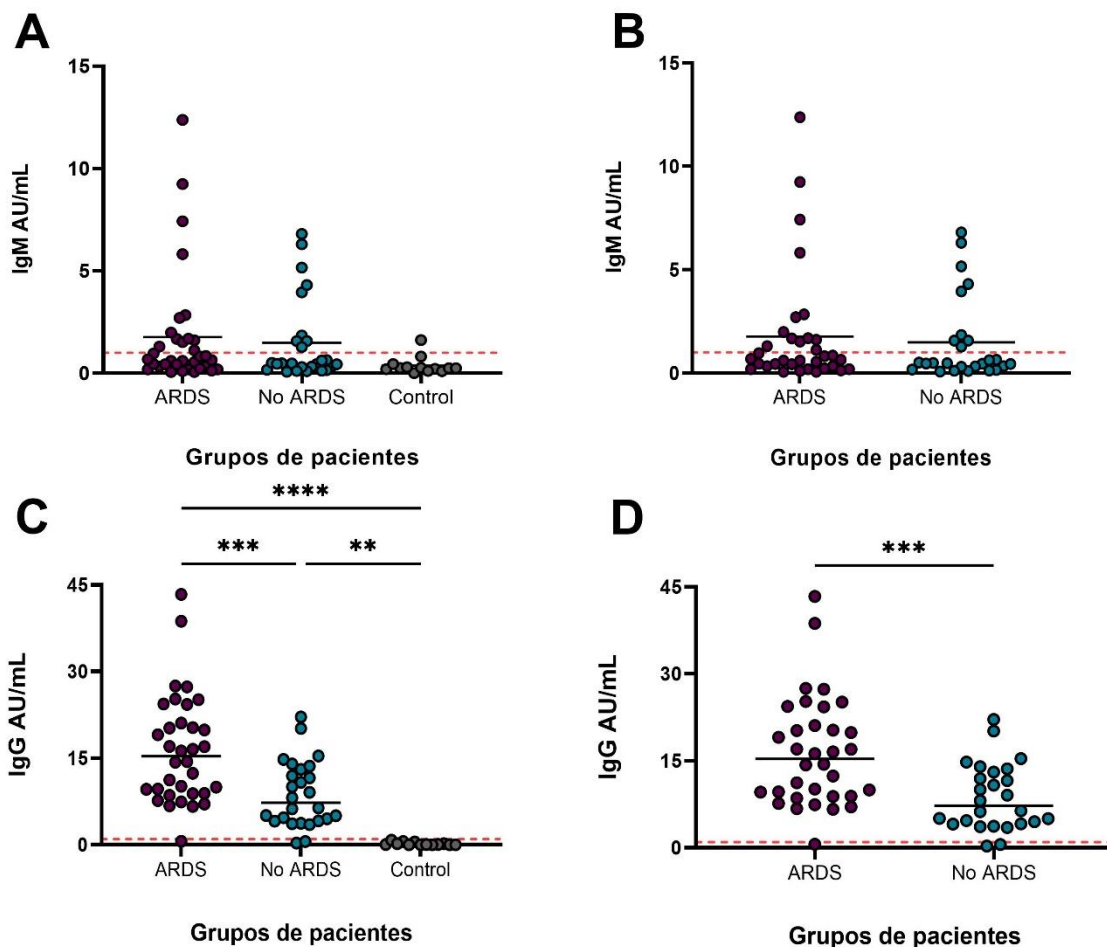


Figura 15: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.

A. Niveles de IgM según padecimiento de ARDS tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgM según padecimiento de ARDS tras 6 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. **C.** Niveles de IgG según padecimiento de ARDS tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. **D.** Niveles de

IgG según padecimiento de ARDS tras 6 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados de A y C se aplicó una prueba ANOVA, mientras que para B y D se realizó la prueba de Mann-Whitney. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

El siguiente análisis, se hizo con los niveles de anticuerpos IgM e IgG y las secuelas pulmonares reportadas a través de exámenes médicos realizados en la cohorte (tomografía computarizada de tórax y DLCO). No se observó ninguna relación entre los valores de IgM y las secuelas pulmonares, ya sea en pacientes que presentaron un TC alterado, DLCO alterado o ambos (Figura 16A). Sin embargo, la situación vuelve a ser distinta cuando se observa lo obtenido para anticuerpos IgG, ya que aquellos pacientes con TC alterado, es decir, en los cuales se reportaron secuelas estructurales, tienen niveles de anticuerpos significativamente más altos que pacientes no secuclados ($p= 0,0232$) (Figura 16B). Esta diferencia no se observa en pacientes que solo manifestaron secuelas funcionales (DLCO alterado), pero sí en aquellos con ambos parámetros alterados (TC y DLCO).

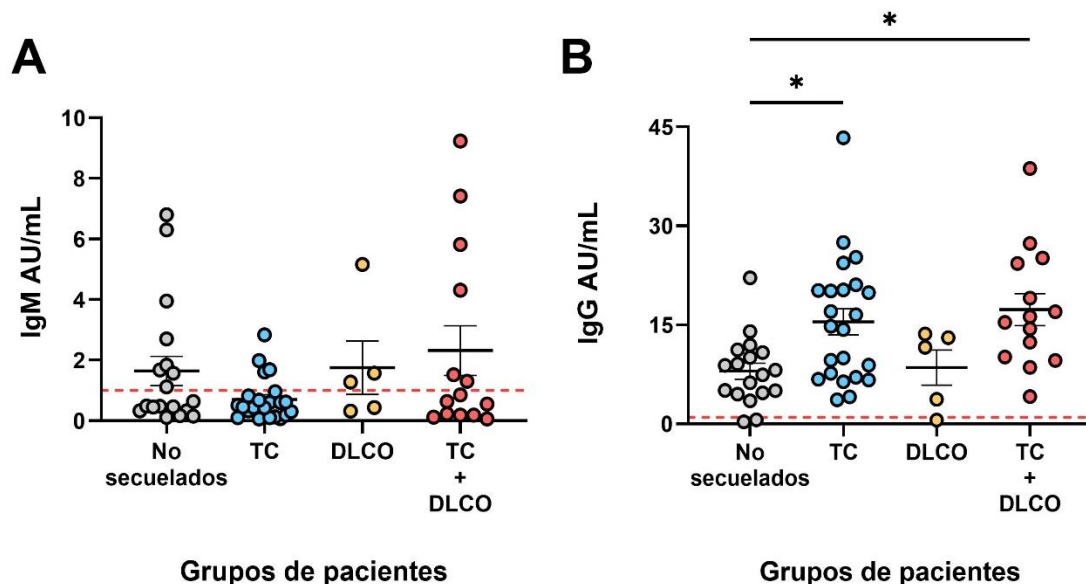


Figura 16: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelados.

A. Niveles de IgM según secuelas pulmonares tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgG según secuelas pulmonares tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

La última comparación se realizó con las alteraciones registradas en el metabolismo glucídico donde se incluyó resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 pre y post infección por COVID-19. Para anticuerpos IgM no se observaron diferencias entre los grupos de pacientes (Figura 17A), mientras que, para IgG, se observan niveles significativamente mayores para los pacientes que tenían registros de metabolismo glucídico alterado pre infección por COVID-19 en comparación con aquellos que tuvieron un metabolismo normal durante todo el estudio ($p=0,0046$) y también con aquellos que desarrollaron alguna alteración post COVID-19 ($p=0,0021$) (Figura 17B).

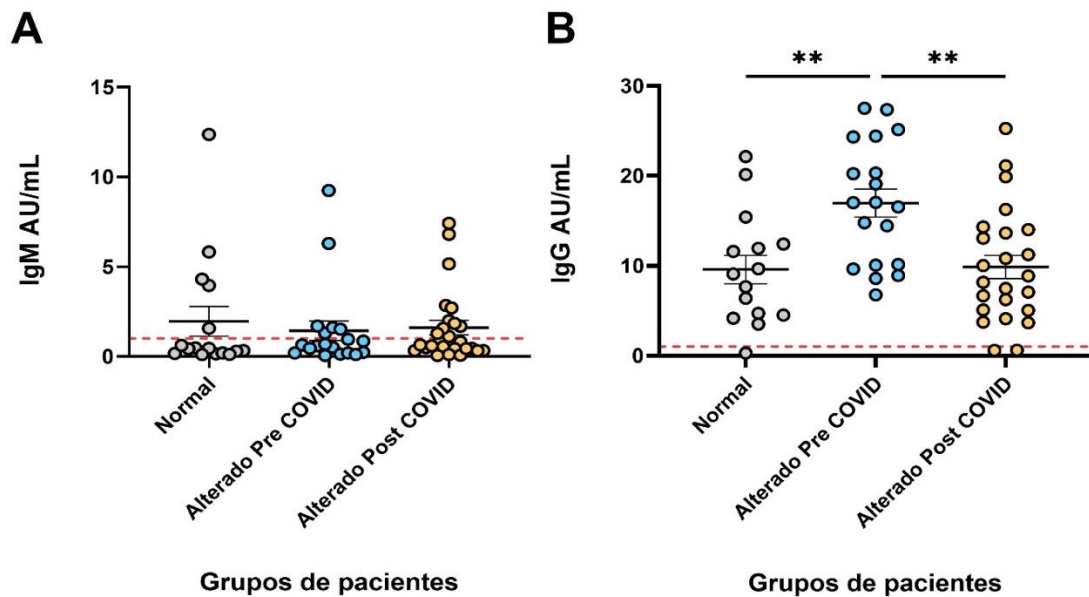


Figura 17: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección en pacientes con MG normal o alterado pre o post COVID-19.

A. Niveles de IgM según alteraciones en el metabolismo glucídico tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgG según alteraciones en el metabolismo glucídico tras 6 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. MG: Metabolismo glucídico.

8.3 Niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 a los 12 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.

La segunda toma de muestra fue realizada 12 meses post infección por COVID-19. Cabe aclarar que a esta fecha la mayoría de los participantes del estudio (75%) se encontraban ya vacunados con una o dos dosis de las vacunas Pfizer (28%) o Sinovac (72%) (Tabla 4). Es probable que exista un sesgo en estos resultados debido al proceso de vacunación, sin embargo, son presentados en esta tesis y fueron analizados con fines académicos.

Los niveles de anticuerpos IgM e IgG obtenidos a los 12 meses se analizaron de la misma forma que los obtenidos a los 6 meses. Así, la primera comparación realizada fue de acuerdo con la clasificación por severidad. Los datos recaudados muestran que para IgM no se observan diferencias entre los grupos (Figura 18A y B). Además, cabe mencionar que casi la totalidad de los pacientes, indiferente de su severidad, presentan valores IgM considerados no reactivos (<1.00 AU/mL). En este sentido en comparación a los 6 meses, todos los pacientes leves registran valores no reactivos (Figura 18A). Para IgG se observa algo similar a lo detectado a los 6 meses. Los valores de estos anticuerpos son significativamente mayores para pacientes severos en comparación con pacientes leves ($p=0,0119$), sin embargo, esta diferencia ya no se observa en pacientes que cursaron con COVID-19 moderado (Figura 18C y D).

Tabla 4: Detalle del esquema de vacunación alcanzado a los 12 meses post infección.

Paciente	Vacunado	No vacunado	Pfizer	Sinovac	Dosis	Fecha 1° dosis	Fecha 2° dosis
COVID-1	X			X	2	19-03-2021	16-04-2021
COVID-2		X			0		
COVID-3	X			X	2	22-03-2021	19-04-2021
COVID-4		X			0		
COVID-5	X			X	2	15-03-2021	06-05-2021
COVID-6		X			0		
COVID-7	X			X	2	09-02-2021	09-03-2021
COVID-8	X		X		2	24-05-2021	21-06-2021
COVID-9	X		X		2	25-12-2020	14-01-2021
COVID-10		X			0		
COVID-11		X			0		
COVID-12	X			X	2	17-03-2021	14-04-2021
COVID-13		X			0		
COVID-14	X		X		2	11-03-2021	08-04-2021
COVID-15	X		X		2	09-03-2021	06-04-2021
COVID-16	X			X	2	29-03-2021	03-05-2021
COVID-17		X			0		
COVID-18		X			0		
COVID-19		X			0		
COVID-20		X			0		
COVID-21		X			0		
COVID-22	X			X	2	15-02-2021	15-03-2021
COVID-23	X			X	2	04-02-2021	04-02-2021
COVID-24	X			X	2	12-03-2021	09-04-2021
COVID-25	X		X		2	25-12-2020	09-04-2021
COVID-26	X			X	2	09-03-2021	06-04-2021
COVID-27	X		X		2	10-03-2021	08-04-2021
COVID-28	X			X	2	12-02-2021	12-03-2021
COVID-29	X			X	2	09-02-2021	09-03-2021
COVID-30	X			X	1	18-03-2021	
COVID-31	X			X		07-04-2021	09-05-2021

