



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”

“CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ANTICUERPOS IgG (ANTI-SPIKE) Y EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL DE TIPO ALFA (TNF- α) EN PERSONAS VACUNADAS CONTRA EL CORONAVIRUS SARS – CoV- 2”

AUTOR

BSc. Diego Alexander Paredes Inofuente

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

ASESOR

PhD. Ivan Lozada Requena

Lima- Perú

2023

JURADO DE TESIS

JOSE LUIS AGUILAR OLANO

PRESIDENTE

PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

VOCAL

MELISSA MENDEZ ARANDA

SECRETARIO

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi familia, por su apoyo incondicional

Siempre serán mi fortaleza en el camino que siga

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Dr Ivan Lozada Requena, por su valioso apoyo, retroalimentación, y

paciencia conmigo al desarrollar la tesis

Agradecimiento al Dr. Cesar Núñez Ponce, Director de INMUNEN por haber

proporcionado parte de los reactivos utilizados en este proyecto.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Tesis autofinanciada por el Laboratorio de Inmunología #108 – LID – Departamento de

Ciencias Celulares y Moleculares – Facultad de Ciencias e Ingeniería

Universidad Peruana Cayetano Heredia.

CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ANTICUERPOS IgG (ANTI-SPIKE) Y EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL DE TIPO ALFA (TNF- α) EN PERSONAS VACUNADAS CONTRA EL CORONAVIRUS SARS – CoV- 2

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	uwspace.uwaterloo.ca Fuente de Internet	<1%
3	rmf.smf.org.mx Fuente de Internet	<1%
4	assumption.org Fuente de Internet	<1%
5	www.mdpi.com Fuente de Internet	<1%
6	Antonio Tello, Francisco Marín, Vanessa Roldán, Ana García-Herola et al. "Efecto de dosis máximas de atorvastatina en la inflamación, la trombogénesis y la función fibrinolítica en pacientes con cardiopatía	<1%

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN / PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
OBJETIVOS	10
OBJETIVO PRINCIPAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
PARTICIPANTES.....	11
VALORACIÓN DE RIESGOS Y MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD ANTE EL COVID-19	12
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO	13
ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA) EN SUERO HUMANO.....	14
ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGG (ANTI-SPIKE) CONTRA EL SARS-CoV-2.....	15
CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS IGG ANTI- SPIKE (SARS-CoV-2).....	16
ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE TNF- α EN PACIENTES CON COVID-19	16
CÁLCULO DE RESULTADOS	18
ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO.	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
RESULTADOS.....	20
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	20
NIVELES DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES IGG ANTES Y DESPUÉS DE INICIARSE LA PANDEMIA DEL COVID-19	22
CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IGG TRAS LA TERCERA DOSIS DE VACUNACIÓN	26
CORRELACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LOS NIVELES DE TNF-A Y ANTICUERPOS IGG EN DONANTES VACUNADOS CON LA TERCERA DOSIS DE PFIZER O ASTRAZENECA	27
DISCUSIÓN	28

CONCLUSIONES	32
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	39
APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA	39
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.....	40
DATOS DE CONCENTRACIONES DE ELISA IGG Y TNF-α.....	43
FICHA EPIDEMIOLÓGICA DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	45

ÍNDICE DE TABLAS

<u>TABLA 1.</u>	<u>DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.</u>	<u>12</u>
<u>TABLA 2.</u>	<u>CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LOS PARTICIPANTES DE LOS TRES GRUPOS</u>	<u>21</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA 1</u>	<u>ESTRUCTURA Y CICLO DE VIDA DEL SARS-COV-2</u>	<u>5</u>
<u>FIGURA 2</u>	<u>CURVA ESTÁNDAR DEL ELISA PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS IGG ANTI- SPIKE (U/ML).....</u>	<u>16</u>
<u>FIGURA 3</u>	<u>CURVA ESTÁNDAR DEL ELISA PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE TNF-ALFA (PG/ML) EN SUERO HUMANO.</u>	<u>17</u>
<u>FIGURA 4</u>	<u>NIVELES DE TNF-α DE MUESTRAS TOMADAS ANTES Y DESPUÉS DE LA TERCERA DOSIS.</u>	<u>22</u>
<u>FIGURA 5</u>	<u>NIVELES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-SPIKE DE MUESTRAS TOMADAS ANTES Y DURANTE LA PANDEMIA EN PARTICIPANTES NO INFECTADOS Y INDETERMINADOS.</u>	<u>23</u>
<u>FIGURA 6</u>	<u>NIVELES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-SPIKE DE MUESTRAS TOMADAS ANTES (GC) Y DURANTE LA PANDEMIA (G1, G2 Y G3).</u>	<u>25</u>
<u>FIGURA 7</u>	<u>PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IGG ANTI-SPIKE DE MUESTRAS TOMADAS ANTES Y DESPUÉS DE LA TERCERA DOSIS DE VACUNACIÓN.....</u>	<u>27</u>
<u>FIGURA 8</u>	<u>CORRELACIÓN ENTRE TNF-A Y ANTICUERPOS IGG ANTI-SPIKE EN PARTICIPANTES VACUNADOS ANTES Y DESPUÉS DE TERCERA DOSIS DE VACUNACIÓN.</u>	<u>28</u>

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS

UCI = Unidad de Cuidados Intensivos

ACE2 = Enzima convertidora de angiotensina tipo 2

TMPRSS2 = serina proteasa celular de transmembrana 2

SARS-CoV-2 = Coronavirus de tipo 2 que induce el síndrome respiratorio agudo severo

COVID-19 = Enfermedad del nuevo coronavirus 2019

LT = Linfocito T

LB = Linfocito B

CD = Cluster of differentiation (Grupos de diferenciación)

TNF- α = Factor de necrosis tumoral tipo alfa

IL = Interleucina

Spike (S) = Proteína espiga

NTD = Dominio N-terminal

RBD = Dominio de unión al receptor

RNA = Ácido Ribonucleico

IFN I = Interferon tipo I

NK = Linfocitos asesinos naturales

CSF = Factor estimulante de colonias

PANoptosis = Muerte celular inflamatoria

IgG o IgM = Inmunoglobulinas tipo G o M

Nab = Anticuerpos neutralizantes

HRP = Horse Radish Peroxidase (Peroxidasa de rábano picante)

SEM = Error estándar de la media

Resumen

En la infección de COVID-19 causada por el SARS-CoV-2 los mecanismos de inmunidad son fundamentales para una respuesta efectiva contra este virus. En COVID-19 poco se sabe de los mecanismos que involucran citocinas y su capacidad de estimular directa o indirectamente la producción de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. Mas aún ante el advenimiento de las vacunas tampoco se tiene información sobre como estas podrían ejercer un efecto en el eje citocinas-anticuerpos. En esa línea nuestro estudio determino en sujetos vacunados los niveles de TNF- α y anticuerpos IgG (anti-spike). Encontramos que solo en G1 (vacunados con tercera dosis de Pfizer y con infección) hubo un aumento estadísticamente significativo de TNF- α después de recibir esta dosis en comparación a antes de la misma dosis; los niveles de anticuerpos IgG (anti-spike) medidos antes y después de la tercera dosis de Pfizer (G1 y G2) o Astrazeneca (G3) no cambiaron y tampoco se encontró una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables; sin embargo, es necesario incrementar el tamaño muestral y estudiar más puntos en el tiempo. Este estudio exploratorio abre una línea de investigación en el eje citocinas-anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y la inducción de la respuesta humoral por parte de las vacunas.

PALABRAS CLAVE.

Anticuerpos, citocinas, COVID-19, inmunoglobulina IgG, SARS-CoV-2,

Abstract

In COVID-19 infection caused by SARS-CoV-2, immunity mechanisms are essential for an effective response against this virus. In COVID-19, little is known about the mechanisms that involve cytokines and their ability to stimulate the production of anti-SARS-CoV-2 antibodies directly or indirectly. Even more so, given the advent of vaccines, there is no information on how they could exert an effect on the cytokine-antibody axis. Along these lines, our study determined TNF- α and IgG (anti-spike) antibodies levels in vaccinated subjects. We found that only in G1 (vaccinated with third dose of Pfizer and with infection) there was a statistically significant increase in TNF- α after receiving this dose compared to before the same dose; The levels of IgG (anti-spike) antibodies measured before and after the third dose of Pfizer (G1 and G2) or Astrazeneca (G3) did not change and a statistically significant correlation was not found between both variables; However, it is necessary to increase the sample size and study more points in time. This exploratory study opens a line of research in the cytokine-anti-SARS-CoV-2 antibody axis and the induction of the humoral response by vaccines.

KEYWORDS

Antibodies, cytokines, COVID-19, IgG immunoglobulin, SARS-CoV-2,

Introducción

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés) es un tipo de coronavirus causante de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) que ha causado una pandemia extendida hasta el 2023 y aún no se ha eliminado por completo (1). El primer caso de infección se detectó en la ciudad de Wuhan en China en diciembre del 2019 (1,2). Para el 18 de junio del 2023 la organización mundial de la salud (OMS) confirmó 767.984.989 casos de infección y 6.943.390 muertes en el mundo, mientras que en Perú a través del MINSA se confirmaron 4.500.066 casos de infección y 220.085 muertes (3,4). El Perú a la fecha ya finalizó la quinta ola con una disminución de casos confirmados, defunciones y hospitalizaciones en comparación con las primeras olas debido a la vacunación masiva contra el coronavirus (5–7).

En relación al mecanismo de infección se sabe que el virus infecta a las células epiteliales, neumocitos tipo II, células alveolares tipo II, células endoteliales vasculares, células secretoras caliciformes de la mucosa nasal, enterocitos absorbentes dentro del intestino y macrófagos quienes presentan los receptores de superficie de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2, por sus siglas en inglés) y además una proteína de fusión y una serin proteasa (TMPRSS2, por las siglas en inglés) encargadas de facilitar el ingreso del SARS-CoV-2 (8–10). Es por ello que el SARS-CoV-2 puede diseminarse en varios tejidos y órganos como pulmones, colon, hígado, vejiga, riñones, corazón, testículo, intestino delgado, cerebro y vasos sanguíneos, debido a que presentan el receptor “ACE-2” (8,11,12).