COVID-32		X					
COVID-33	X		X		2	26-02-2021	26-03-2021
COVID-34	X		X		2	17-01-2021	17-02-2021
COVID-35	X			X	2	23-03-2021	20-04-2021
COVID-36	X			X	2	18-03-2021	15-04-2021
COVID-37	X		X		2	11-06-2021	09-07-2021
COVID-38		X			0		
COVID-39	X			X	2	17-03-2021	17-04-2021
COVID-40		X			0		
COVID-41	X		X		1	24-05-2021	
COVID-42	X			X	2	11-03-2021	02-04-2021
COVID-43	X			X	2	11-03-2021	08-04-2021
COVID-44	X			X	2	03-02-2021	03-03-2021
COVID-45	X			X	2	15-02-2021	15-03-2021
COVID-46	X			X	2	09-02-2021	09-02-2021
COVID-47		X			0		
COVID-48	X			X	2	15-02-2021	15-03-2021
COVID-49	X			X	2	02-03-2021	30-03-2021
COVID-50	X			X	2	02-03-2021	01-04-2021
COVID-51	X		X		2	10-03-2021	09-04-2021
COVID-52	X		X		2	25-02-2021	18-03-2021
COVID-53	X			X	2	12-03-2021	12-04-2021
COVID-54	X			X	2	15-02-2021	15-03-2021
COVID-55	X			X	2	15-02-2021	15-03-2021
COVID-56	X			X	2	29-03-2021	26-04-2021
COVID-57	X		X		2	10-05-2021	07-06-2021
COVID-58	X			X	2	13-02-2021	13-03-2021
COVID-59	X			X	2	03-02-2021	03-03-2021
COVID-60	X			X	2	03-02-2021	03-03-2021

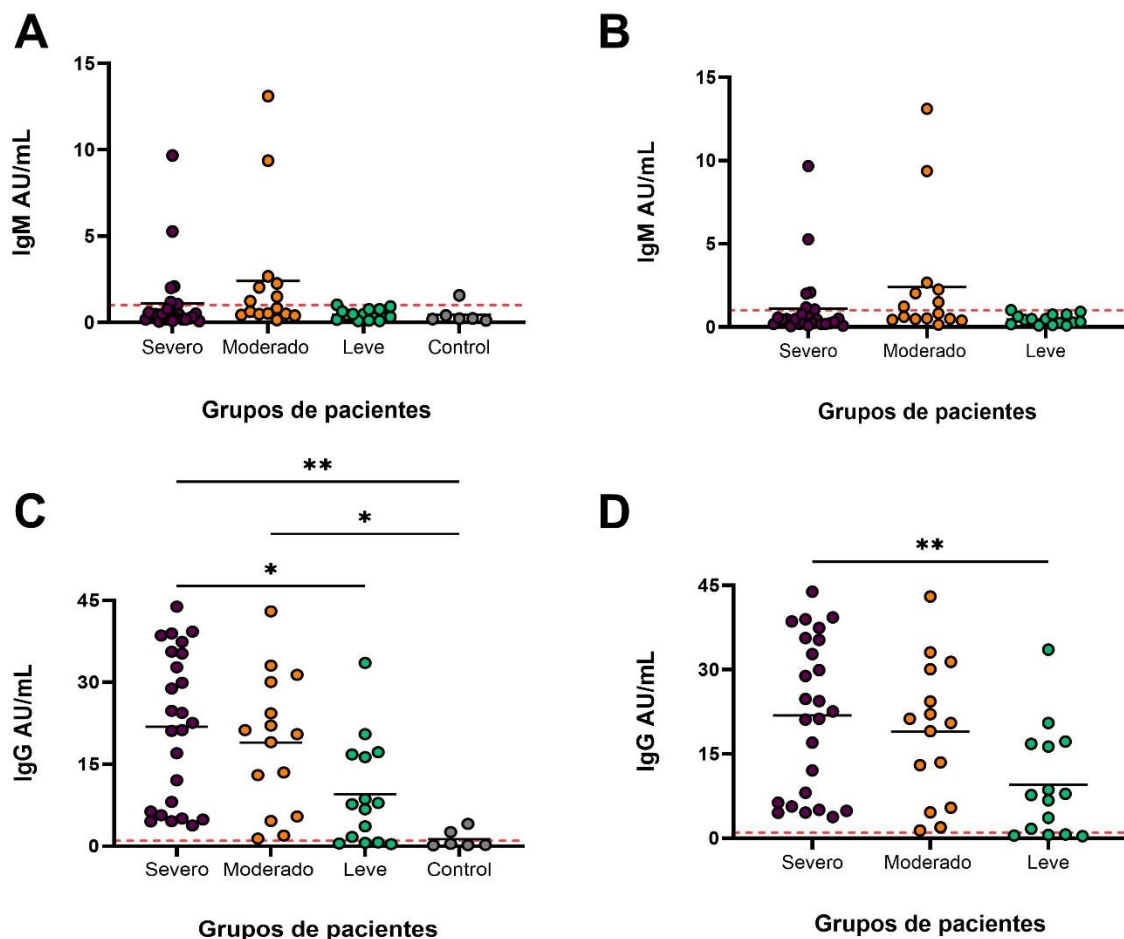


Figura 18: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes severos, moderados y leves.

A. Niveles de IgM según severidad tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgM según severidad tras 12 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. **C.** Niveles de IgG según severidad tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. **D.** Niveles de IgG según severidad tras 12 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. La línea roja

punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente.

En cuanto a la distribución de los pacientes según el padecimiento o no de ARDS durante la infección, para IgM nuevamente no se observa ninguna diferencia (Figura 19A y B). Algo similar ocurre para IgG donde el haber cursado distrés respiratorio ya no se encuentra asociado a la mayor producción de los niveles de anticuerpos (Figura 19C). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico sin el grupo control (Figura 19D) se puede observar que se la diferencia entre los grupos se vuelve significativa, aunque en menor medida que a los 6 meses (Figura 15D).

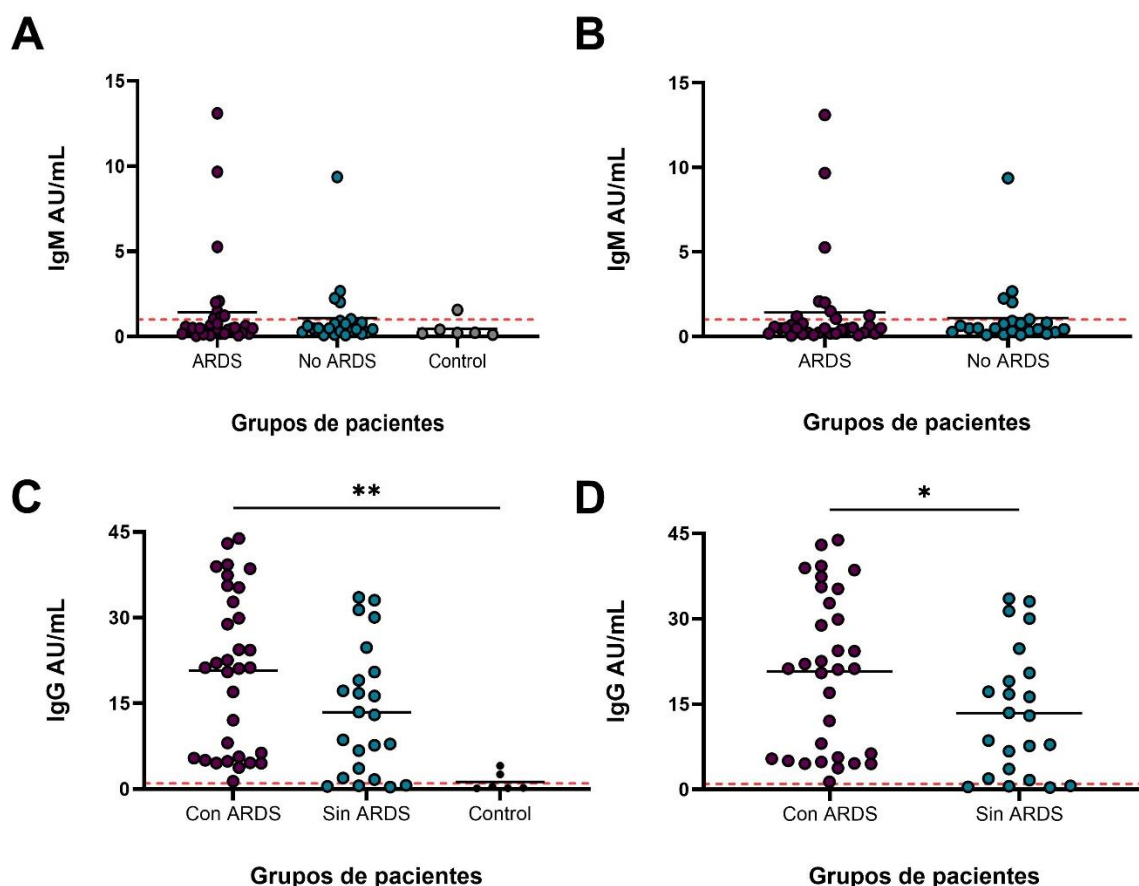


Figura 19: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.

A. Niveles de IgM según padecimiento de ARDS tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgM según padecimiento de ARDS tras 12 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. **C.** Niveles de IgG según padecimiento de ARDS tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. **D.** Niveles de IgG según padecimiento de ARDS tras 12 meses luego del comienzo de la infección sin grupo control. La línea roja punteada indica el

valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados de A y C se aplicó una prueba ANOVA, mientras que para B y D se realizó la prueba de Mann-Whitney. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Tras realizar los análisis de acuerdo con las secuelas pulmonares, para anticuerpos IgM a los 12 meses, no se observan diferencias significativas relacionadas a ningún tipo de secuela, ya sea estructural (TC), funcional (DLCO) o ambas (TC y DLCO) (Figura 20A).

En relación con los anticuerpos IgG, tampoco se observan diferencia entre los 3 grupos (Figura 20B) a diferencia de lo observado a los 6 meses en donde estos anticuerpos tenían valores más altos en pacientes con secuelas pulmonares estructurales. En esta ocasión, se observa una gran dispersión en la gráfica y niveles similares entre los grupos.

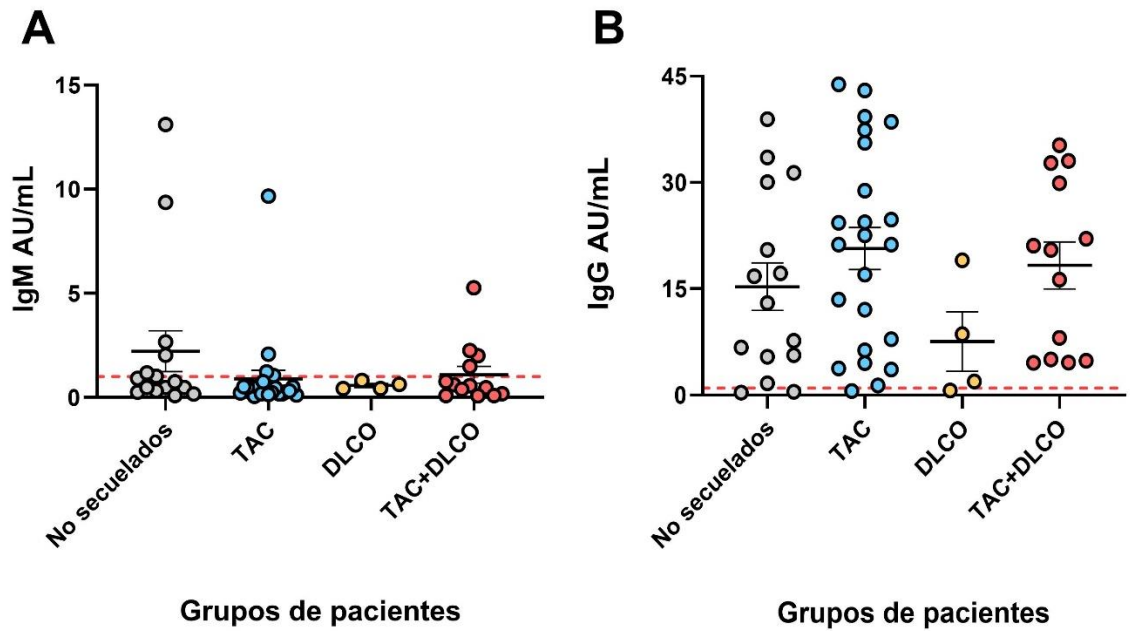


Figura 20: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con secuelas pulmonares y no secueles.

A. Niveles de IgM según secuelas pulmonares tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgG según secuelas pulmonares tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

Finalmente, en relación con las alteraciones en el metabolismo glucídico, estas no influyeron en la producción de ninguno de las dos clases de anticuerpos. Para anticuerpos IgM no se observan diferencias entre los grupos y nuevamente se observa que la mayoría de los valores se encuentran bajo 1 AU/mL, considerándose no reactivos (Figura 21A). En el caso de IgG, nuevamente se perdió la diferencia observada a los 6 meses para anticuerpos IgG, por lo que ya no se observan diferencias y la producción de estos es muy similar en todos los grupos (Figura 21B)

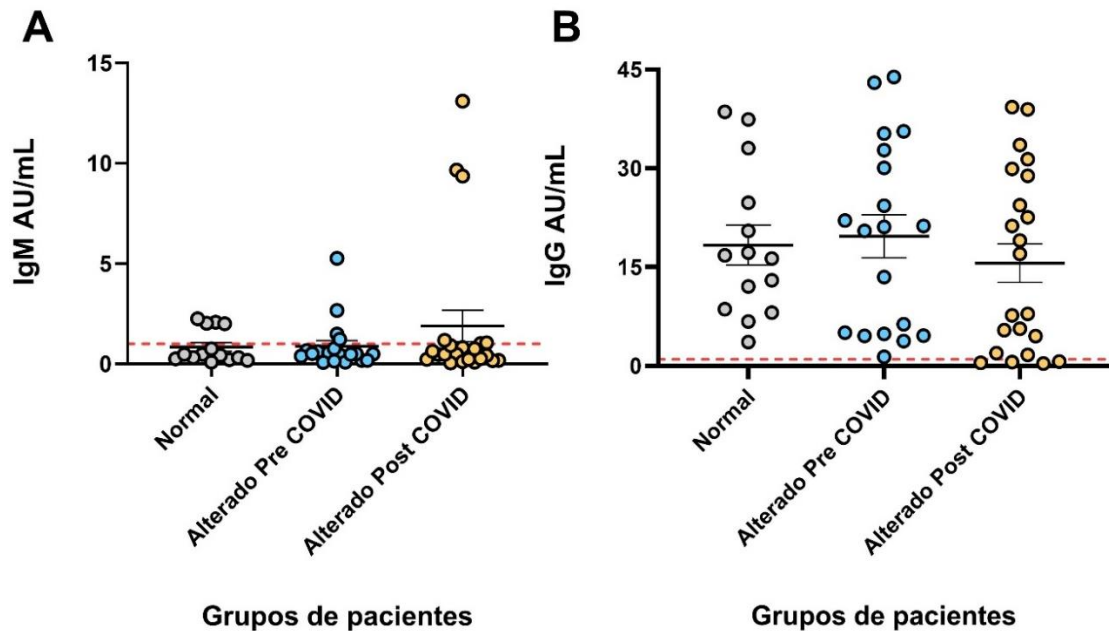


Figura 21: Niveles séricos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con MG normal o alterado pre o post COVID-19.

A. Niveles de IgM según alteraciones en el metabolismo glucídico tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA indirecto. **B.** Niveles de IgG según alteraciones en el metabolismo glucídico tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA de captura. La línea roja punteada indica el valor en que los resultados son considerados reactivos (≥ 1.00 AU/ mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. MG: Metabolismo glucídico.

8.4 Niveles de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 a los 12 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.

La medición de anticuerpos neutralizantes solo se realizó a los 12 meses post infección. Es por esta razón los valores obtenidos podrían encontrarse sesgados también por efecto del proceso de vacunación del cual los pacientes fueron partícipes aproximadamente 3 meses antes de la toma de muestra (Tabla 4). Sin embargo, estos datos fueron tratados estadísticamente y son presentados en esta tesis.

La primera relación se realizó con los grupos definidos por severidad, donde si bien, no se observaron diferencias significativas entre pacientes pertenecientes a los grupos severos, moderados y leves (Figura 22), sí se obtuvieron tras realizar el análisis en pacientes que cursaron o no con distrés respiratorio durante el cuadro (Figura 23). Se observa entonces que aquellos pacientes que fueron diagnosticados con ARDS presentan valores significativamente mayores de anticuerpos neutralizantes que aquellos que no ($p=0,0001$), relación que se condice con los hallazgos encontrados para anticuerpos IgG a los 6 meses luego del comienzo de la infección por SARS-CoV-2.

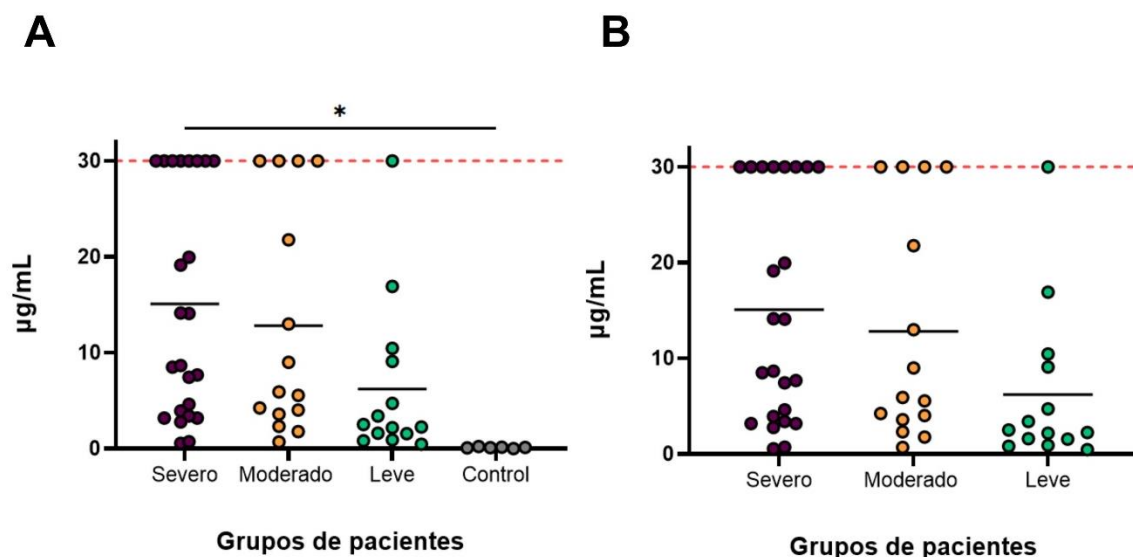


Figura 22: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección según la severidad de COVID-19.

A. Niveles de anticuerpos neutralizantes tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA competitivo en pacientes leves, moderados y severos. **B** Niveles de anticuerpos neutralizantes tras 12 meses luego del comienzo de la infección en pacientes leves, moderados y severos sin grupo control. La línea roja punteada indica el valor de detección máximo permitido por el kit (30 $\mu\text{g/mL}$). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

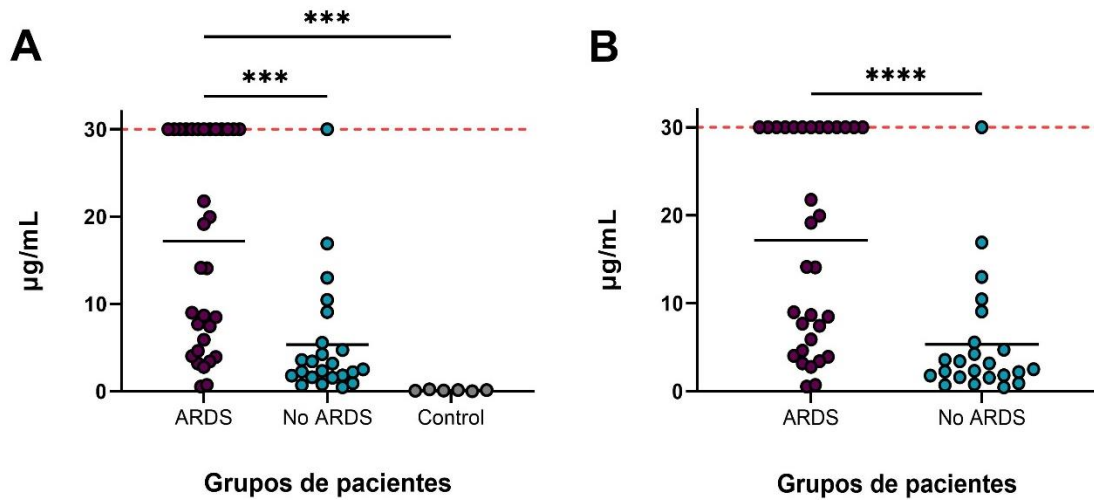


Figura 23: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes que padecieron o no ARDS.

A. Niveles de anticuerpos neutralizantes tras 12 meses luego del comienzo de la infección determinados mediante CLIA competitivo en pacientes que padecieron o no ARDS. **B.** Niveles de anticuerpos neutralizantes tras 12 meses luego del comienzo de la infección en pacientes que padecieron o no ARDS sin grupo control. La línea roja punteada indica el valor de detección máximo permitido por el kit (30 $\mu\text{g/mL}$). Para el análisis estadístico de los resultados de A se aplicó una prueba ANOVA, mientras que para B se realizó la prueba de Mann-Whitney. Para ambas se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

En relación con las secuelas pulmonares, aquellos pacientes que presentaron una TC de tórax alterada evidenciando daño estructural en sus pulmones tienen valores de anticuerpos neutralizantes mayores que aquellos pacientes que no cursaron con ningún tipo de secuela pulmonar ($p=0,0079$). Esta diferencia también se observó en aquellos pacientes en donde se reportaron secuelas tanto funcionales como estructurales ($p= 0,0135$), sin embargo, no se observan en pacientes que solo cursaron con secuelas funcionales (DLCO) (Figura 24). Además, estos hallazgos son muy similares a los observados para anticuerpos IgG a los 6 meses luego del comienzo de la infección (Figura 16B).

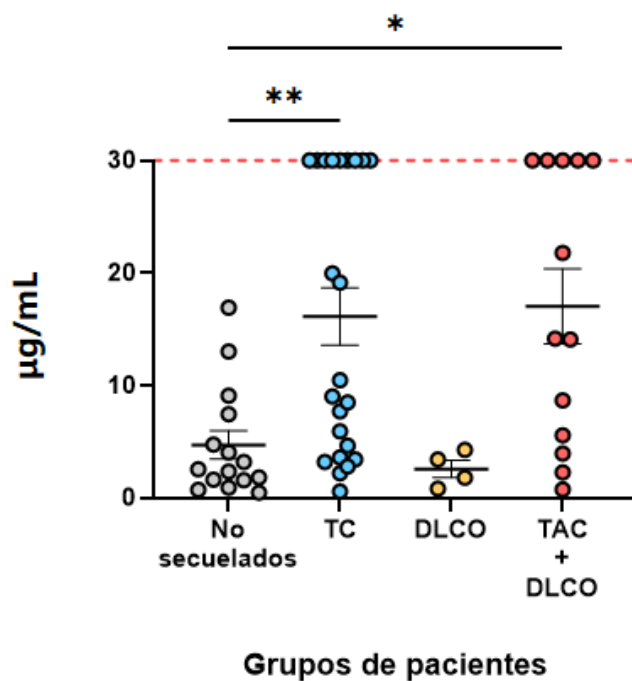


Figura 24: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con secuelas pulmonares y no secuelas.

Niveles determinados mediante CLIA competitivo. La línea roja punteada indica el valor de detección máximo permitido por el kit (30 µg/mL). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

De acuerdo con las alteraciones del metabolismo glucídico, se observó que los pacientes con antecedentes de RI o DM2 pre infección por COVID-19 tenían mayores niveles de anticuerpos neutralizantes que aquellos que no cursaron con alteraciones en el metabolismo glucídico ($p=0,0051$) y también mayores que aquellos que presentaron RI o DM2 como secuela tras la enfermedad ($p=0,0037$) (Figura 25). Además, estos hallazgos son muy similares a las relaciones observadas con la producción de anticuerpos IgG a los 6 meses post infección (Figura 17B).

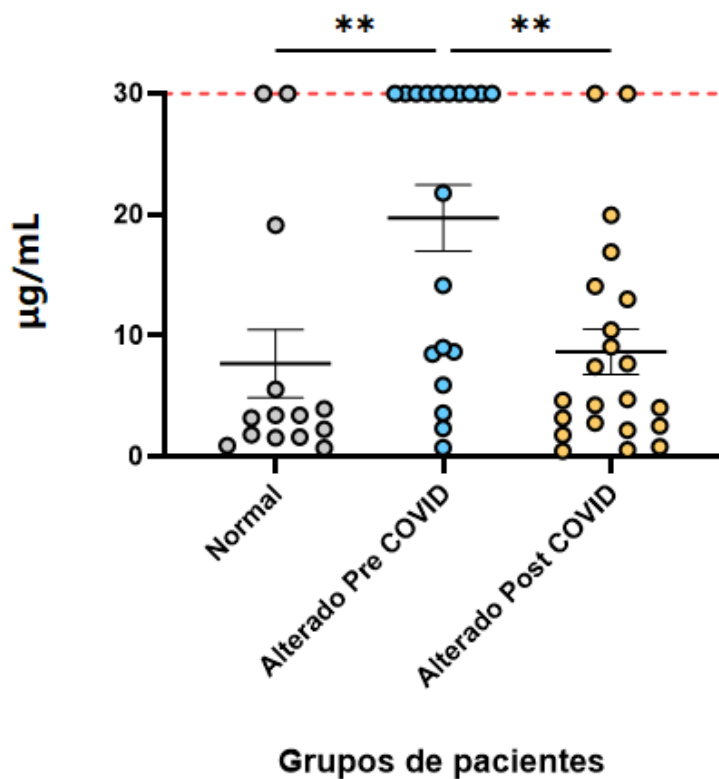


Figura 25: Niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 luego de 12 meses post infección en pacientes con MG normal o alterado pre o post COVID-19.

Niveles determinados mediante CLIA competitivo. La línea roja punteada indica el valor de detección máximo permitido por el kit (30 $\mu\text{g/mL}$). Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias. CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente. MG: Metabolismo glucídico.

8.5 Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 a los 6 meses post infección y su asociación con la severidad cursada durante la COVID-19.