La infección se inicia cuando la proteína Spike (S) de la superficie del virión reconoce a la célula hospedadora a través de la unión al receptor “ACE-2” (8,13). La proteína S presenta una forma trimérica y consta de las subunidades S1 y S2. La subunidad S1 contiene un dominio N- terminal domain (NTD, por sus siglas en inglés) y dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) que facilitan la entrada del virus a la célula (13). La subunidad S2 tiene un péptido de fusión (FP), secuencia de repetición de

heptapéptido (HR, por sus siglas en inglés), dominio transmembrana (TM, por sus siglas en inglés) y dominio citoplasmático (CP, por sus siglas en inglés). Una vez que hubo unión de la proteína S en el RBD con el receptor ACE-2 ocurre una escisión en las subunidades S1 y S2 por la actividad proteasa de la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2, por sus siglas en inglés) (14). TMPRSS2 es una proteína de superficie celular que activa la proteína de fusión de varios virus respiratorios. Esta ruptura de las subunidades expone al S2 FP para que permita la fusión de membranas virales y celulares a través de la proteína de fusión (catepsina L endo lisosomal) (11,12,15,16). Este evento permite que la nucleocápside ingrese al citoplasma para que el genoma viral esté disponible para la traducción y posterior formación de viriones en células infectadas. El material genético del virus SARS-CoV-2 (+) ssRNA presenta un tapón en 5' y una cola poli (A) de 3' asemejándose a un RNAm listo para la traducción (14). La tercera parte del genoma del SARS-CoV-2 del extremo 3' codifica proteínas estructurales como la proteína S, la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N); mientras que el resto del genoma codifica para proteínas no estructurales (14,17). El material genético del virus se libera en el citoplasma de la célula huésped y el RNA viral se traduce en poliproteína (pp1a y pp1ab) que es modificada auto proteolíticamente en proteínas no estructurales (nsps, por sus siglas en inglés). Los nsps ensamblan el complejo de replicasa-transcriptasa (RTC, por sus siglas en inglés) y se encargan de los procesos de replicación y transcripción del virus. Son un grupo de diferentes nsps del nsp1 a 16 (17). El proceso de replicación y transcripción viral ocurren en vesículas de doble membrana (DMV, por sus siglas en inglés) derivadas del retículo endoplasmático (ER, por sus siglas en inglés) (17). El RNA del virus recién sintetizado se exporta desde el interior del DMV a través de canales poro y posteriormente es encapsulado por la proteína de la nucleocápside N (17). En cambio, las proteínas estructurales como S, M y E se encuentran adosadas en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (ER) (15). La proteína E que es más pequeña induce a una curvatura de la membrana, la proteína M establece la forma de envoltura del virión y la proteína S se transporta hacia el compartimiento intermedio ER-Golgi (ERGIC) en donde ocurre el proceso de ensamblaje y gemación del virión (17). Finalmente, las partículas del virión salen de la célula a través del tráfico lisosomal, ver figura 1 (15,17).

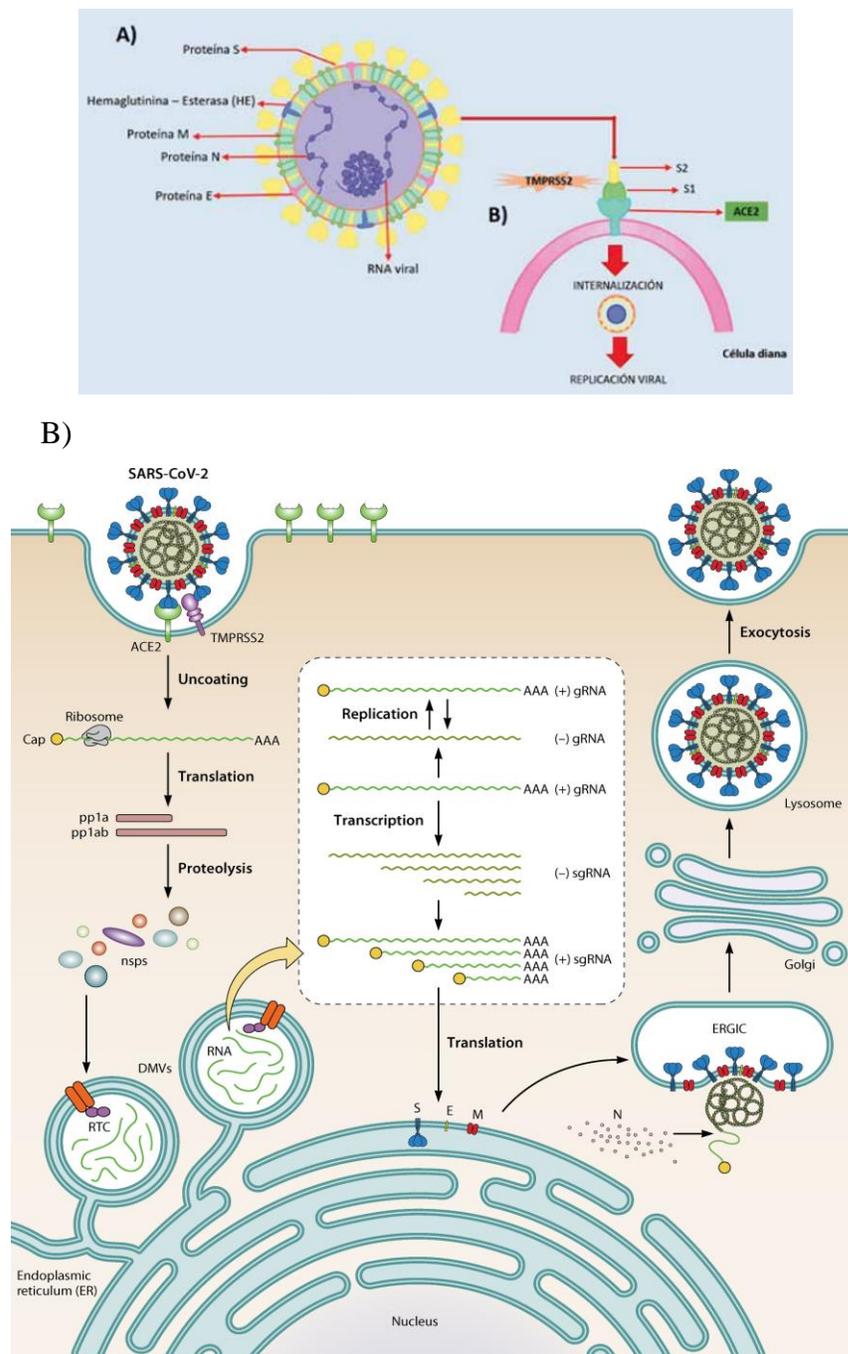


Figura 1 Estructura y ciclo de vida del SARS-CoV-2

A-) Proteínas estructurales: Proteínas S (spike), HE (hemaglutinina-esterasa), M (membrana), N (nucleocápside), E (envoltura), RNA viral. **B-)** Mecanismo de unión de la proteína S al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). En la figura se puede apreciar como la proteína S es escindida por la serina proteasa TMPRSS2, en la subunidad S1 (N- terminal) y S2 (C- terminal) mediante la unión del virus a la célula diana y facilitando el ingreso de este. Tomado de Arandia-Guzmán Jaime Gac Med Bol 2020 **(A)** y Kung et al., 2022 **(B)**.

La infección por SARS-CoV-2 afecta principalmente a células del tracto respiratorio superior (URT, por las siglas en inglés), provocando la activación de una primera línea de defensa, el sistema innato donde las células infectadas liberan interferones IFN (por sus siglas en inglés) tipo I (IFN-alfa/beta) y tipo III (IFN-lambda) y mediadores proinflamatorios para contrarrestar el inicio de la infección (1,8,16,18). También es posible que la inmunidad innata celular a través de los linfocitos NK (NK, natural killer por sus siglas en inglés) se active para tratar de eliminar a las células infectadas (19). Un evento importante es la activación de una tormenta de citocinas inducida por el virus, pero producida por distintas células inmunes (macrófagos y LT principalmente). Esta tormenta de citocinas lleva a reacciones hiperinflamatorias y procoagulantes en los pacientes con COVID-19 (20–23). Entre las citocinas que se producen en la tormenta de citocinas se encuentran IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-33, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, entre otras, asociándose a alta incidencia de micro y macro trombosis, largas estancias hospitalarias, alta mortalidad y marcadores de activación endotelial que generan endoteliosis y trombosis microvascular (24–27). Adicionalmente, el incremento de IL-6 se asocia con la linfopenia en esta etapa (28–30); mientras que el incremento de TNF- α en adultos mayores se ha visto que puede inducir apoptosis en los LT (31). TNF- α es una citocina proinflamatoria y un regulador clave del sistema inmune innato y adaptativo; participa en el reclutamiento de linfocitos a las zonas de infección, activa las células presentadoras de antígeno y puede activar al linfocito B por la vía independiente de linfocitos T, permitiendo su proliferación y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos y además induce la fiebre al actuar sobre el hipotálamo siendo la fiebre un efecto adverso común en la vacunación (32). La muerte celular es un mecanismo importante porque evita que células sanas se infecten con el patógeno circulante; sin embargo, este proceso puede liberar componentes que inducen una inflamación grave (33). Se tiene evidencia que las células infectadas por el virus SARS-CoV-2 especialmente los macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares tienen proceso de muerte celular inflamatoria exagerada por lo que estas células juegan un papel importante en el desarrollo y aceleración del daño pulmonar (34,35). El proceso de muerte celular inflamatoria (PANoptosis) está vinculado con la desregulación de citocinas, ya que dentro de las citocinas que se han investigado, tanto el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés) como el interferón γ (IFN- γ , por las siglas en inglés) produjeron un efecto

sinérgico en la activación de dicho proceso asociándose a un daño tisular con inflamación en el pulmón (36). Además, es posible que ambas citocinas puedan ocasionar linfopenia por medio de la “PANoptosis”, por lo tanto, los niveles de TNF- α como IFN- γ pueden ser predictores de la severidad de la enfermedad que se desarrollará en el paciente (35,36).