Para determinar el porcentaje de las células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 se analizaron los datos obtenidos luego de realizar la citometría de flujo mediante el software FlowJo 7.6. En la Figura 26, se muestra la estrategia de *gating* utilizada en donde primero se realizó la selección de linfocitos según su tamaño y granularidad (Figura 26A) y luego la determinación del singlete para descartar agregados celulares (Figura 26B). A partir esta población, se seleccionaron las células positivas para CD20, separándolas en CD20+ (que corresponden a células B) y CD20- (Figura 26C). De las células B CD20+, se determinó la población de interés que corresponde a las células B RBD+. Para ello, se utilizó la muestra control como referencia para realizar el *gating* (Figura 26D) quedando determinada la presencia de estas células gracias al reconocimiento de los tetrámeros (RBD-PE y RBD-PE-Vio 770) por parte de las células B antígeno específicas para RBD (Figura 26E).

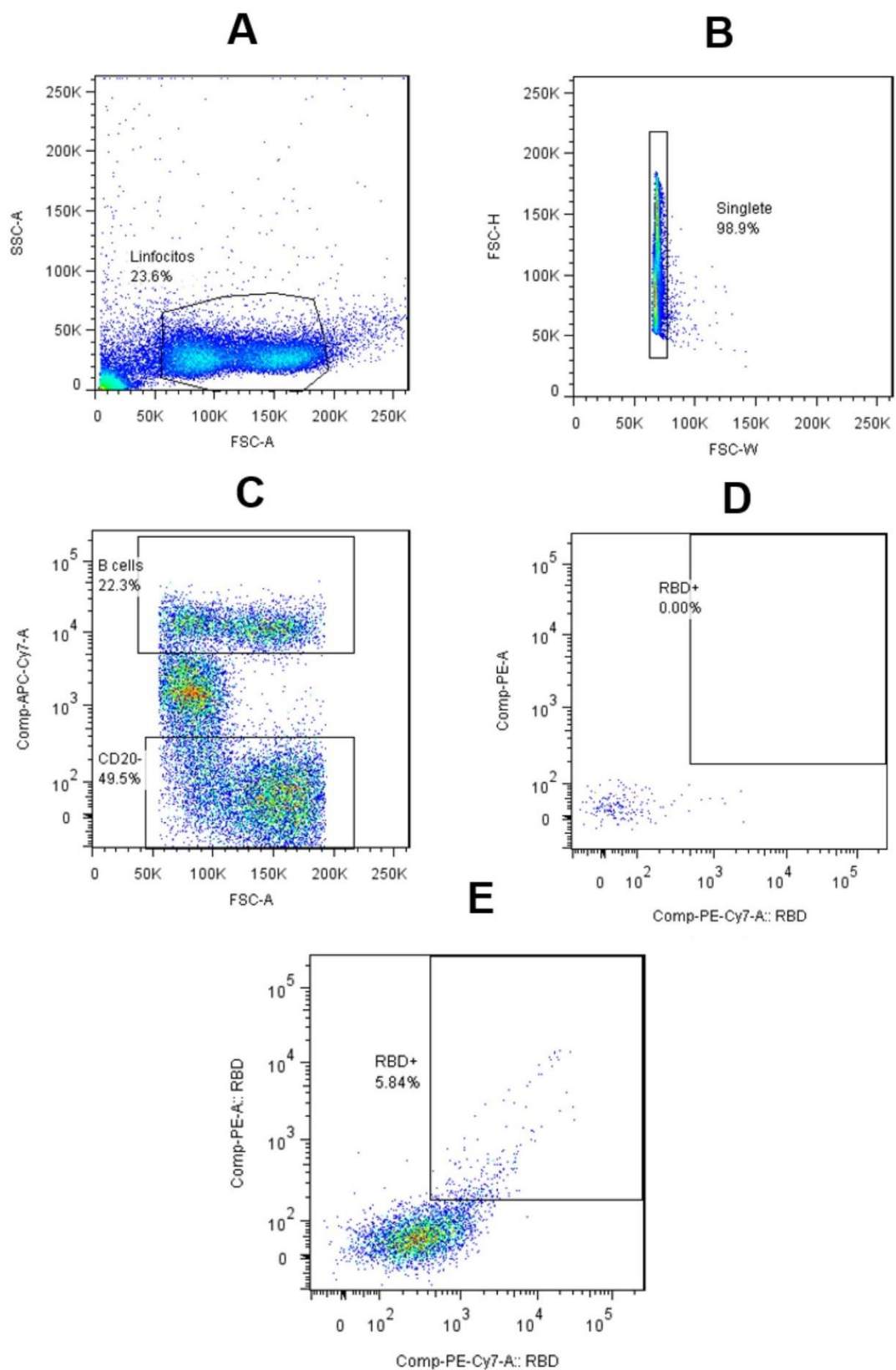


Figura 26: Estrategia de *gating* utilizada para seleccionar la población total de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2.

A. Selección de la población de linfocitos. **B.** Selección del singlete. **C.** Selección de células CD20+ (células B). **D.** Muestra control para las células B RBD+. Se observa que ninguna célula logra reconocer los tetrámeros RBD. **E.** Muestra al azar que evidencia la población de células B RBD+ que reconocen ambos tetrámeros (RBD-PE y RBD-PE-Vio 770).

A continuación, se procedió a separar la subpoblación de células B IgM⁺ RBD⁺ e IgG⁺ RBD⁺. Para esto, desde la población de células BCD20⁺ (Figura 27A), se realizó la selección de las células CD20⁺IgM⁺ utilizando el marcaje con los anticuerpos anti-IgG y anti-IgM (Figura 27B). Así, desde la población de células CD20⁺IgM⁺ se utilizó el marcaje con ambos tetrámeros RBD para poder seleccionar a las células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 (Figura 27C). Proceso similar se realizó con las células CD20⁺IgG⁺, seleccionándose desde esta población las células que respondían específicamente a RBD (Figura 27D).

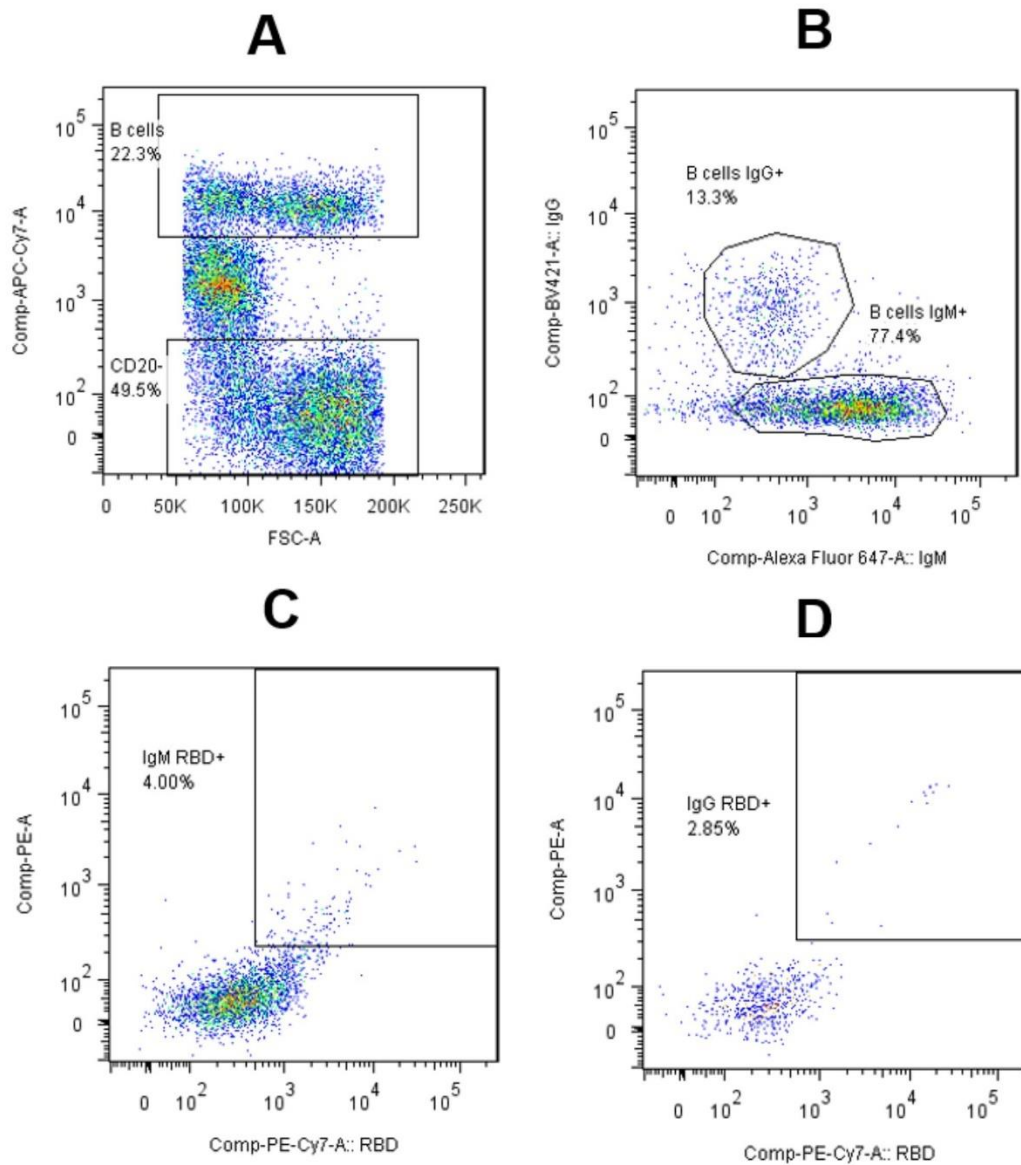


Figura 27: Estrategia de *gating* utilizada para seleccionar las subpoblaciones de células B IgM+ e IgG+ RBD específicas anti-SARS-CoV-2.

A. Selección de células CD20+. **B.** Selección de células IgM+ o IgG+. **C.** Selección de la población de células IgM+RBD+. **D.** Selección de la población de células IgG+RBD+.

Luego, se procedió a separar a la subpoblación de células B de memoria (CD27+) y *naive* (CD27-) específicas para el RBD del SARS-CoV-2. Nuevamente, partiendo desde las células CD20+ (Figura 28A), se seleccionaron aquellas células positivas para CD27 (Figura 28B). De estas, a su vez se seleccionaron aquellas capaces de responder a los dos tetrámeros de RBD, aislando la población de células B CD27+RBD+ (Figura 28C). Lo mismo se hizo con las células CD27-, seleccionando desde esa población a las que respondían a RBD, clasificándolas como CD27-RBD+ (Figura 28D).

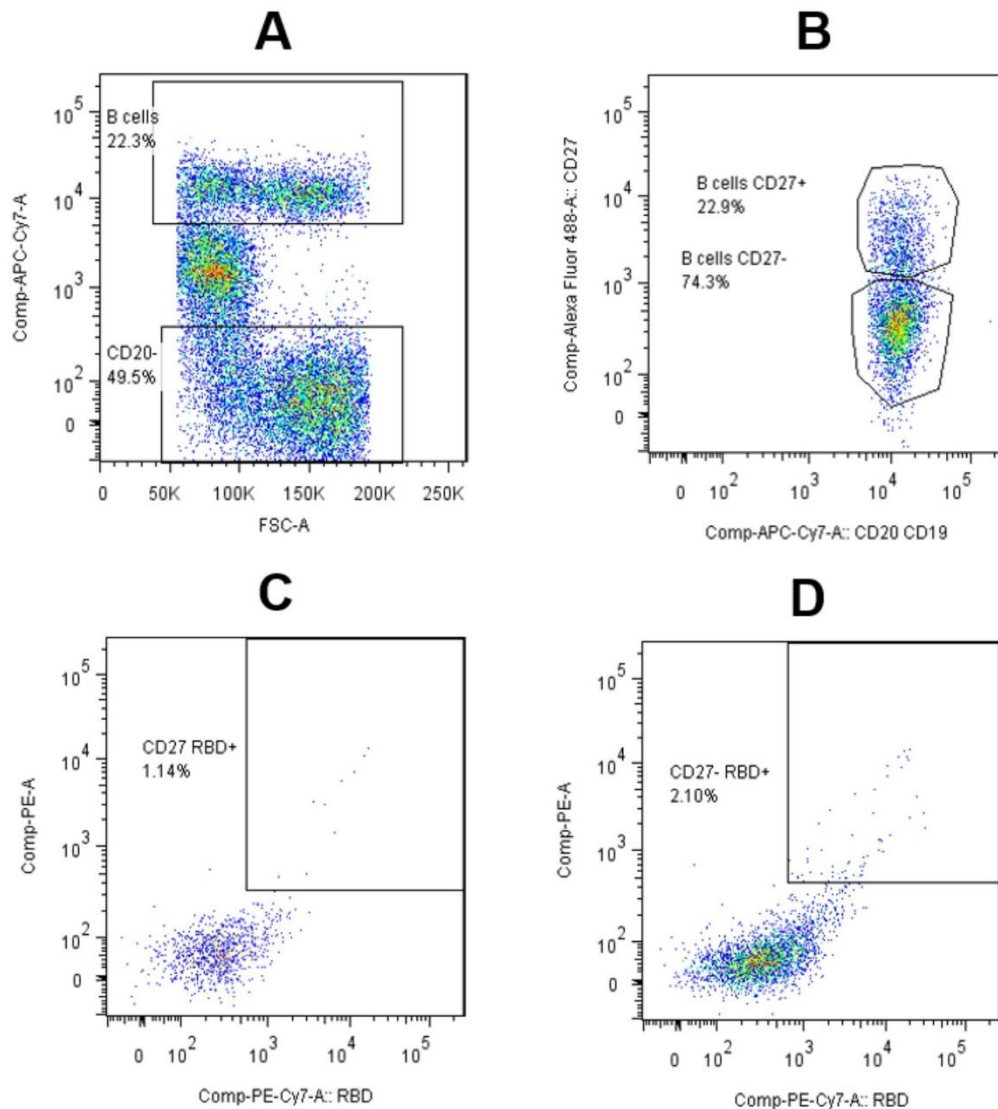


Figura 28: Estrategia de *gating* para la selección de células RBD+CD27+ y RBD+CD27-.