Un complemento de la inmunidad innata es la inmunidad adaptativa que está compuesta por la inmunidad celular (LT) y la inmunidad humoral (LB). La inmunidad adaptativa tarda en establecerse aproximadamente entre 7 a 10 días post infección con el SARS-CoV-2 debido a que es una inmunidad que requiere el reconocimiento, procesamiento, presentación y activación del sistema de linfocitos, lo que demandará ese tiempo en generar las primeras células efectoras (37). La inmunidad celular no sólo es importante porque los LT CD4+ o ayudadores estimulan la respuesta por LT CD8 o citotóxicos contra virus como el SARS-CoV-2 sino también porque colaboran con los LB para que produzcan los anticuerpos a través de un mecanismo T-dependiente, donde un rol protagónico lo cumplen los LT CD4 helper foliculares (Tfh) sobre todo en los centros germinales al ayudar a los LB a producir anticuerpos específicos (37-39). En la infección aguda por el SARS-CoV-2 los primeros anticuerpos son la inmunoglobulina M (IgM) y A (IgA); sin embargo, se desconoce si modifican el curso de la enfermedad (41). Luego se produce el cambio de clase a IgG, la cual es más sostenida e intensa; además debido a que los LB de memoria producen IgG estas prevalecerán en segundas o más respuestas al virus y además ante los procesos de vacunación (37,40,41). El mecanismo mediante el cual los anticuerpos evitan que el SARS-CoV-2 infecte a las células huésped es a través de la unión al trímero de la proteína spike (S) y en particular a la región RBD (43,44). Por tal motivo, en este estudio se utilizó un kit de ELISA capaz de detectar la presencia de anticuerpos IgG contra la proteína spike del virus SARS CoV-2.

Durante la pandemia, las medidas para contener la propagación viral fueron el distanciamiento social, la cuarentena, las mascarillas protectoras, entre otras; además de estas medidas se desarrollaron tratamientos antivirales como fármacos, tratamientos con sueros de personas convalecientes y vacunas entre otros (45). A partir de diciembre del 2020 se inició una campaña masiva de vacunación por todo el mundo (47). Las vacunas son eficaces para prevenir que las personas hagan enfermedad grave, entren en hospitalización o mueran, ya que inducen una importante respuesta inmunológica que podría protegerlos a largo plazo

gracias a la memoria inmunológica; además que evitan la propagación del virus con lo que contribuyen a la disminución de las altas tasas de infección (37,47,48).

En nuestro país el esquema de vacunación para mayores de 18 años ha sido: Primera dosis (Virus inactivado o RNAm); segunda dosis (Virus inactivado o RNAm), tercera dosis (Vector viral no replicativo o RNAm); cuarta dosis (RNAm) y dosis de refuerzo (RNAm, original Omicron BA4-5 u otras dosis que autorice la autoridad nacional de salud) (49). En nuestro país los esquemas de vacunación han sido variados, por ejemplo, existen grupos que recibieron 3 dosis de Pfizer y 1 dosis de Moderna; 2 dosis de Sinopharm, 1 dosis de Pfizer y 1 dosis de Moderna; 2 dosis de Sinopharm y 1 dosis de Pfizer; 2 dosis de Sinopharm y 1 dosis de Astrazeneca; 2 dosis de Pfizer y 1 dosis de Astrazeneca y 3 dosis de Pfizer entre otros grupos en minoría (data propia obtenida de otro estudio similar aún no publicado). En el presente estudio se utilizó tres grupos de participantes vacunados con el esquema de vacunación de primera y segunda dosis de Pfizer y tercera dosis de Pfizer (grupo G1, con infección n=7 y grupo G2, indeterminado n=7) o Astrazeneca (grupo G3, indeterminado n=9), los que recibieron sus dosis entre julio de 2021 y abril 2022, fechas en las que el MINSA de Perú autorizó su uso, por tanto, nuestro estudio se circunscribe al espacio de tiempo anteriormente indicado. Según Atmar R et al, 2022 la estrategia de vacunación que combina una vacuna de RNAm como Pfizer y una vacuna vectorizada con adenovirus Astrazeneca (esquema “heterólogo”) es más inmunogénica que un refuerzo homólogo o con un mismo tipo de vacuna (46). Sin embargo; después de la administración de la vacuna hay efectos secundarios locales (dolor, hinchazón, enrojecimiento) y sistémicos (fiebre, fatiga, dolor de cabeza, dolor muscular, dolor articular, vómito, diarrea) desencadenado por la vacuna y sus adyuvantes (50,51).

Por otro lado, se ha observado que hay una correlación positiva entre los niveles circulantes de citocinas, en particular TNF- α , quimioquinas y marcadores inflamatorios y la generación de anticuerpos contra la región RBD de la proteína Spike, lo que sugiere que la modulación de las citocinas podría verdaderamente ser un biomarcador del éxito de la vacunación y resultando en un eficiente desarrollo de anticuerpos (50). En un estudio longitudinal de fase II con un producto a base de interferón lambda III se detectó una sustancial proporción de LT CD4+ productores de TNF sobre todo en los puntos finales del estudio longitudinal. En

este mismo estudio se demostró que los LT CD4+ productores de TNF medidos en el día 28 se correlacionaron con la producción de anticuerpos medidos hasta 7 meses después del enrolamiento, esto también se correlacionó positivamente con LThf (LT helper foliculares), lo que sugiere que LT CD4+ y LThf específicos a SARS-CoV-2 contribuyen a la durabilidad de los anticuerpos en las personas (52). Si bien es cierto se ha demostrado que la tormenta de citocinas contribuye a la gravedad de la enfermedad en pacientes con COVID-19, los niveles sistémicos de las citocinas permanecen elevados durante la respuesta a la infección; en cambio en personas que se vacunaron hay un aumento transitorio del nivel de citocinas en las primeras semanas, luego de este periodo disminuyen (50,51). Sin embargo, hay células como los LT CD4+ que continúan produciendo TNF- α e IFN- γ post vacunación (52). Si bien es cierto los programas de vacunación ofrecen una protección considerable para evitar la hospitalización y muerte, los datos emergentes sugieren que algunas personas siguen teniendo un riesgo particularmente alto y efectos secundarios asociados a un aumento de citocinas, por lo que resulta interesante poder evaluar la relación entre la citoquina TNF- α y el nivel de anticuerpos IgG en individuos vacunados contra el SARS-CoV-2. Además, se desconoce cómo es la sostenibilidad de los anticuerpos antes y después de un esquema de vacunación en sujetos sanos con o sin antecedente de infección, al respecto Benning L et al, 2022 evaluaron los niveles de anticuerpos IgG en pacientes hemodializados antes y después de la tercera dosis de la vacuna Pfizer encontrando un incremento de anticuerpos IgG (anti-spike) después de la tercera dosis(53).

Según lo anterior, nuestra hipótesis fue que existiría una correlación positiva entre los niveles de TNF- α y los anticuerpos IgG (anti-spike) en personas vacunadas contra el SARS-CoV-2 y que posiblemente el TNF- α contribuiría a mejorar la producción anticuerpos por parte de los LB a través de una respuesta colaborativa muy probablemente por los LT CD4+, tras recibir las dosis de vacunación homólogas o heterólogas. Aunque este estudio no ha sido capaz de demostrar una correlación, sin embargo, inicia una línea de investigación con información básica sobre el rol de citocinas como TNF- α en el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa humoral contra el SARS-CoV-2, lo que se podría mejorar con estudios con mayor tamaño de muestra y con evaluación de LT y LB específicos contra el SARS-CoV-2. Teniendo en cuenta que muchas de las inmunoterapias actuales han tenido su origen

en el conocimiento básico de los mecanismos de acción del sistema inmune es posible que en un futuro esta línea de investigación pueda generar algún tratamiento inmunoterapéutico capaz de mejorar la respuesta inmune ante el SARS-CoV-2.

Pregunta de Investigación / Problema de investigación

¿Existe una correlación positiva entre los niveles séricos del factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α) y los anticuerpos IgG (anti- spike) antes o después de la tercera dosis de vacunación de Pfizer o Astrazeneca contra el SARS-CoV-2?

Objetivos

Objetivo principal

Determinar la correlación entre los niveles séricos del factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α) y los anticuerpos IgG (anti- spike) antes y después de recibir la tercera dosis de vacunación contra el SARS-CoV-2.

Objetivos específicos

- Evaluar la producción de TNF- α en personas infectadas o asintomáticas a SARS-CoV-2 antes y después de la tercera dosis de la vacuna Pfizer o Astrazeneca.
- Evaluar los niveles de IgG (anti-spike) contra el SARS-CoV-2 en sujetos sin infección (grupo control, GC), con infección (grupo G1) y indeterminados (grupos G2 y G3) vacunados con la primera y segunda dosis de la vacuna Pfizer.
- Comparar los niveles de IgG (anti-spike) antes y después de la tercera dosis de vacunación.
- Determinar la correlación estadística entre los niveles de TNF- α y anticuerpos IgG (anti-spike) en sujetos con infección (grupo G1) y indeterminados (grupos G2 y G3) antes y después de la tercera dosis de Pfizer o Astrazeneca.

Materiales y métodos

Participantes – Criterios de inclusión/exclusión

Todos los participantes fueron enrolados por el equipo de investigación del Laboratorio de Inmunología # 108 – LID – FACIEN – UPCH, la mayor por parte fueron estudiantes universitarios, excepto dos adultos mayores (ver Anexos). Todos recibieron información del estudio y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Institucional de Ética (CIE - UPCH; CONSTANCIA E-111-19-23 ver Anexos). A todas las muestras se les realizó el descarte serológico de otras enfermedades infecciosas gracias al gentil apoyo del Dr. Pedro Aro del Banco de Sangre del Hospital Nacional Cayetano Heredia (HNCH) ver Tabla 2.

Los **criterios de inclusión** fueron: Contar con un esquema de vacunación de primera y segunda dosis de la vacuna de Pfizer (nombre técnico: BNT162b2) más tercera dosis de la vacuna Pfizer con infección entre 0 a 4 meses después de las dos primeras dosis (grupo G1) o con tercera dosis de Pfizer (grupo G2) o tercera dosis de AstraZeneca (nombre técnico: ChAdOx1-S) (grupo G3), ambos grupos indeterminados (ver Tabla 1); sin comorbilidades; varones o mujeres mayores de 18 años y sueros de un grupo control (obtenido antes de diciembre de 2019) sin infección por SARS-CoV-2 pero positivo a virus Dengue, determinado por RT-PCR, los que fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Michael Talledo – Unidad de Virología – IMT Alexander von Humboldt; mientras que los **criterios de exclusión** fueron: contar con otro(s) esquema(s) de vacunación contra SARS-CoV-2 no incluido(s) en el estudio, estar embarazada y estar en tratamiento con inmunosupresores. Las muestras de suero se obtuvieron antes y después de la tercera dosis con la vacuna de Pfizer o de AstraZeneca.