A. Selección de células CD20+. **B.** Selección de células CD27+ o CD27-. **C.** Selección de la población de células CD27+ RBD+. **D.** Selección de la población de células CD27- RBD+.

Una vez determinadas las células correspondientes a cada población analizar (RBD+, IgM+ RBD+, IgG+ RBD+, CD27+ RBD+ y CD27- RBD+), se realizó el análisis de las células B RBD específicas totales anti-SARS-CoV-2 con los parámetros de severidad antes utilizados. Así, tras analizar el porcentaje de células B RBD+ entre los distintos grupos de pacientes (leves, moderados y severos), no se observa ninguna relación o diferencia significativa. Incluso se observan valores similares entre los 3 grupos (Figura 29A).

Luego, se procedió a realizar el análisis con los pacientes que padecieron y no padecieron ARDS donde nuevamente no se encontró ninguna relación o diferencia relevante entre ambos grupos de pacientes (Figura 29B).

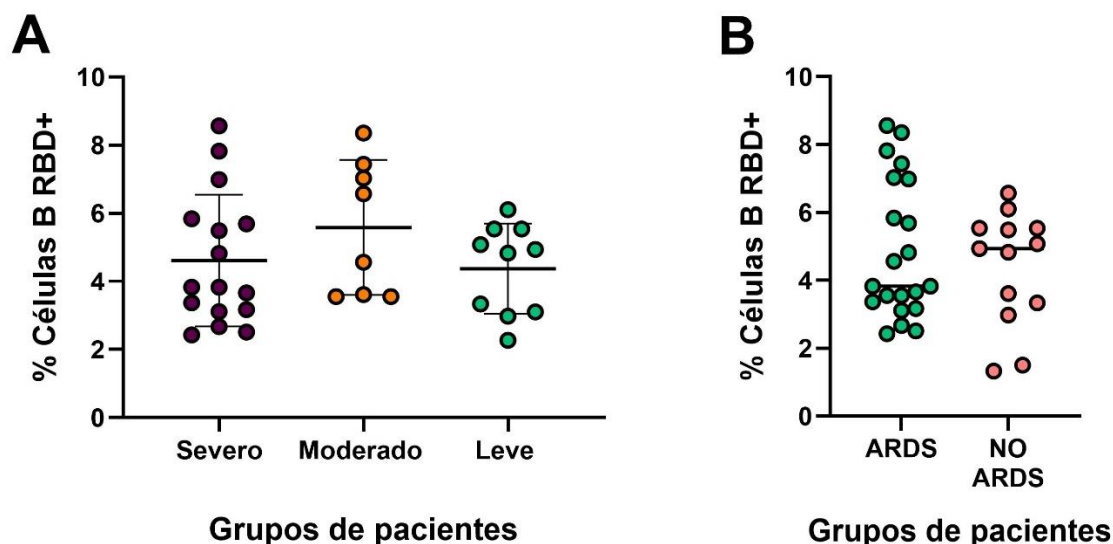


Figura 29: Porcentaje de la población de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección según severidad.

A. Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses en pacientes leves, moderados y severos. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. **B.** Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses en pacientes que padecieron o no ARDS. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba t con corrección de Welch en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. ARDS: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Posteriormente, se hizo el análisis de la población de células B RBD+ anti-SARS-CoV-2 y su relación con las secuelas pulmonares (TC y DLCO) y alteraciones metabólicas (RI y DM2 pre o post COVID-19) reportadas por los pacientes. En cuanto a las secuelas pulmonares, tanto estructurales como funcionales, no se observó ningún tipo de diferencia entre los grupos (Figura 30A). Lo mismo ocurrió en los pacientes con metabolismo glucídico alterado, previo o posterior a la COVID-19, donde en ninguno de los grupos analizados se obtuvieron valores significativamente mayores (Figura 30B).

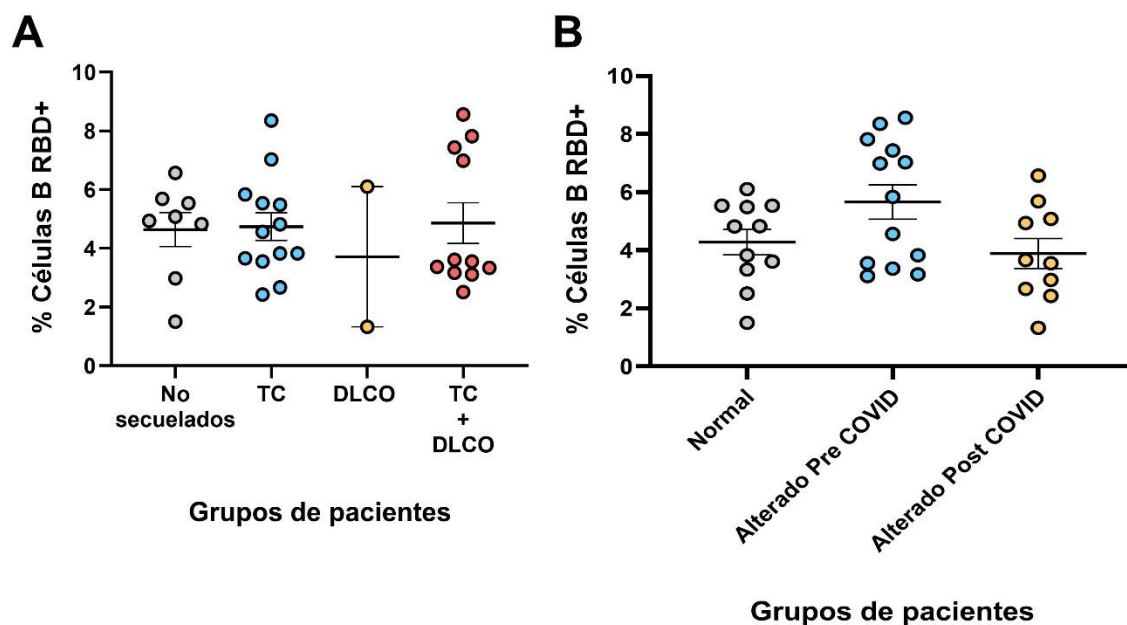


Figura 30: Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección según secuelas pulmonares y alteraciones metabólicas pre o post COVID-19.

A. Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección según secuelas pulmonares (TC y DLCO). **B.** Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección según alteraciones metabólicas (RI y DM2) registradas pre o post COVID-19. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba ANOVA, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. TC: Tomografía computarizada. DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono. RI: Resistencia a la insulina. DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2.

A continuación se correlacionaron los niveles de anticuerpos IgM e IgG con el porcentaje de células B RBD específicas. Para IgM se observa una correlación muy baja con un valor $r=0.3031$ y un valor $p=0.08138$ (Figura 31A), mientras que para IgG la correlación es casi nula obteniéndose un valor $r=0,06541$ y un valor $p=0.7132$ (Figura 31B).

Con el fin de demostrar que las 34 muestras analizadas presentaban un porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 mayor a 0 luego de 6 meses tras la infección, se realizó el análisis presentado en la Figura 32. Los pacientes muestran en promedio un porcentaje de 4,7 células B RBD+ específicas, siendo el menor un valor de 1,3% y el mayor 8,6%.

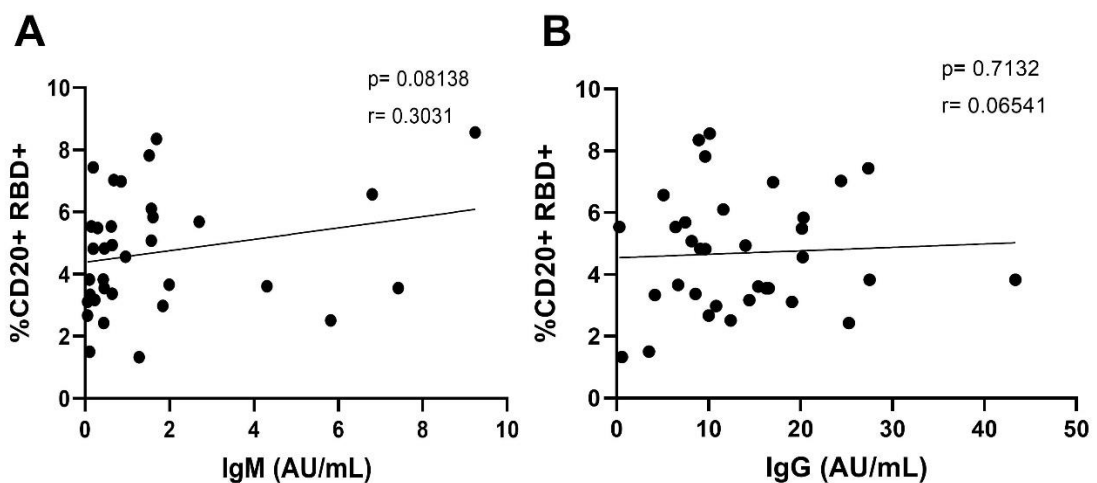


Figura 31: Correlación entre los niveles de anticuerpos IgM o IgG y el porcentaje de células B RBD específicas (CD20+RBD+) 6 meses luego de la infección.

A. Correlación con IgM. **B.** Correlación con IgG. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba de correlación de Spearman, en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$. AU: Unidades arbitrarias.

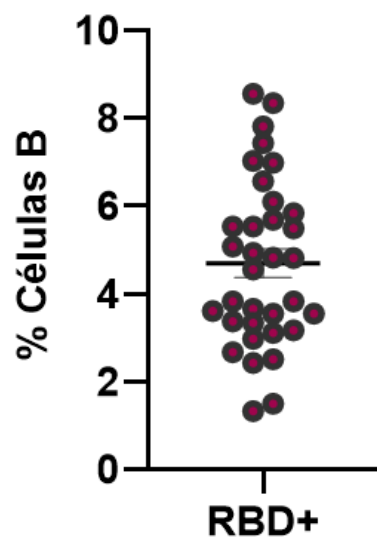


Figura 32: Porcentaje de células B RBD específicas anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección.

Gráfico que representa el análisis del porcentaje de células B anti RBD por citometría de flujo en los pacientes chilenos que padecieron COVID-19.

Finalmente, el último análisis que se hizo fue comparar las subpoblaciones de células B RBD específicas: IgM+ RBD+ con IgG+ RBD+ (Figura 33A) y CD27+ RBD+ con CD27- RBD+ (Figura 33B).

Se obtuvo que la población de células B IgM+ RBD+ es significativamente mayor en pacientes convalecientes a los 6 meses luego de la infección por COVID-19 que la población de células B IgG+ RBD+ ($p= 0,0004$). Mientras que no se observaron diferencias significativas para la comparación entre las poblaciones de células CD27+ RBD+ y CD27- RBD+.

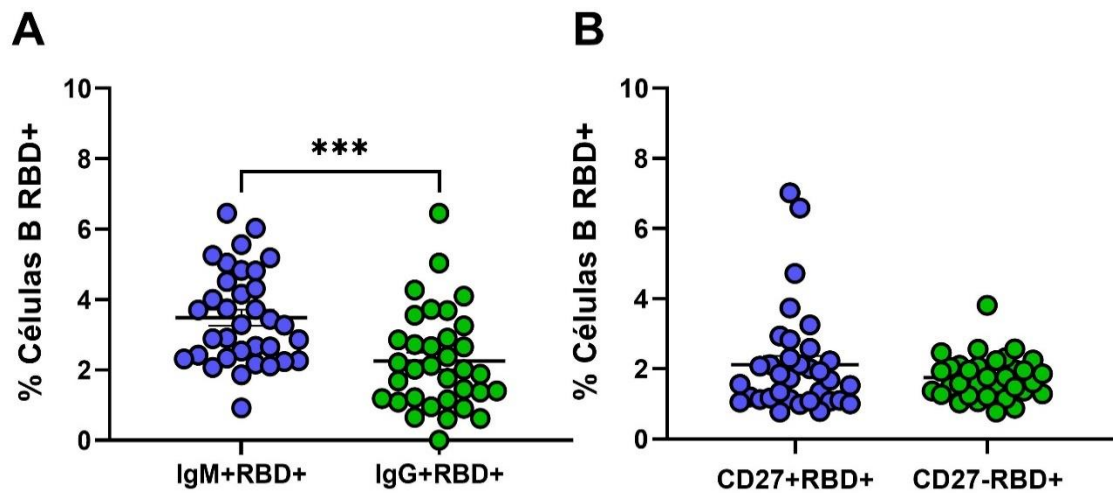


Figura 33: Subpoblaciones de células B RBD específicas anti-SARS-COV-2 a los 6 meses post infección por COVID-19.