Tabla 1. Distribución de los grupos de estudio.

Se establecieron cuatro grupos de estudio según su condición de vacunación, tamaño de muestra y condición de la población.

Grupo	Tamaño de muestra	Condición
GC = Control sin infección	n=10	Estos sueros han sido obtenidos de la seroteca del Dr. Michael Talledo – Unidad de Virología – IMT Alexander von Humboldt. Estas muestras se obtuvieron antes de diciembre de 2019.
G1 = Homólogo, con infección	n=07	Participantes que tuvieron infección por SARS-CoV-2 entre 0 a 4 meses después de recibir la primera y segunda dosis de Pfizer y al cual se le tomó muestra antes y después de la tercera dosis de Pfizer .
G2 = Grupo homólogo, indeterminado	n=07	Participantes indeterminados después de la primera y segunda dosis de Pfizer y al cual se le tomó muestras antes y después de la tercera dosis de Pfizer .
G3 = Heterólogo, indeterminado	n=09	Participantes indeterminados después de la primera y segunda dosis de Pfizer y a los cuales se les tomó muestras antes y después de la tercera dosis de AstraZeneca .

Valoración de riesgos y medidas de bioseguridad ante el COVID-19

El personal del estudio fue capacitado en las medidas de bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio. El Laboratorio de Inmunología # 108 siguió las disposiciones de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía (FACIEN) – UPCH para el trabajo en el laboratorio, según el Manual de Bioseguridad de FACIEN. Adicionalmente, nos

regimos por las Orientaciones sobre Bioseguridad en el Laboratorio relacionada con la COVID-19 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el manejo y transporte de muestras. Según estas directrices el Laboratorio cuenta con riesgo biológico muy bajo para las actividades que involucran manejo de muestras de personas con COVID-19 (55,56).

La toma de muestras estuvo a cargo por el equipo de investigación del Laboratorio de Inmunología LID#108 – FACIEN – UPCH, quienes también se encargaron de la captación de donantes voluntarios.

El equipo de investigación del proyecto se comprometió a realizar una capacitación sobre la toma y transporte de muestras de acuerdo con las medidas de control de riesgo biológico frente a la exposición de agentes biológicos como el virus SARS- CoV-2. El equipo de investigación se comprometió a inspeccionar periódicamente el cumplimiento de las medidas de bioseguridad. Por ejemplo, el uso correcto de los EPPs (proporcionados por el laboratorio de inmunología); adecuado rotulado y envasado de la muestra problema para un correcto transporte hacia el laboratorio de inmunología LID-108 FACIEN- UPCH y almacenamiento de las muestras a -20°C hasta su uso (56).

Obtención de muestras de suero

Se obtuvieron muestras de sangre, previa firma de un consentimiento informado (ver Anexo) aprobado por el CIE-UPCH (CONSTANCIA E-111-19-23). En total se obtuvieron muestras de sangre periférica de personas, las cuales se colectaron antes y después de la tercera dosis de vacunación. A partir de estas muestras se obtuvo el suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta su uso. Adicionalmente se obtuvo una donación de 10 sueros provenientes de la seroteca del Dr. Michael Talledo – Unidad de Virología – IMT Alexander von Humboldt. Estas muestras se obtuvieron antes de diciembre de 2019. Todas las muestras de sangre periférica fueron procesadas por centrifugación a 3000 rpm para separar los sueros, una

parte fue destinada para la medición de anticuerpos, la otra parte sirvió para la medición de citocinas y una parte para la serología de infecciones, la cual fue realizada gentilmente por el Dr. Pedro Aro del Banco de Sangre del HNCH y consistió en el descarte serológico de VIH, hepatitis B y C, HTLV, sífilis, Enfermedad de Chagas, las cuales se realizaron siguiendo estrictamente los protocolos de los fabricantes. Las muestras alicuotadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de las mediciones. Para estudios futuros se le solicitó al participante autorización para la conservación de su muestra previa firma del consentimiento informado.

Se eligió un muestreo por conveniencia; sin embargo, estadísticamente nuestro tamaño de muestra fue determinado con el programa G*power, considerando un $\alpha = 0.05$, un poder $(1 - \beta) = 0.80$ y el tamaño de efecto largo Cohen = 0.54, obteniéndose un tamaño muestral por grupo de estudio de 23 individuos (57); sin embargo, debido a la coyuntura cambiante del COVID-19 y al aumento de los procesos de vacunación entre otros factores ajenos al proyecto sólo fue posible obtener muestras de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en suero humano

La técnica de ELISA es un método colorimétrico que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo y permite determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia de antígenos (Ej. TNF- α) o anticuerpos (IgG) dependiendo del tipo de ELISA que se utilice (Ej. Sándwich o Indirecto). En este estudio se aplicaron dos tipos de ELISA cuantitativos, uno indirecto, para medir la concentración de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 (EDITM Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA kit, USA), micropozos revestidos con la proteína recombinante de la superficie o proteína Spike (S) de longitud completa) y otro tipo sándwich, para medir la concentración de la citoquina TNF- α (BD OptEIATM Human TNF ELISA kit II, USA). En ambos casos se siguieron estrictamente las indicaciones del fabricante.

ELISA para la determinación de anticuerpos IgG (anti-Spike) contra el SARS-CoV-2.

Preparación de reactivos. Antes de su uso, se dejó que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente. El concentrado de lavado ELISA se diluyó hasta la solución de trabajo antes de su uso.

Preparación de la muestra. Se diluyó la muestra 1: 100 con el diluyente de muestras de IgG. Por cada 10 μL de muestra se usó 1000 μL de diluyente de muestras.

Procedimiento de ensayo. Se colocó una cantidad suficiente de tiras de micropocillos en un soporte para correr controles y muestras. Se agregó 100 μL de controles y muestras diluidas 1: 100 en los micro pocillos designados. Se mezcló suavemente y se cubrió la microplaca con un sellador de placas y papel aluminio. Se incubó a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos. Se retiró el sellador de placas. Se aspiró el contenido de cada pocillo. Se lavó cada micropocillo 5 veces dispensando 300 μL de solución de lavado diluida y luego se aspiró el contenido. Se agregó 100 μL del anticuerpo anti-IgG humano marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, por las siglas en inglés) en cada micropocillo. Se mezcló suavemente y se cubrió la placa con un sellador de placas y papel aluminio. Se incubó a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos. Se retiró el sellador de microplacas. Se aspiró el contenido de cada micropocillo. Se lavó cada micropocillo 5 veces dispensando 300 μL de solución de lavado diluida. Se aspiró el contenido. Se agregó 100 μL del sustrato HRP en cada micropocillo. Se mezcló suavemente y se cubrió la placa con papel aluminio. Se incubó a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$) durante 20 minutos. Se retiró el papel aluminio y se agregaron 100 μL de solución de parada a cada micropocillo. Se mezcló suavemente tapando la placa. Se leyó la absorbancia a 450 nm dentro de los 10 minutos con un lector de microplacas.

Cálculo de concentración de anticuerpos IgG Anti- Spike (SARS-CoV-2)

La concentración de anticuerpo IgG se obtuvo a partir de los valores de absorbancia a 450 nm de las muestras y por extrapolación a una curva estándar con concentraciones conocidas de anticuerpos IgG anti-spike. La curva estándar se realizó como una regresión lineal simple, en la que se consideró la cercanía a 1 del R^2 (curva con el mejor ajuste), parámetro que permite indicar que tan buena es la curva. Se utilizó el software GraphPad versión 9 (Figura 2). Ver datos en Anexos.

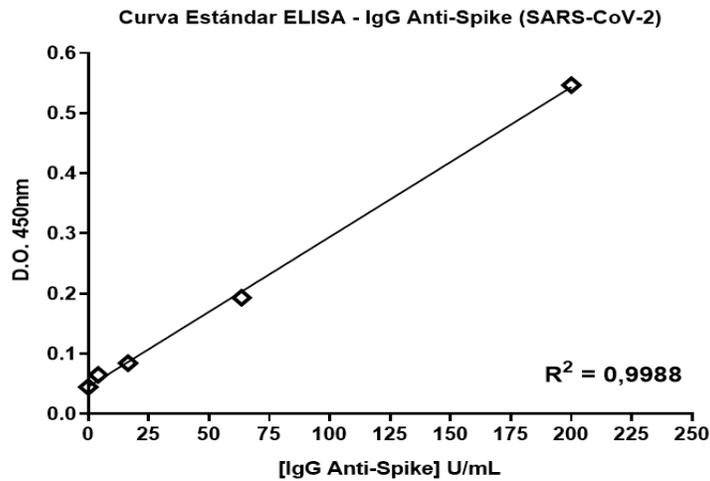


Figura 2 Curva estándar del ELISA para cuantificar la concentración de anticuerpos IgG Anti- Spike (U/mL).

La curva estándar utilizó 5 estándares: 0; 4,1; 16,5; 63,5 y 200 U/mL. R^2 = precisión de la regresión lineal

ELISA para la determinación de TNF- α en pacientes con COVID-19

Preparación y manipulación de estándares. Reconstitución: Se atemperó el estándar liofilizado a temperatura ambiente, se abrió el vial con cuidado para evitar la pérdida de material. Se reconstituyó el estándar liofilizado con 1.0 mL de agua desionizada para producir un estándar stock. Se dejó que el estándar se equilibrara durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente antes de realizar las diluciones. Se agitó suavemente para mezclar.

Preparación de estándares para el ensayo: Se preparó un estándar de 500 pg/mL a partir del estándar stock. Se agitó para mezclar. Se añadió 300 µl de diluyente de ensayo a 6 tubos. Se etiquetaron como 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL y 7.8 pg/mL. Se realizaron diluciones en serie agregando 300 µL de cada estándar al siguiente tubo y agitando en vórtex entre cada transferencia. El diluyente de ensayo sirvió como estándar cero (0 pg/mL).

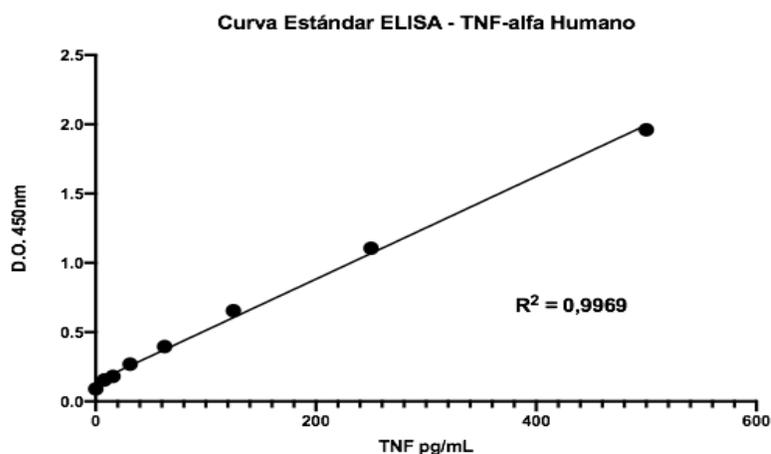


Figura 3 Curva estándar del ELISA para cuantificar la concentración de TNF-alfa (pg/mL) en suero humano.

La curva estándar utilizó 8 estándares: 0; 7,5; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 y 500 pg/mL. R^2 = precisión de la regresión lineal.

Preparación del detector de trabajo (conjugado). Se agregó el volumen requerido de anticuerpo de detección al diluyente de ensayo. Dentro de los 15 minutos antes de su uso, se agregó la cantidad requerida de la enzima, se agitó bien. Tanto el anticuerpo de detección como la enzima se usaron a una dilución 1/250, según certificado de lote del fabricante.

Procedimiento de ensayo. Se recubrió los micropocillos con 100 µL por micropocillo de anticuerpo de captura diluido (1/250) en tampón de recubrimiento. Se selló la microplaca y se incubó durante toda la noche a 4 ° C. Se aspiraron los micropocillos y se lavaron 3 veces con 300 µL/micropocillo de

tampón de lavado. Después del último lavado, se invirtió la microplaca y se secó con papel absorbente para eliminar cualquier tampón residual. Se bloquearon las microplacas con 200 μL /micropocillo de diluyente de ensayo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se aspiró / lavó como en el paso 2. Se prepararon diluciones de los estándares y de las muestras en diluyente de ensayo. Se pipeteo 100 μL de cada estándar y muestras en los micropocillos apropiados. Se selló la microplaca y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se aspiró / lavó como en el paso 2, pero con 5 lavados en total. Se añadió 100 μL de detector de trabajo (anticuerpo de detección unido a biotina + reactivo enzimático estreptavidina-HRP) a cada micropocillo. Se selló la microplaca e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró/lavó como en el paso 2, pero con un total de 7 lavados. NOTA: En este paso de lavado final, se remojó los micropocillos en el tampón de lavado durante 30 segundos para cada lavado. Se agregó 100 μL de solución de sustrato a cada micropocillo. Se incubó la microplaca (sin sellador de microplacas) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadió 50 μL de solución de parada a cada micropocillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 minutos posteriores a la detección de la reacción.

Cálculo de resultados

Se calculó la absorbancia de cada estándar y muestra. Se restó la absorbancia del estándar cero a cada estándar y muestra (corrección del cero). Se realizó en el software GraphPad v 9.0 una curva estándar con la concentración de TNF- α en el eje x y las absorbancias en el eje y (Fig. 3). Se determinó el mejor ajuste de la curva a través de los puntos estándar según el valor de R^2 . Para determinar la concentración de TNF- α en las muestras, se utilizó una ecuación de regresión lineal simple donde luego de reemplazar el valor de absorbancia X se calculó el valor de Y o la concentración de TNF- α en pg/mL. Ver datos en Anexos.

Aspectos éticos del estudio.

El presente proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CONSTANCIA E-111-19-23). El equipo de investigación siguió los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos indicados en la Declaración de Helsinki 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013.

Las muestras de suero usadas en el estudio fueron procesadas para la serología de infecciones (VIH, hepatitis B y C, HTLV, sífilis, Enfermedad de Chagas), la cual fue facilitada gentilmente por el Dr. Pedro Aro del Banco de Sangre del HNCH.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad versión 9. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (para menos de 50 datos) para estimar la distribución de los datos. Cuando los datos de las variables a evaluar pasaban la prueba de normalidad ($p > 0,05$) se eligieron pruebas paramétricas como la prueba t pareado o no pareado y el ANOVA de una vía o "one way" seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples y cuando no pasaban la prueba de normalidad ($p < 0,05$) se eligieron pruebas no paramétricas como la prueba de Wilcoxon. Eventualmente ocurrió que, en algunos datos de 2 variables a comparar, unos pasaron el test y los otros no, en ese caso se utilizó las pruebas no paramétricas, según convención. Adicionalmente, cuando fue necesario se aplicó la prueba de "outliers" para descartar los valores que no seguían el comportamiento de los grupos evaluados. Para graficar los resultados se realizaron gráficas de caja y bigote y gráficas de símbolos y líneas. En todos los casos se determinaron valores promedio con el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). La correlación estadística fue evaluada con la prueba de Pearson cuando los datos de las variables seguían una distribución normal y con la prueba de Spearman cuando los datos de las variables no seguían

una distribución normal. En ambos tipos de correlaciones se tomó en cuenta el valor de r (Rho) para un intervalo de confianza del 95% y la significancia estadística ($p < 0,05$).

Resultados

Características generales de la población de estudio.

En este estudio se enrolaron 23 participantes en su mayoría estudiantes universitarios provenientes de distintos distritos de Lima Metropolitana (Tabla 2). La mediana promedio de edad de los participantes fue de 21,6 años con un mínimo de 19,3 años y un máximo de 35,6 años, en el grupo G1, la mediana fue de 21 años (19-22 años, IC95%); en el grupo G2, 22 años (19-54 años, IC95%) y en el grupo G3, 22 años (20-23 años, IC95%). Entre estos grupos no se vio una diferencia significativa (ANOVA una vía, $p > 0,005$).

En general, el 65,2% ($n=15$) de los participantes era de sexo masculino, mientras que el 34,8% ($n=8$) fue del sexo femenino, tanto 4 participantes (57,1%) del grupo con infección (G1), 4 participantes (57,1%) del grupo homólogo (G2) y 7 participantes (77,7%) del grupo heterólogo (G3) eran de sexo masculino. El descarte serológico de otras infecciones resultó negativo. Entre los grupos de estudio no se vio diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 2. Características básicas de los participantes de los tres grupos

Variable	Grupo 1 (n=7)	Grupo 2 (n=7)	Grupo 3 (n=9)
Edad (años, mediana, IC95%)	21 (19 - 22)	22 (19 - 54)	22 (20 – 23)
Sexo (%)			
<i>Masculino, n(%)</i>	4 (57,1%)	4 (57,1%)	7 (77.7%)
<i>Femenino, n(%)</i>	3 (42,9%)	3 (42,9%)	2 (22,3%)
Comorbilidades (%)			
Sí	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
No	7 (100%)	7 (100%)	9 (100%)
Infecciones (%)			
A- HBCII, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CHAGAS, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CMVIGM, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
A- HCV, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
HTLV, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Syphilis, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
HBSAGII, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
HIVCOMPT, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Prueba antigénica (%)			
Si	5 (71.4 %)	0 (0%)	0 (0%)
No	2 (28.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Prueba molecular (%)			
Si	2 (28.6%)	0 (0%)	0 (0%)
No	5 (71.4%)	0 (0%)	0 (0%)
Días entre primera y segunda dosis, mediana (IC95%)	22 (21 -42)	24 (21 – 51)	21 (21 -98)
Días entre segunda y tercera dosis, mediana (IC95%)	152 (119 – 166)	167 (116 – 261)	156 (108 – 181)
Meses entre primera y segunda toma de muestra, mediana (IC95%)	2 (2 -6)	4 (1 – 6)	3,5 (1 – 6)

A-HBCII = Anticuerpos para el antígeno core del virus de la hepatitis B; Chagas = Enfermedad de Chagas - anticuerpos IgG; CMVIGM = anticuerpos IgM para el citomegalovirus; A-HCV = Anticuerpos contra el virus de la hepatitis C; HTLV = virus linfotrópico de células T humanas tipo I; Syphilis = sífilis, causada por *Treponema pallidum*; HBSAGII = Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; HIVCOMPT = Anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana. NR = No reactivo; R=Reactivo

Niveles de TNF- α antes y después de la tercera dosis de vacunación

De los grupos G1, G2 y G3 todos los participantes donaron su primera muestra de suero luego de las dos primeras dosis de Pfizer y antes de recibir la tercera dosis de Pfizer (G1 y G2) o AstraZeneca (G3), es decir entre el 2 de enero y 30 de agosto de 2022; además, solo el grupo G1 tuvo infección por SARS-CoV-2 y los grupos G2 y G3 fueron considerados indeterminados al momento de la toma de muestra. Estos mismos grupos donaron su segunda muestra de suero después de la tercera dosis de Pfizer o Astrazeneca. Los resultados indican que únicamente existió diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de TNF- α en el G1 antes y después de la tercera dosis siendo la diferencia de medias de 28.04 pg/mL (IC: 0.0028 - 56.07pg/mL) Figura 4.