A. Comparación de la subpoblación IgM+RBD+ con la subpoblación IgG+RBD+.

B. Comparación de la subpoblación CD27+RBD+ con la subpoblación CD27-RBD+. Para el análisis estadístico se aplicó una prueba t en donde se consideró significativo un valor $p < 0,05$

DISCUSIÓN

En la data preliminar recolectada sobre la producción de anticuerpos tras la enfermedad provocada por el virus SARS-CoV-2, aún no se determina con claridad qué relación tienen éstos, ya sean IgM o IgG, con la severidad con que los pacientes cursan el cuadro infeccioso ni tampoco el rol que estos juegan en la respuesta inmune. Es por esta razón que es de esencial importancia indagar aún más en esta temática, aportando información de distintas poblaciones que sirva para complementar las investigaciones chinas, europeas y estadounidenses que conforman la gran mayoría de las publicaciones existentes hasta la fecha.

En este contexto, los resultados obtenidos sobre la medición de anticuerpos IgM e IgG 6 meses post infección por COVID-19 indican dos cosas muy claras. Por un lado, sin importar la severidad de la sintomatología de cada paciente, se puede observar en la Figura 14A que la mayoría de los pacientes posee niveles para IgM bajo el límite de detección, por lo que 6 meses luego de la infección los pacientes chilenos convalecientes de COVID-19 disminuyen la producción de IgM a niveles basales, resultado que se condice con lo observado en otras investigaciones en las cuales los hallazgos indican que cerca de 40 a 50 días, los niveles de IgM anti-SARS-CoV-2 comienzan a decrecer hacia los niveles de base (Hou et al., 2020; Tan et al, 2020). Por otro lado, la mayoría de los pacientes, independiente de la severidad, presentan niveles de IgG sobre el límite de

detección (Figura 14C), resultado que perpetúa la presencia de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 luego de 6 meses post infección (Jiang et al., 2022).

Ahora, en relación con las diferencias observadas de acuerdo con la severidad, los niveles de anticuerpos IgG a los 6 meses post infección son significativamente mayores en pacientes severos y moderados en comparación a los leves (Figura 14C). Esta diferencia que se ve favorecida por el haber presentado un cuadro más severo en el transcurso de la fase aguda de la enfermedad, también se condice con lo ya publicado, en donde se ha reportado que el requerimiento de oxígeno suplementario o tener síntomas más agresivos como fiebre alta por más de 3 días (García-González et al., 2021) favorece la producción de anticuerpos. Sin embargo, esto también es un punto de discrepancia con investigadores que señalan que no existen diferencias según severidad o bien, que la diferencia favorece a los grupos con sintomatología más leve (To et al., 2020; Zeng et al., 2020). En este contexto, cabe resaltar que en la mayoría de estos trabajos se detectan anticuerpos específicos para las proteínas más inmunogénicas del SARS-CoV-2 (N y S) (Sun et al., 2020), sin embargo, en el caso de la investigación realizada, los anticuerpos IgM e IgG responden a ambas proteínas o, en su defecto, al virus en general, por lo que esta podría ser una limitación a la hora de comparar los resultados obtenidos.

Por otro lado, la gravedad del cuadro infeccioso vuelve a ser relevante al analizar el comportamiento de los anticuerpos. En la comparación de los niveles de

anticuerpos IgG e IgM a los 6 meses post infección, según el padecimiento del síndrome de distrés agudo (ARDS), no se observan diferencias para IgM (Figura 15A), pero para IgG sí se observan diferencias estadísticamente importantes (Figura 15C), que favorecen a aquellos pacientes que cursaron con distrés respiratorio. El padecimiento de distrés respiratorio durante el cuadro infeccioso por SARS-CoV-2 está asociado a una mayor gravedad y en gran parte de los casos, también se traduce en mayor mortalidad (Hussain et al., 2021), lo que valida este resultado. Además, Notz y colaboradores realizaron un estudio observacional en pacientes severos internados en la UCI del Hospital Universitario de Würzburg en donde indicaron que la producción de anticuerpos IgG, no se ve obstaculizada por la severidad o el diagnóstico de ARDS y que incluso estos aumentan junto con el pasar de los días en hospitalización (Notz et al., 2020).

Al relacionar los niveles de anticuerpos 6 meses post infección con las secuelas pulmonares evaluadas, funcionales o estructurales, se observó que los anticuerpos IgG están relacionados con presentar una TC de tórax alterada, lo que es indicio de daño estructural pulmonar, o bien tener ambos parámetros alterados (TC y DLCO). Durante la pandemia, varios estudios han intentado relacionar las observaciones anormales de la TC de tórax y la presencia de anticuerpos IgM o IgG con fines diagnósticos y métodos alternativos al RT-qPCR, indicándose que existía una relación entre la tasa de hallazgos en la TC y en

presentar anticuerpos positivos para SARS-CoV-2 (Ozturk et al., 2021), lo que podría marcar un precedente en la relación de ambos factores.

Por otro lado, el daño y la falla pulmonar evidenciada en pacientes COVID-19 se ha asociado a una desregulación en la respuesta inmune. Dentro de este contexto, se ha asociado la exacerbada respuesta de la vía del complemento con el curso clínico hacia un estadio más severo en pacientes COVID-19. Holter y colaboradores analizaron un amplio espectro de componentes de activación de la vía del complemento en 39 pacientes hospitalizados por COVID-19. Entre sus resultados se destaca que los pacientes con insuficiencia respiratoria al momento de ingreso al hospital mostraron niveles significativamente más altos de sC5b-9 y C4d en comparación con los pacientes sin insuficiencia respiratoria. El mismo patrón se observó al incluir pacientes que desarrollaron insuficiencia respiratoria durante la estancia hospitalaria, es decir, sC5b-9 y C4d fueron significativamente mayores en estos que en pacientes que nunca experimentaron insuficiencia respiratoria. También descubrieron que el aumento de C4d estaba relacionado con el requerimiento de oxígeno mientras que sC5b-9 con la falla pulmonar severa acorde a padecimiento de ARDS. Estos parámetros también se encontraban relacionados con una mayor respuesta de anticuerpos IgM e IgG contra la proteína N. Por lo tanto, si bien los anticuerpos contra COVID-19 tienen un rol beneficioso al neutralizar el virus, también pueden jugar un rol perjudicial al contribuir a la sobreactivación de la vía clásica del sistema complemento y, por ende, a la generación de daño tisular (Holter et al., 2020). Otro estudio reciente

incluyó a 180 pacientes convalecientes de COVID-19 en los cuales estudiaron la respuesta a anticuerpos contra RBD y la presencia de mediadores de la vía del complemento. Los investigadores observaron que la respuesta de IgG anti-RBD del SARS-CoV-2 después de la infección natural parecía estar impulsada principalmente por las subclases IgG1 e IgG3, que son los principales ligandos para la activación de la vía clásica del complemento mediada por C1q. Además, la acumulación de los componentes del complemento C4b y C3bc se correlacionaba significativamente con los niveles de IgG anti-RBD y la gravedad de la enfermedad, lo que indica que las personas con alto niveles de IgG y/o enfermedad grave, podría tener una mayor activación del complemento durante la infección viral (Jarlhelt et al., 2021). Por lo tanto, este podría ser uno de los mecanismos que expliquen la relación entre el daño estructural pulmonar y la exacerbada respuesta de anticuerpos IgG.

Como comorbilidad, se analizó la relación entre presentar alteraciones en el metabolismo glucídico (RI o DM2) pre o post COVID-19 y los niveles de anticuerpos IgM o IgG. Nuevamente, los anticuerpos IgG cobran relevancia. Se observa (Figura 17B) que estos son mayores en pacientes con alteraciones metabólicas pre COVID-19 en comparación con aquellos normales o que desarrollaron anomalías luego del transcurso de la enfermedad. En parte, este hallazgo podría estar relacionado con la gravedad del cuadro, ya que se ha visto que pacientes con alteraciones glucídicas antes del contagio con SARS-CoV-2 son más propensos a desarrollar una enfermedad severa (Huang et al., 2020).

Aún no se sabe cuál es el mecanismo real por el que pacientes que presentan altos niveles de glucosa o patologías asociadas, como diabetes mellitus tipo 2 o resistencia a la insulina se relacionan con el desarrollo de una patología grave en COVID-19. Sin embargo, una de las hipótesis que se tiene es que los altos niveles de glucosa son beneficiosos para la rápida replicación viral. Esto ya que se postula que el SARS-CoV-2 potencia la vía de las hexosaminas, redirigiendo el metabolismo hacia esta en vez de otras vías comunes como serían la glucólisis o el ciclo de Krebs mitocondrial (Laviada-Molina et al., 2020). Los productos finales de esta vía potencian componentes de la respuesta inmune como interferón y citoquinas proinflamatorias, dando lugar a la tormenta de citoquinas y daño multiorgánico, característicos del COVID-19. Sin embargo, la vía alterna de las hexosaminas también está regulada por las enzimas OGT (O-GlcNAc transferasa) y OGA (O-GlcNAcase), que catalizan la adición y eliminación de GlcNAc (N-acetilgalactosamina) en proteínas (Laviada-Molina et al., 2020; Wang, Q et al., 2020). Esto también podría tener una repercusión en la glicosilación de los anticuerpos y, por ende, en la activación del complemento nuevamente. Esto, ya que se conoce que la activación del complemento a través de las lectinas puede ser mediada por las ficolinas, que son lectinas que reconocen selectivamente al GlcNAc. Por esta razón cuando anticuerpos IgG son ricos en GlcNAc puede ser reconocidos por las ficolinas y activar la citotoxicidad dependiente del complemento (Olivares et al., 2013). Finalmente, al activarse esta respuesta mantendrá activa la respuesta inflamatoria, potenciando el daño

estructural y también estimulando la respuesta celular y humoral. Este fenómeno también podría explicar por qué aquellos pacientes con el metabolismo glucídico alterado post COVID-19 no muestran los mismos niveles de anticuerpos que los pacientes que ya venían con alteraciones previas. Esto podría ser porque el proceso de glicación es lento, y lleva años para poder concretarse como tal, por lo que no debería afectar a aquellos individuos que recientemente adquirieron este tipo de desregulaciones.

Luego, se realizaron las mismas comparaciones con los niveles de anticuerpos IgM e IgG, pero a los 12 meses luego del comienzo de los síntomas. Cabe resaltar nuevamente, que para la fecha en que se realizaron estas tomas de muestras, más del 90% de los pacientes en estudio habían asistido a vacunarse con la primera y/o con la segunda dosis del plan de vacunación contra la COVID-19 (Tabla 4). Es por ello, que estos resultados pueden estar intervenidos por la respuesta propia de la vacuna y no reflejar lo provocado netamente por la infección natural, sin embargo, fueron analizados de igual forma.

De acuerdo con la severidad, nuevamente se observa que los pacientes severos presentan valores de IgG significativamente mayores que los leves (Figura 18C). Sin embargo, ya no se observa esto en pacientes moderados y, además, la diferencia entre pacientes severos y leves disminuyó. Es importante aclarar que en esta medición las medias de todos los grupos aumentaron, por lo que se observó un aumento en los niveles de anticuerpos IgG sin importar la clasificación

de los pacientes, lo que podría estar relacionado con la respuesta a la inmunización mediante la vacunación (medias a los 6 meses: severos: 15,94, moderados: 16,13, leves: 6,25; medias a los 12 meses: severos: 21,85 moderados: 18,96, leves: 9,51).

La producción de anticuerpos según el padecimiento o no de ARDS a los 12 meses post infección, también parece haber sido afectada por el proceso de vacunación. Esto debido a que, si bien los anticuerpos IgG se encuentran más altos en pacientes que padecieron ARDS con relación a los que no (Figura 19D) esta diferencia se ve enmascarada al comparar ambos grupos más el control (Figura 19C), por lo cual es mucho más baja que lo reportado a los 6 meses (Figura 15D). Además, nuevamente se observa que los pacientes de ambos grupos aumentaron sus niveles de anticuerpos debido al alza que se observa en las medias registradas (medias a los 6 meses: ARDS: 16,41, no ARDs: 8,73; medias a los 12 meses: ARDS: 20,75 no ARDS: 13,45).

Algo similar ocurrió tras analizar los niveles de anticuerpos 12 meses después de la infección, según secuelas pulmonares y alteraciones metabólicas. La significancia que antes se observaba al analizar los anticuerpos IgG se perdió en ambas ocasiones (Figura 20B y 21B), presumiblemente debido también al proceso de vacunación que hizo aumentar los anticuerpos en todos los grupos de pacientes.