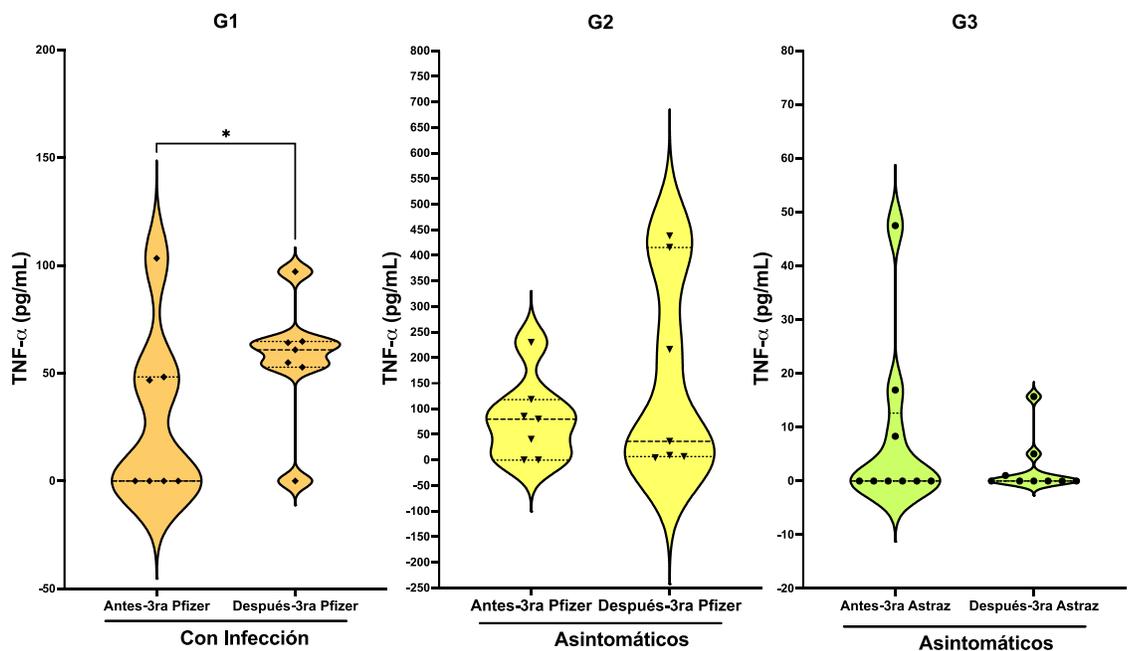


Figura 4 Niveles de TNF- α de muestras tomadas antes y después de la tercera dosis.

Gráfica de violín mostrando los niveles de TNF- α en pg/mL en participantes con infección (G1, n=7) y indeterminados (G2, n=7 y G3, n=9) antes y después de la tercera dosis de Pfizer (G1 y G2) o Astrazeneca (G3). En cada gráfica las líneas centrales representan la mediana; mientras que las líneas superiores e inferiores representan los intervalos de confianza al 95%. La gráfica también muestra la densidad de probabilidad de la variable TNF- α y la moda que es el valor más frecuente de los datos. Test t no pareado, * $p < 0.05$.

Niveles de anticuerpos IgG antes y después de iniciarse la pandemia del COVID-19

En esta evaluación se juntaron los grupos homólogo (G2, n=7) y grupo heterólogo (G3, n=9) antes de la tercera dosis, por lo que corresponden a participantes que recibieron ambas las dos primeras dosis de Pfizer, son indeterminados y juntos equivalen a un n=16 participantes con la misma característica. El grupo G2-G3 (n=16) tuvo niveles altos y significativamente diferentes de anticuerpos IgG anti-spike en comparación con el grupo control (GC, n=10) ($p < 0,0001$). Con este resultado se pudo verificar la diferencia entre muestras obtenidas pre y pos-pandemia (Figura 5). Se encontró que la mediana de anticuerpos IgG (anti-spike) del grupo G2-G3 fue de 654,5 U/mL (IC95: 438,3 – 870,6 U/mL); mientras que la mediana del grupo GC fue de 3,8 U/mL (IC95: 1,73 – 4,716 U/mL), lo cual según el cálculo del valor de corte (60 U/mL) sugerido por el fabricante del kit es un resultado cuantitativamente negativo.

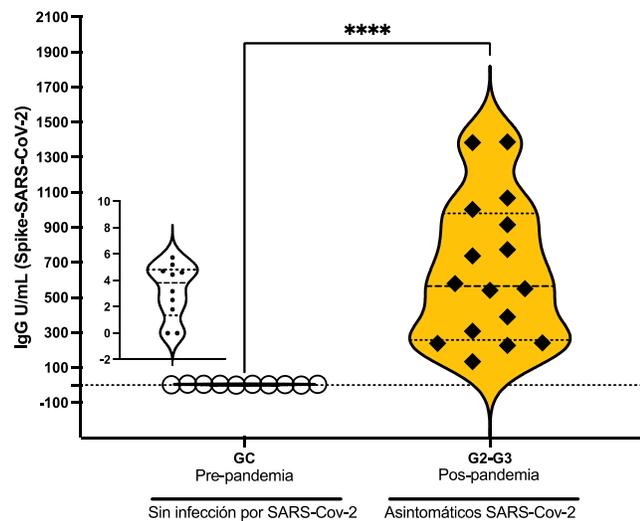


Figura 5 Niveles de anticuerpos IgG anti-spike de muestras tomadas antes y durante la pandemia en participantes no infectados y indeterminados.

Gráfica de violín mostrando los niveles de anticuerpos IgG (anti-spike) en U/mL en participantes sin infección (antes de diciembre de 2019, GC, n=10) y indeterminados durante la pandemia (27/01 y 30/08 de 2022) (G2+G3, n=16). En cada gráfica las líneas centrales representan la mediana; mientras que las líneas superiores e inferiores representan los intervalos de confianza al 95%. La gráfica también muestra la densidad de probabilidad de la variable IgG y la moda que es el valor más frecuente de los datos. En el grupo GC se representa una gráfica de violín que visualiza los valores de IgG inferiores a 8 U/mL. Prueba t no pareado, **** $p < 0,0001$. GC= grupo control pre-pandemia; G2-G3 = grupo indeterminado con 2 dosis de Pfizer.

Seguidamente evaluamos los niveles de anticuerpos IgG (anti- spike) en los grupos G1, G2 y G3 con respecto al grupo control (GC) De los grupos G1, G2 y G3 todos los participantes donaron su primera muestra de suero luego de las dos primeras dosis de Pfizer y antes de recibir la tercera dosis de Pfizer (G1 y G2) o Astrazeneca (G3), es decir entre el 2 de enero y 30 de agosto de 2022 ; además, solo el grupo G1 tuvo infección por SARS-CoV-2 y los grupos G2 y G3 fueron indeterminados al momento de la toma de muestra. Los resultados indican que todos los grupos evaluados mostraron niveles significativamente superiores de anticuerpos IgG a los del grupo GC; sin embargo, cuando se hizo la comparación múltiple entre los grupos G1, G2 y G3 no se encontró diferencia significativa entre estos grupos (Figura 6). Los grupos fueron vacunados (primera y segunda dosis) entre julio y diciembre de 2021; mientras que la primera y segunda tomas de muestra de suero fueron entre enero y agosto de 2022, respectivamente. Los resultados indican que hasta la primera toma de muestra estos grupos en promedio mantuvieron los mismos niveles de anticuerpos durante 5,6 meses después de recibir la primera dosis.

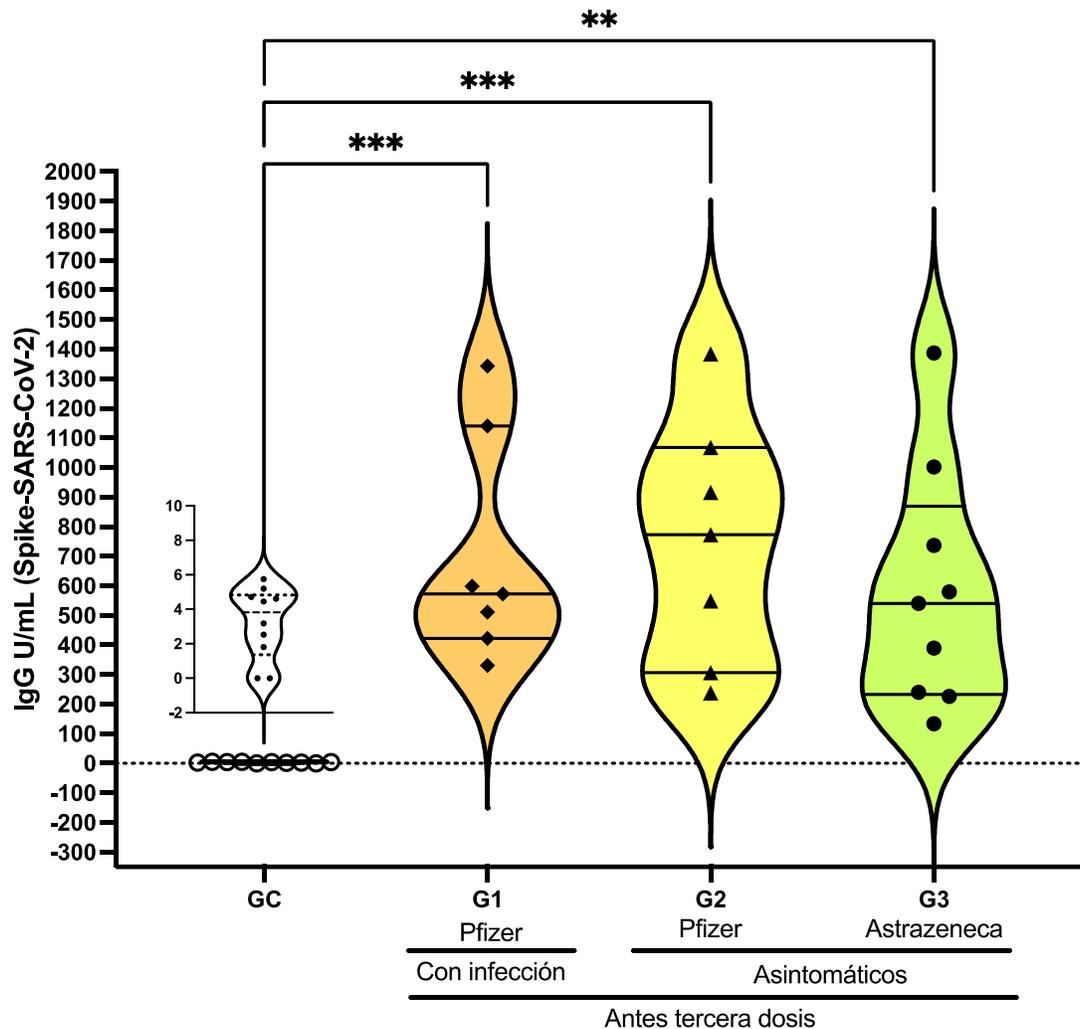


Figura 6 Niveles de anticuerpos IgG anti-spike de muestras tomadas antes (GC) y durante la pandemia (G1, G2 y G3).

Gráfica de violín mostrando los niveles de anticuerpos IgG (U/mL) en donantes vacunados con primera y segunda dosis de Pfizer con infección (G1, n=7) o indeterminados (G2, n=7 y G3, n=9) y antes de la tercera dosis. En cada gráfica las líneas centrales representan la mediana; mientras que las líneas superiores e inferiores representan los intervalos de confianza al 95%. La gráfica también muestra la densidad de probabilidad de la variable IgG y la moda que es el valor más frecuente de los datos. En el grupo GC se representa una gráfica de violín que visualiza los valores de IgG inferiores a 8 U/mL. Se realizó ANOVA one way y prueba post hoc de Tukey por comparaciones múltiples, se consideró diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.005$.

Producción de anticuerpos IgG antes y después de la tercera dosis de vacunación

Para determinar la variación del nivel de anticuerpos IgG se realizó una evaluación entre anticuerpos medidos en muestras de suero obtenidas antes y después de la tercera dosis de la vacunación con Pfizer o Astrazeneca. Los resultados demuestran que, independientemente del tipo de vacuna, la condición de infección o indeterminado y de haber transcurrido una mediana de 42, 89 y 47,5 días, para cada grupo, entre la primera (pre-3ra. dosis) y segunda (pos-3ra. dosis) tomas de muestra, los niveles de anticuerpos se mantienen sin diferencia estadística significativa en los participantes del estudio. Aunque no hubo diferencia en ninguno de los grupos G1, G2 y G3; sin embargo, se pueden ver tendencias en la mediana de la concentración de los anticuerpos donde la mediana de anticuerpos IgG antes de la tercera dosis de Pfizer en los grupos G1 y G2 (homólogos) fue de 572 U/mL (IC95: 331,2 – 1342 U/mL) y 773,5 U/mL (IC95: 238,3 – 1384 U/mL) y luego de la tercera dosis de Pfizer tiende a disminuir hasta 463 U/mL (IC95: 337,6 – 1024 U/mL) y 463,7 U/mL (IC: 259,7 – 1348 U/mL), respectivamente; mientras que en el grupo G3 (heterólogo) con dos dosis de Pfizer y una tercera dosis de Astrazeneca en promedio el nivel de anticuerpos mostró una tendencia a incrementar de 465,1 U/mL (IC95: 226,2 – 1002 U/mL) a 710,2 U/mL (IC95: 319,2 – 1016 U/mL) (Figura 7).

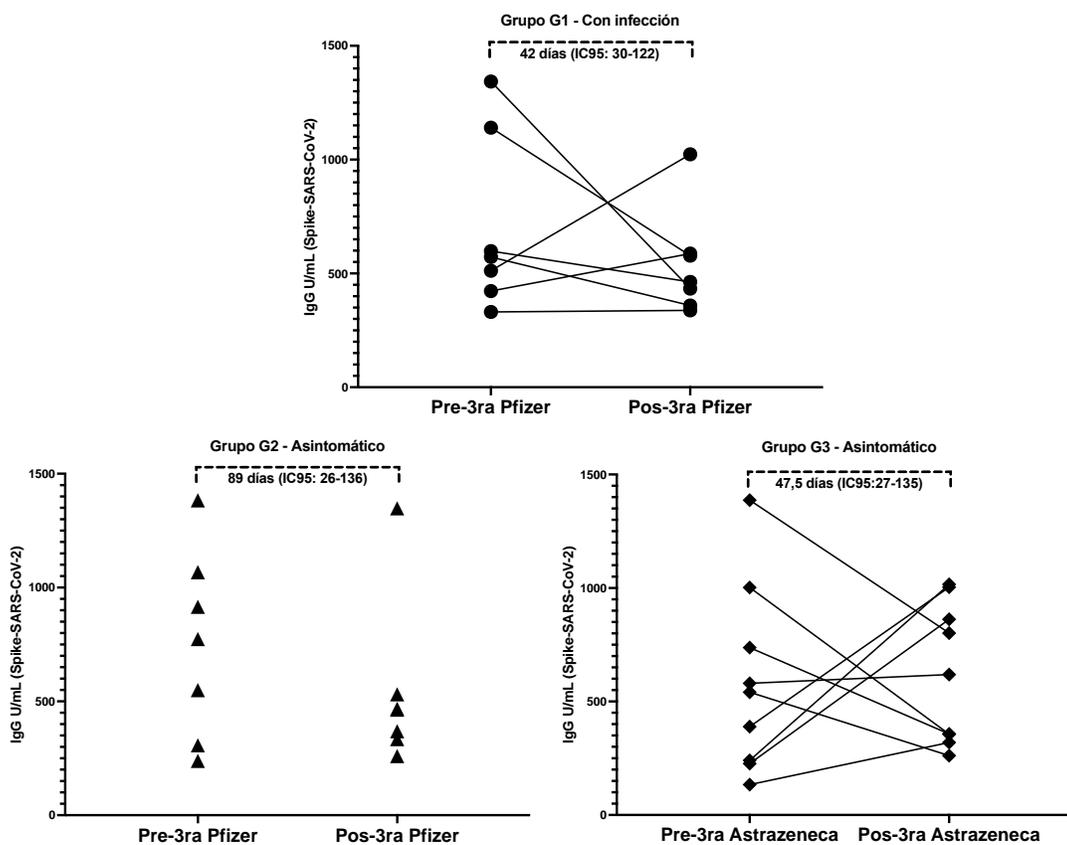


Figura 7 Producción de anticuerpos IgG anti-spike de muestras tomadas antes y después de la tercera dosis de vacunación.

Se midió mediante ELISA la concentración de anticuerpos IgG en los grupos homólogos (G1, n=7, G2, n=7) y heterólogo (G3, n=9) antes y después de recibir la tercera dosis de la vacuna de Pfizer (G1, G2) o Astrazeneca (G3). El tiempo transcurrido entre estas dos tomas de muestra tuvo una mediana de 42 días para G1; 89 días para G2 y 47,5 días para G3. G1 y G3 fueron analizados por la prueba-t pareada y G2 por la prueba de Wilcoxon mediante GraphPad v9. Se consideró significancia estadística si $p < 0,05$.

Correlación estadística entre los niveles de TNF- α y anticuerpos IgG en participantes vacunados con la tercera dosis de Pfizer o AstraZeneca

Con el objetivo de determinar si la producción de la citocina sistémica TNF- α producida por células del sistema inmune colabora o no con la producción de anticuerpos por parte de los LB se midieron ambas variables. En el caso de los anticuerpos IgG se pudo observar la producción de estos en los grupos G1, G2 y G3 (Fig. 6); mientras que en el caso de TNF- α , solo el grupo G1 produjo diferentes niveles de esta citocina (Fig. 4). En el caso de las correlaciones se analizó el valor de rho (r) o coeficiente de correlación para Pearson y/o Spearman antes y después de la

tercera dosis y encontramos que en G1 la correlación fue escasa o nula con $r = -0,03571$ (Spearman) y $r = -0,07143$ (Pearson), respectivamente; en G2 también las correlaciones fueron escasas o nulas con $r = -0,023$ (Pearson) y $r = -0,1429$ (Spearman) y en G3 la correlación antes de la tercera dosis fue moderada con $r = -0,5842$ (Spearman) pero no lo suficiente para ser estadísticamente significativa ($p > 0,05$); mientras que después de la tercera dosis la correlación fue casi nula con $r = -0,1881$ (Spearman), ver Figura 8 (58).

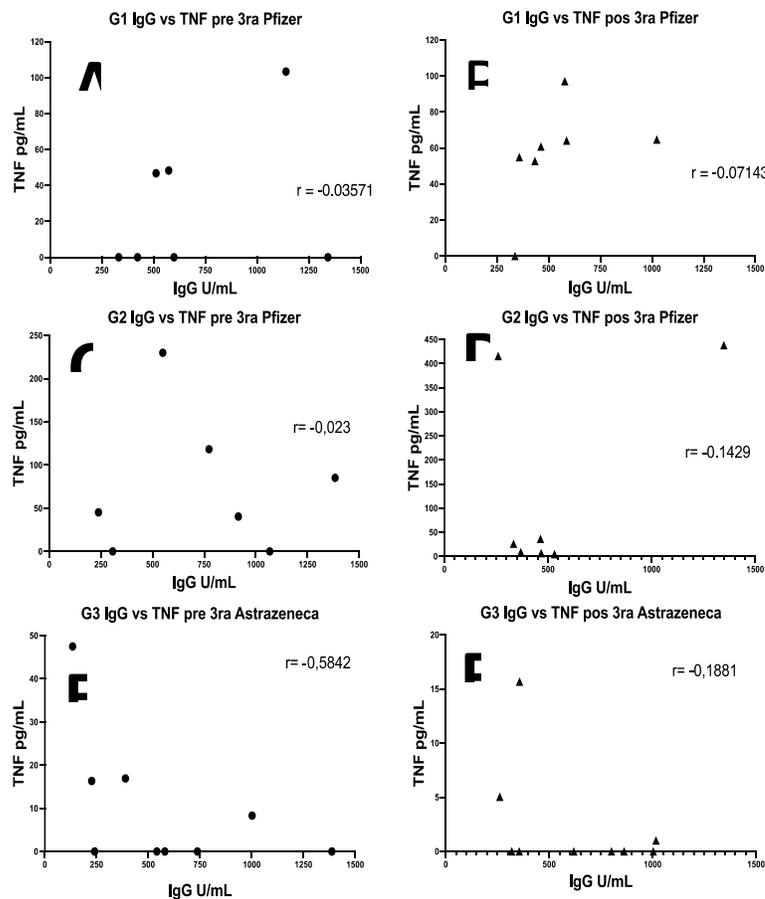


Figura 8 Correlación entre TNF- α y anticuerpos IgG anti-spike en participantes vacunados antes y después de tercera dosis de vacunación.

Se realizó la correlación estadística de Pearson y/o Spearman según correspondía entre las variables TNF- α y IgG y se determinó la índice rho de correlación (r). Donde G1 (grupo homólogo con infección, n=7); G2 y G3 (grupos heterólogos, indeterminados, n=7 y n=9); TNF- α =Factor de necrosis tumoral tipo alfa; IgG=Inmunoglobulina de tipo G; r=rho, coeficiente de correlación. Análisis de correlación de Pearson y/o Spearman para un nivel de confianza de 95% y significancia si $p < 0,05$. GraphPad Prism versión 9.