Al revisar los resultados obtenidos por los anticuerpos neutralizantes 12 meses post infección, se deben tener las mismas consideraciones ya que corresponden a las mismas muestras y es probable que también tengan el sesgo provocado por el proceso de vacunación. A pesar de eso, y si bien no se observan diferencias en la producción de estos entre pacientes severos, moderados y leves (Figura 22A y B), se reportaron diferencias importantes entre pacientes que cursaron distrés respiratorio agudo versus aquellos que no (Figura 23A y B). Independiente del hecho de que estos pacientes estén vacunados, diferencias por síntomas más severos relacionados al síndrome de distrés respiratorio ya han sido reportadas anteriormente, lo que validaría los resultados obtenidos, ya que mientras mayor sea la gravedad de los síntomas mayor presencia de los anticuerpos neutralizantes producidos por los pacientes (Liu et al., 2020; Wang et al., 2020).

Lo observado en la producción de anticuerpos neutralizantes según secuelas pulmonares y alteraciones metabólicas, es bastante interesante ya que se observan las mismas dinámicas reportadas para anticuerpos IgG 6 meses luego de la infección por COVID-19. Se observa que pacientes con TC de tórax alterado, presentan niveles de NAbs mayores que los no secuelados (Figura 24) y que pacientes con alteraciones metabólicas pre COVID-19 tienen mayor cantidad de NAbs que aquellos con metabolismo normal o bien, que presentaron secuelas en su metabolismo glucídico post COVID-19 (Figura 25). Nuevamente, son parámetros asociados al curso más severo de la enfermedad que podrían

estar relacionados con la mayor producción de anticuerpos, como ha sido mencionado anteriormente.

Por último, en cuanto al porcentaje de las células B RBD específicas determinadas por citometría de flujo, se observa que los resultados se condicen con la data presentada. Todas las muestras analizadas (34 pacientes) presentan una población de células B RBD+ anti-SARS-CoV-2 luego de seis meses post infección (Figura 32), lo que es validado por investigaciones anteriores que indican la presencia pasado 6 meses luego de la infección (Gaebler et al., 2021).

Sin embargo, no se reportaron diferencias de esta población según severidad o padecimiento de distrés respiratorio durante la infección (Figura 29) como se creía que podían existir si es que los anticuerpos presentaban esta tendencia. Tampoco se observaron diferencias de acuerdo con las secuelas pulmonares o alteraciones metabólicas (Figura 30).

Buscando alguna relación de estas células con la secreción de anticuerpos ya sea IgM o IgG, se realizó la correlación del porcentaje de esta población con ambos tipos de anticuerpos a los 6 meses post infección. Si bien, no se obtuvo una correlación con ninguna de las dos clases de anticuerpos, con los IgM se observa una mejor tendencia (Fig. 31A) que quizás pueda estar relacionada con lo obtenido al analizar las subpoblaciones de las células B RBD+, en donde tras aislar la población de células B RBD+IgM+ y RBD+IgG+, observamos que el porcentaje de las primeras es significativamente mayor que el de las segundas

(Figura 33A). Este es un punto de discusión nuevamente, ya que no se condice con los valores reportados para los anticuerpos IgG. Por lo tanto, se cree que este tipo de células circulantes no se encuentran directamente relacionadas con la producción de anticuerpos como tal, sino más bien puedan estar relacionadas con algún proceso de renovación celular y de vigilancia inmune que es lo que también postulan otros autores que han estudiado esta población celular (Gurevich et al., 2021).

Por otro lado, al observar las poblaciones de células B RBD+ de memoria (CD27+) y vírgenes (CD27-), no se observan diferencias entre ambas subpoblaciones, siendo que se ha reportado la amplia presencia de células B RBD+ de memoria recientemente (Gurevich et al., 2021). Se cree que la detección de la población sea menor debido a algún problema ocurrido en la manipulación de la muestra previa a su almacenamiento a -80°C, o bien, durante los procesos de congelamiento y descongelamiento al que fue sometida, o en el tratamiento de esta previo al análisis por citometría de flujo, en donde las células podrían haber perdido el marcador CD27 de superficie; o también que señalizaciones internas de la misma célula hayan provocado una disminución en la expresión del mismo marcador.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar que los pacientes chilenos con COVID-19, independiente de su severidad, son seropositivos para anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 6 meses luego de la infección. Además, pacientes graves produjeron niveles de IgG anti-SARS-CoV-2, más altos que los pacientes con síntomas leves, lo que se puede atribuir posiblemente debido a una respuesta inmune exacerbada, teniendo en cuenta que, en cuadros graves de esta enfermedad los pacientes cursan con distrés respiratorio, síndrome que para el cual se han notificado desregulaciones de la respuesta inmune en su conjunto (Thompson et al., 2017). También es importante señalar que el aumento de la respuesta de IgG se encuentra asociado a daño pulmonar estructural pero no con disfunción pulmonar a los 6 meses post infección, lo que podría estar relacionado también a las acciones efectoras que cumplen los anticuerpos dentro del organismo y en este caso, en el pulmón propiamente tal y es que acciones como la mejora en la fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpos o bien la activación del complemento en un ambiente exacerbado y desregulado, pueden propiciar un estado pro-inflamatorio que traiga como consecuencia la generación de daño tisular y estructural el cual fue detectado por medio de la tomografía computarizada de tórax. Algo similar ocurre con los anticuerpos NAbs 12 meses luego de la infección por COVID-19, y es que si bien estos resultados pueden presentar sesgo debido a la vacunación contra el virus, se siguen evidenciando

valores más altos en pacientes que cursaron con distrés respiratorio, secuelas estructurales y alteraciones en el metabolismo glucídico pre COVID-19 lo que podría estar relacionado a que el estado inflamatorio persista en pacientes severos a largo plazo, manteniendo activa la respuesta inmune. Sin embargo, falta más data y medición de otros parámetros para poder comprobar esto.

La respuesta de IgM e IgG a los 12 meses no se vio relacionada con parámetros como secuelas pulmonares o alteraciones metabólicas, pero aún se observan diferencias en la producción de acuerdo con severidad, nuevamente una respuesta que podría estar relacionada al estado inflamatorio.

Por otro lado, la población de células B RBD+ específicas 6 meses después de la infección, se encuentra presente en todos los pacientes estudiados, en un rango de 1,3% a 8,6% que es relativamente más alto a lo reportado por otros estudios (Gaebler et al., 2021) y además no se presentan diferencias según los parámetros analizados. Sin embargo, la población de células B IgM+ RBD+ es significativamente más alta que la población IgG+ RBD+, lo que no estaría relacionado con la producción de anticuerpos a los 6 meses post infección. Se postula entonces, que las células reconocidas no se encuentran directamente relacionadas con la producción de anticuerpos, pero destacando que sí podrían cumplir un rol importante en el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz a futuras infecciones. Sería interesante poder analizar más adelante si es que es

posible que las células de memoria generadas por la infección original puedan reconocer de forma cruzada con las nuevas variantes del SARS-CoV-2.

Finalmente, queda mencionar que la hipótesis propuesta al comienzo de esta tesis fue parcialmente aceptada, ya que si bien, la producción de anticuerpos IgG fue mayor en pacientes severos que tuvieron un peor curso durante su enfermedad (como el padecimiento de ARDS) en comparación con pacientes leves, esta diferencia no se presentó al analizar la población de células B RBD+ específicas. Sin embargo, cabe mencionar que el kit utilizado no es capaz de detectar células plasmáticas circulantes que están relacionadas a la secreción de anticuerpos.

Como proyección, sería interesante analizar la producción de anticuerpos específicos para las proteínas más inmunogénicas del SARS-CoV-2, como lo son S y N, y definir si esta producción diferenciada tiene relación con la severidad o algún otro parámetro. Por otro lado, sería importante seguir analizando la respuesta de células B, por ejemplo, frente a distintos estímulos que puedan afectar la producción de anticuerpos como ambientes altos en glucosa o en contacto con ciertas citoquinas que ven aumentadas su producción en pacientes severos. Por último, también se podría estudiar de manera específica la población de células plasmáticas circulantes y analizar si se presenta alguna relación de esta con los parámetros ya estudiados.

GLOSARIO

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

COVID-19: Enfermedad por Coronavirus 2019.

RBD: Dominio de unión al Receptor.

ACE2: Enzima Convertidora de Angiotensina 2.

CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente.

ARDS: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

TC: Tomografía Computarizada.

DLCO: Prueba de difusión de monóxido de carbono.

RI: Resistencia a la Insulina.

DM2: Diabetes Mellitus 2.

MG: Metabolismo Glucídico.

MGA: Metabolismo Glucídico Alterado.

NAbs: Anticuerpos neutralizantes.

ABEI: N-(4-aminobutill)-N-etilisoluminol.

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtmann, A., Pillai, S. (2018). Activación del linfocito B y producción de anticuerpos. *Inmunología celular y molecular* (9.^a ed., Vol. 1, pp. 251–274). Elsevier.
- Bachmann, M. F., Mohsen, M. O., Zha, L., Vogel, M., & Speiser, D. E. (2021). SARS-CoV-2 structural features may explain limited neutralizing-antibody responses. *npj Vaccines*, 6(1), 1-5.
- Bishop, G. A., & Hostager, B. S. (2001). B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 13(3), 278-285.
- Chambers, J. P., Yu, J., Valdes, J. J., & Arulanandam, B. P. (2020). SARS-CoV-2, Early Entry Events. *Journal of pathogens*, vol. 2020, Article ID 9238696, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/9238696>
- Che, X. Y., Qiu, L. W., Pan, Y. X., Wen, K., Hao, W., Zhang, L. Y., ... & Yuen, K. Y. (2004). Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2629-2635.
- Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., ... & Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 371(6529).
- Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., ... & Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639-644.
- Garcia-Beltrán, W. F., Lam, E. C., Astudillo, M. G., Yang, D., Miller, T. E., Feldman, J., ... & Balazs, A. B. (2021). COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*, 184(2), 476-488.
- García-González, P., Tempio, F., Fuentes, C., Merino, C., Vargas, L., Simon, V., ... & Osorio, F. (2021). Dysregulated immune responses in COVID-19 patients correlating with disease severity and invasive oxygen requirements. *Frontiers in immunology*, 12.
- Gurevich, M., Zilkha-Falb, R., Sonis, P., Magalashvili, D., Menascu, S., Flechter,

- S., ... & Achiron, A. (2021). SARS-CoV-2 Memory B and T Cells Profile in Mild COVID-19 Convalescents subjects. *International Journal of Infectious Diseases*.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., ... & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2), 271-280.
- Holter, J. C., Pischke, S. E., de Boer, E., Lind, A., Jenum, S., Holten, A. R., ... & Mollnes, T. E. (2020). Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(40), 25018-25025.
- Hou, H., Wang, T., Zhang, B., Luo, Y., Mao, L., Wang, F., ... & Sun, Z. (2020). Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical & translational immunology*, 9(5), e1136.
- Hua, C. K., & Ackerman, M. E. (2017). Increasing the clinical potential and applications of anti-HIV antibodies. *Frontiers in immunology*, 8, 1655.
- Huang, I., Lim, M. A., & Pranata, R. (2020). Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia—a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 395-403.
- Hussain, M., Syed, S. K., Fatima, M., Shaukat, S., Saadullah, M., Alqahtani, A. M., ... & Wu, X. (2021). Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: A Literature Review. *Journal of Inflammation Research*, 14, 7225.
- Jarlhelt, I., Nielsen, S. K., Jahn, C. X. H., Hansen, C. B., Pérez-Alós, L., Rosbjerg, A., ... & Garred, P. (2021). SARS-CoV-2 Antibodies Mediate Complement and Cellular Driven Inflammation. *Frontiers in immunology*, 12.
- Jiang, Y., Wei, X., Wang, H., & Li, G. (2022). Duration of antibody responses following severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Irish Journal of Medical Science* (1971-), 1-4.
- Klasse, P. J., & Sattentau, Q. J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology*, 83(9), 2091-2108.
- Lau, E. H., Tsang, O. T., Hui, D. S., Kwan, M. Y., Chan, W. H., Chiu, S. S., ... & Peiris, M. (2021). Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nature communications*, 12(1), 1-7.

- Laviada-Molina, H. A., Leal-Berumen, I., Rodriguez-Ayala, E., & Bastarrachea, R. A. (2020). Working hypothesis for glucose metabolism and SARS-CoV-2 replication: interplay between the hexosamine pathway and interferon RF5 triggering hyperinflammation. Role of BCG vaccine?. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 514.
- Liu, L., To, K. K. W., Chan, K. H., Wong, Y. C., Zhou, R., Kwan, K. Y., ... & Chen, Z. (2020). High neutralizing antibody titer in intensive care unit patients with COVID-19. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1664-1670.
- Lu, X., Zhang, L., Du, H., Zhang, J., Li, Y. Y., Qu, J., & Wong, G. W. (2020). SARS-CoV-2 infection in children. *New England Journal of Medicine*, 382(17), 1663-1665.
- Marot, S., Malet, I., Leducq, V., Zafilaza, K., Sterlin, D., Planas, D., ... & Marcelin, A. G. (2021). Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers. *Nature communications*, 12(1), 1-7.
- Milteny Biotec. (2021). SARS-CoV-2 RBD B Cell Analysis Kit, human. 1–3
- Murin, C. D., Wilson, I. A., & Ward, A. B. (2019). Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nature microbiology*, 4(5), 734-747.
- Notz, Q., Schmalzing, M., Wedekink, F., Schlesinger, T., Gernert, M., Herrmann, J., ... & Lotz, C. (2020). Pro-and anti-inflammatory responses in severe COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome—an observational pilot study. *Frontiers in immunology*, 11.
- Olivares, N., & Hernández-Pando, R. (2013). La glicosilación de los anticuerpos y su efecto patogénico. *Revista de investigación clínica*, 65(6), 515-523.
- Ozturk, A., Bozok, T., & Bozok, T. S. (2021). Evaluation of rapid antibody test and chest computed tomography results of COVID-19 patients: A retrospective study. *medRxiv*.
- Putcharoen, O., Wacharapluesadee, S., Chia, W. N., Paitoonpong, L., Tan, C. W., Suwanpimolkul, G., ... & Hemachudha, T. (2021). Early detection of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients in Thailand. *PloS one*, 16(2), e0246864.
- Seow, J., Graham, C., Merrick, B., Acors, S., Pickering, S., Steel, K. J., ... & Doores, K. J. (2020). Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection. *Nature microbiology*, 5(12), 1598.

- Siracusano, G., Pastori, C., & Lopalco, L. (2020). Humoral immune responses in COVID-19 patients: a window on the state of the art. *Frontiers in immunology*, 11.
- SNIBE. (2020) MAGLUMI 2019-nCoV IgG (CLIA). 1–4
- SNIBE. (2020) MAGLUMI 2019-nCoV IgM (CLIA). 1–4
- SNIBE. (2020) MAGLUMI® SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody (CLIA),
- Sun, B., Feng, Y., Mo, X., Zheng, P., Wang, Q., Li, P., ... & Chen, L. (2020). Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 940-948.
- Tan, W., Lu, Y., Zhang, J., Wang, J., Dan, Y., Tan, Z., ... & Deng, G. (2020). Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *MedRxiv*.
- The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. (2020). The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19)—China, 2020. *China CDC weekly*, 2(8), 113-122. doi: 10.46234/ccdcw2020.032
- Thompson, B. T., Chambers, R. C., & Liu, K. D. (2017). Acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 562-572.
- To, K. K. W., Tsang, O. T. Y., Leung, W. S., Tam, A. R., Wu, T. C., Lung, D. C., ... & Yuen, K. Y. (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 565-574.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veasley, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.
- Wang, Q., Fang, P., He, R., Li, M., Yu, H., Zhou, L., ... & Liu, S. (2020). O-GlcNAc transferase promotes influenza A virus-induced cytokine storm by targeting interferon regulatory factor-5. *Science Advances*, 6(16), eaaz7086.
- Wang, Y., Zhang, L., Sang, L., Ye, F., Ruan, S., Zhong, B., ... & Zhao, J. (2020). Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *The Journal of clinical investigation*, 130(10).
- WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. (2022). Recuperado 24 de enero de 2022, de World Health Organization website:

<https://covid19.who.int/>

- Zeng, F., Dai, C., Cai, P., Wang, J., Xu, L., Li, J., ... & Wang, L. (2020). A comparison study of SARS-CoV-2 IgG antibody between male and female COVID-19 patients: a possible reason underlying different outcome between sex. *Journal of medical virology*, 92(10), 2050-2054.
- Zhang, Y., Xu, J., Jia, R., Yi, C., Gu, W., Liu, P., ... & Sun, B. (2020). Protective humoral immunity in SARS-CoV-2 infected pediatric patients. *Cellular & molecular immunology*, 17(7), 768-770.
- Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., ... & Zhang, Z. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clinical infectious diseases*, 71(16), 2027-2034.

ANEXOS

1. Sobre el consentimiento informado entregado a cada paciente

Este documento se deberá ajustar a lo indicado por los artículos 8°, 10°, 14° y 15° de la Ley N° 20.584 con sus exigencias y excepciones y el derecho de las personas a decidir informadamente.

El proyecto se encuentra dentro del protocolo aprobado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Biobío.



Nº 98

**Ref.: Respuesta Solicitud de Aprobación Protocolo
"Neumonía Viral Secundaria a Corona Virus en el
Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz"**

Los Ángeles, 06 de Abril de 2020

A: Investigador Principal Sr. Gonzalo Labarca Trucios

DE: Comité Ético de Investigación

Estimado Investigador:

El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Biobío, en su sesión ordinaria de fecha 26.03.2020 ha analizado los antecedentes remitidos por Ud. en relación a solicitud de aprobación protocolo en referencia, resolviendo lo siguiente:

1. **Valor del estudio:** La investigación aportara nuevos antecedentes sobre los atributos clínicos del COVID-19, perfiles demográficos de los pacientes con diagnóstico de neumonía, desenlaces a corto y largo plazo según nivel de severidad del cuadro. Acumulando evidencia objetiva, que a futuro contribuirá a reforzar las medidas de prevención primaria y de manejo posterior de pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía secundario a Covid-19 en un establecimiento de salud pública a nivel local.
1. **Validez científica:** Estudio observacional, prospectivo de corte transversal.
2. **Discriminación arbitraria:** Se ajusta a criterios de inclusión y exclusión delimitados en el marco de la investigación.
3. **Relación riesgo-beneficio:** La probabilidad de que ocurra un efecto nocivo a consecuencia de la implementación de la investigación es baja.
4. **Consentimiento informado:** Se debe ajustar a lo indicado los artículos 8°, 10°, 14° y 15° de la Ley Nº 20.584 sobre consentimiento informado (CI) con sus exigencias y excepciones y el Derecho de las personas a decidir informadamente.



EN CONSECUENCIA,

En virtud de los antecedentes tenidos a la vista, y toda vez que el procedimiento puesto en marcha, se ajuste a los artículos mencionados en el punto 4, este Comité ha resuelto "aprobar" la realización del protocolo de investigación en referencia.

Tomó conocimiento de:

- ✓ Formulario Acceso CEC.
- ✓ Protocolo de Investigación.
- ✓ Consentimiento Informado.
- ✓ Carta de autorización de: Director Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz.
- ✓ Currículo Vitae Investigador Principal.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,

**CARLOS VILLARROEL INOSTROZA
PRESIDENTE
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**

En respuesta a su solicitud el CEC (Comité Ético Científico) se reunió en sesión ordinaria con fecha 26.03.2020 estando presente Dr. Carlos Villarroel, A.S (MC) Patricia Messenger, E.U. Cecilia Alvarado y B.Q. Felipe Riquelme.

DISTRIBUCION:

- Interesado.
- Archivo

2. Sobre el cumplimiento de las normas y principios éticos, bioéticos y los procedimientos de bioseguridad

El desarrollo de este proyecto se enmarca dentro del proyecto COVID1005, titulado “EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO”, a cargo de la Dra. Estefanía Nova Lamperti que ha sido previamente aprobado por el Comité de ética, bioética y bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción. Adjunto documento.



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

CEBB 676-2020.

Concepción, julio de 2020.

CERTIFICADO

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción ha revisado el **PROYECTO CÓDIGO COVID1005**, adjudicado en la **CONVOCATORIA DE LA SUBDIRECCIÓN DE REDES, ESTRATEGIA Y CONOCIMIENTO - AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO 2020**, titulado **“EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO”**, presentado por la **DRA. ESTEFANÍA NOVA LAMPERTI**, en calidad de Investigadora Responsable, académica adscrita al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, comprobando que cumple con las normas y principios éticos y bioéticos y con los procedimientos de bioseguridad, establecidos nacional e internacionalmente para investigación científica que contempla manipulación de material biológico de origen humano (sangre) y sus residuos, tanto biológicos como químicos, así también datos de salud.

Considerando que los casos de personas con infección por SARS-CoV-2 leve o moderada y los casos de pacientes hospitalizados con infecciones severas en nuestra población chilena es relevante en el contexto actual de emergencia sanitaria por la pandemia declarada por la Organización Mundial de la Salud (marzo/2020), los estudios contemplados en el marco de este proyecto de investigación suponen analizar la respuesta inmune efectiva a SARS-CoV-2 en pacientes recuperados a COVID-19 a 1, 2 y 10 meses post infección. Para esto buscará determinar la asociación entre mecanismos inmunológicos humorales y celulares y parámetros inflamatorios sistémicos con un potencial daño pulmonar a corto y mediano plazo en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con cuadro asintomático, moderado o severo, conforme se indica como objetivo general.

El desarrollo metodológico del **PROYECTO CÓDIGO COVID1005** detalla de manera rigurosa la ejecución de las actividades descritas en 05 (cinco) objetivos específicos, a saber: inicialmente pretende medir el título y la especificidad de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 de clase IgG/IgM en una cohorte de 50 pacientes recuperados de COVID-19 a 1, 2 y 10 meses post infección; después prevé analizar la activación molecular y la producción de citoquinas de neutrófilos, monocitos y linfocitos B en esta muestra de pacientes recuperados para, a continuación, determinar los parámetros sistémicos de inflamación de la misma muestra; con los datos obtenidos propone evaluar la función pulmonar y la progresión del estado

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empredec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPIRITU



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

de salud de los pacientes para, finalmente, asociar los parámetros inmunológicos humorales y celulares y parámetros sistémicos de inflamación con la severidad de la patología cursada y un potencial daño pulmonar en la muestra de pacientes.

En este estudio para identificar la asociación entre parámetros inflamatorios celulares y sistémicos y su relación con el daño pulmonar a 1, 2 y 10 meses post-infección, la participación de cada sujeto – pacientes mayores de 18 años, cuya atención fue realizada en el Centro de Salud Familiar (CESFAM) de Hualqui y en el Complejo Asistencial “Dr. Víctor Ríos Ruiz”, de Los Ángeles (Provincia de Concepción y del Biobío), que desarrollaron COVID-19 asintomático (n=10), moderado (n=20) o severo (n=20), provenientes del sistema público como privado, urbano y rural, además de controles sanos (n=10) desde el Laboratorio Clínico PreveGen de Concepción- estará basada en el proceso de Consentimiento Informado. Este proceso será documentado, conforme modelo presentado a este Comité institucional, y regularmente firmado.

Para el estudio, observacional de carácter básico-traslacional, se requiere la obtención de datos clínicos y por esto se realizará la toma de muestra de sangre de los participantes, las que se utilizarán para hemograma, inmunofenotipo y ensayos funcionales, y la fracción de suero, para medir anticuerpos y parámetros sistémicos de inflamación. Aún considera el estudio de la función respiratoria y evolución clínica que se realizará mediante un examen por tomografía computarizada de torax de alta resolución, espirometría basal y posterior a broncodilatación. Además, se entregarán encuestas generales del estado de salud con escala de depresión de BECK, escala de ansiedad y ánimo de HDAS y formulario de calidad de vida mediante *Saint George Respiratory Questionnaire*. Por último, prevé estudio de sueño con la escala de Epworth y una poligrafía respiratoria + Actigrafía.

Toda la información y los resultados de los estudios enmarcados en este **PROYECTO CÓDIGO COVID1005**, serán custodiados por la Investigadora Responsable, Dra. Estefanía Nova Lamperti.

La ejecución de las actividades descritas en el proyecto en pauta asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los participantes en el estudio, garantizando la autonomía, la libertad, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Todos los aspectos del trabajo metodológico, se encuentran detalladamente descritos en la propuesta del proyecto y las actividades serán realizadas por el personal científico, profesional y de apoyo del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción y de las instituciones asociadas. El equipo de investigadores de la Universidad de Concepción cuenta con la calificación y destrezas necesarias para llevar a buen término los diferentes ensayos que se tiene contemplado, bajo la rigurosa aplicación de protocolos de trabajo establecidos y de carácter rutinario en las respectivas dependencias de nuestra Casa de Estudios superiores. Por tanto, si bien se utilizará material biológico y químico para los estudios previstos en la propuesta, su respectiva manipulación estará bajo los cuidados adecuados y necesarios, así como también observando las normas pertinentes.

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPIRITU





Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

El tratamiento y disposición de los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto dentro del Laboratorio de Inmunología Molecular e Translacional, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, proyecto de investigación titulado **"EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO"** observa los derechos asegurados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos, los derechos y principios de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, las Normas Éticas de la Organización Panamericana de la Salud para Investigaciones con Sujetos Humanos, la Constitución de la República de Chile, la Ley N° 20.120 "Sobre la Investigación Científica en el Ser Humano, su Genoma y Prohíbe la Clonación Humana", la Ley N° 20.584 que "Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud" y la Ley N°19.628, "Sobre Protección de la Vida Privada". Así también, sigue las Sugerencias para Escribir un Consentimiento Informado en Estudios con Personas, del Comité Asesor de Bioética FONDECYT/CONICYT. Además, cumple con el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (Versión 2018), normas formalizadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT y adoptadas por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID, con el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos de la Universidad de Concepción y su respectivo Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL), así también con los principios y normas obligatorias delineadas con base en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (2010) para investigadores de proyectos CONICYT, (conforme lo establecido por la Resolución Exenta N° 157, del 24 de enero de 2013) y no muestra elementos que puedan transgredir las normas y principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.




DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS
PRESIDENTA

COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPIRITU

3. Sobre la correcta eliminación de los residuos generados

Los desechos biológicos y químicos generados en este proyecto deberán ser correctamente eliminados según lo estipulado por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Universidad de Concepción en su instructivo, “Clasificación y Manejo de Residuos Peligrosos”.

CLASIFICACIÓN Y MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS

Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que <u>NO</u> están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que <u>NO</u> han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como “Cortopunzante inerte”, hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 
(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.			