Discusión

La enfermedad del coronavirus COVID-19 causada por el SARS-CoV-2 ocasionó innumerables muertes y hospitalizaciones alrededor del mundo. Los pacientes que desarrollaron la enfermedad del COVID-19 severo tuvieron un aumento de niveles de citocinas denominado “tormenta de citocinas” que ocasionó una respuesta hiperinflamatoria. En el 2020 se empezó una campaña masiva de vacunación en todo el mundo que disminuyó considerablemente las muertes y hospitalizaciones. Dado que las infecciones aún continúan y continuarán en diversas partes del mundo, es necesario e importante que continúen los estudios no solo epidemiológicos y clínicos sino también los estudios sobre el conocimiento básico de cómo actúa el sistema inmune, ya que gracias a este tipo de estudios se han obtenido muchas inmunoterapias contra distintas condiciones que afectan al ser humano. En esta línea nuestro estudio ha pretendido generar conocimiento sobre el comportamiento de dos moléculas producidas durante la activación del sistema inmune durante el curso de una infección o vacunación contra el SARS-CoV-2, tanto los anticuerpos IgG (anti-spike) como las citocinas como TNF- α han demostrado interactuar directa o indirectamente en el desarrollo del COVID-19. En principio los participantes de los grupos vacunados con la tercera dosis de Pfizer con infección (G1) o tercera dosis de Pfizer, indeterminados (G2) o tercera dosis de Astrazeneca, indeterminados (G3) (Tabla 1) no mostraron diferencias significativas en cuanto a características epidemiológicas como edad, sexo, comorbilidad o infecciones distintas a la COVID-19, excepto por dos participantes que dieron positivo al test serológico de antígeno de superficie del virus de hepatitis B que fueron descartados del estudio; sin embargo, Yassine HM et al, 2020 demostraron que muestras de infecciones por virus no respiratorios como el virus de hepatitis B no interfieren con la detección de anticuerpos IgG (anti-spike) (59). Asimismo, hemos observado que el kit de ELISA (EDITM Novel Coronavirus COVID-19 IgG, USA) diferenció entre las muestras negativas y positivas a anticuerpos IgG (anti-spike) (Fig.4), lo que confirma la evaluación de la performance realizada por Yassine HM et al, 2020. En una pequeña evaluación sobre la producción de anticuerpos IgG antes y después de la tercera dosis no encontramos diferencias

estadísticamente significativas en cuanto a las concentraciones de estos anticuerpos en los grupos G1, G2 y G3; sin embargo, si es de destacar que el grupo heterólogo G3 mostró una tendencia al incremento de la concentración de anticuerpos (Fig.6) a diferencia de los grupos homólogos G1 y G2, quienes mostraron una tendencia a la disminución. Esta tendencia del grupo G3 se alinea a los resultados de Atmar Rl et al, 2022 para quien la vacunación heteróloga (Pfizer y Astrazeneca) es más inmunogénica que un refuerzo homólogo o con un mismo tipo de vacuna (46). En nuestro caso solo podemos indicar una tendencia que necesita ser corroborada por un mayor número muestral. Diao B. et al 2020, demostró que en pacientes recobrados de la COVID-19 las cuentas de LT, en particular los CD4+, se correlacionaron negativamente con los niveles de TNF- α , es decir, a mayor número de LT CD4+ menor concentración de TNF- α . Además, cuando los niveles LT CD4+ disminuyen existe un agotamiento celular o envejecimiento (LT CD4+ PD1+) que induce la expresión del receptor TNFR1, al que se une la citoquina proinflamatoria TNF- α , la que induce la muerte celular por apoptosis. Los LT CD4+ y en particular los LThf (helper foliculares) colaboran con los LB para que estos produzcan anticuerpos (60). Según lo anteriormente descrito, nuestra hipótesis planteaba que los niveles de TNF- α se podrían correlacionar con los niveles de IgG en pacientes vacunados contra el SARS-CoV-2. En este caso se esperaría una correlación positiva en la que un aumento de TNF- α produciría un incremento de anticuerpos IgG (anti-spike). Considerando además que los anticuerpos han sido inducidos por la vacunación se espera contar con la presencia de estos anticuerpos en los participantes. Nuestros resultados indican que si bien se encontraron anticuerpos a distintas concentraciones estas no se correlacionaron estadísticamente con los niveles de TNF- α ni antes ni después de la vacunación homologa o heteróloga. Además, luego de determinar las concentraciones de las muestras mediante la curva estándar ciertos valores de muestras extrapoladas resultaron negativos, ya que estos signos carecen de significado biológico, los estudios al respecto los consideran como valores de 0, que es lo que se ha hecho en este estudio. En el caso del kit usado la curva estándar garantiza una linealidad entre 7,5 – 500 pg/mL y además el valor de R2 cercano a 1

significa una excelente linealidad; sin embargo, es posible con la ayuda de un software de análisis extrapolar los valores negativos de D.O pero se tendrían valores de concentración negativos que como se indicó no se suelen usar por lo que por esta razón se consideraron 0pg/mL. Según Aguillo JC et al Rev. méd. Chile v.130 n.9 Santiago sep. 2002 en individuos sanos, sus niveles son variables, fluctuando entre 50 pg/ml y no detectables (61). Los niveles superiores a 100 pg/ml, en general, se asocian con morbilidad. Existe la posibilidad que la medición sistémica (en suero) de TNF- α no sea equivalente a la medición de TNF- α en LT CD4+ específicos para SARS-CoV-2 y además que la correlación positiva entre TNF- α y la IgG se vean tiempos después de la vacunación y no en el comienzo o entre vacuna y vacuna, tal como se realizó en el estudio de Van der Ploeg K, et al, 2022. En nuestro caso, el tiempo promedio entre la primera y la tercera dosis fue de 6.3 meses; mientras que en el estudio de Van der Ploeg K se hizo esta medición a los 7 meses y se pudo observar la correlación positiva entre TNF- α y la IgG. Otra diferencia importante es el escaso tamaño de muestra de nuestros grupos de vacunación homólogo (G1 y G2) y heterólogo (G3), lo que podría interferir con el análisis de correlación estadística y solo mostrar tendencias como la observada en el grupo G3 que, con una tendencia de correlación negativa, pero con un $R^2 = -0,5842$ muy inferior a -1 no permite confirmar ni refutar los resultados de Van der Ploeg K. Estos resultados dejan abierta la posibilidad de que otros estudios puedan evaluar en el tiempo, la correlación entre TNF- α y anticuerpos IgG inducidos producto de la vacunación, lo que permitirá comprobar si esta citocina influye o no en la producción de anticuerpos IgG y si los esquemas de vacunación heterólogos son mejores que los homólogos sobre todo en aquellos lugares donde se han utilizado distintos esquemas de vacunación.

Conclusiones

- El aumento de TNF- α en el grupo G1 con infección sugiere una inmunoestimulación inducida por la tercera dosis de Pfizer.
- Las dos primeras dosis de Pfizer en sujetos indeterminados (G2 y G3) demuestran una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos IgG (anti-spike) en comparación a sujetos sin infección (GC); cuando se evalúa a los sujetos infectados (G1) también se observa esta diferencia; sin embargo, los tres esquemas de vacunación (G1, G2 y G3) producen el mismo nivel de IgG (anti-spike).
- Tras la tercera dosis de vacunación se mantiene la producción de anticuerpos antes y después de esta dosis en los tres esquemas de vacunación.
- No existe correlación entre los niveles séricos del factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α) y los anticuerpos IgG (anti-spike) antes y después de recibir la tercera dosis de vacunación contra el SARS-CoV-2.

Limitaciones del estudio

- La principal limitación del estudio es el tamaño muestral, el cual no llegó a cubrir el tamaño de muestra calculado estadísticamente debido a la coyuntura del COVID-19 en el Perú y a los distintos esquemas de vacunación que se han tenido, lo que hizo difícil conseguir a los participantes. Sería necesario incrementar este tamaño muestral en siguientes estudios y evaluar esquemas de vacunación, definidos por la autoridad de salud, que prevalezcan en nuestro país.
- Es posible que para la producción de anticuerpos antes/después de la tercera dosis se requieran más puntos en el tiempo para tener una buena idea de la eficiencia de los esquemas de vacunación utilizados.
- Sería conveniente medir la correlación entre TNF- α y los anticuerpos IgG (anti-spike) en tiempos posteriores a los 6 meses después de la última vacunación, ya que los estudios indican que en tiempos tardíos se puede evidenciar esta correlación.
- Debido a que no se pudo comprobar laboratorialmente la condición de no infección

de los participantes de los grupos G2 y G3 se optó por denominarlos "grupos indeterminados", por lo que se recomienda en futuros estudios incluir la evaluación de la condición de infección en este tipo de grupos.

- Por lo anteriormente indicado este estudio debe ser considerado como una primera exploración en el eje de investigación TNF- α - IgG (anti-spike) en COVID-19.

Referencias bibliográficas

1. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J Med Virol*. 2020 Jul 1;92(7):719–25.
2. Vellingiri B, Jayaramayya K, Iyer M, Narayanasamy A, Govindasamy V, Giridharan B, et al. COVID-19: A promising cure for the global panic. 2020 [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138277>
3. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. [cited 2023 Jun 20]. Available from: <https://covid19.who.int/>
4. MINSA. Covid 19 en el Perú - Ministerio del Salud [Internet]. [cited 2023 Jun 20]. Available from: https://covid19.minsa.gob.pe/sala_situacional.asp
5. MINSA. Minsa declara el fin de la quinta ola de la COVID-19 en el país – CDC MINSA [Internet]. [cited 2023 Jun 20]. Available from: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/informativo/prensa/minsa-declara-el-fin-de-la-quinta-ola-de-la-covid-19-en-el-pais/>
6. MINSA. Minsa descarta una sexta ola de covid-19 en el país - Noticias - Ministerio de Salud - Plataforma del Estado Peruano [Internet]. [cited 2023 Jun 20]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/741412-minsa-descarta-una-sexta-ola-de-covid-19-en-el-pais/>
7. GESTIÓN N. Segunda ola lleva a Perú a rebasar los 100,000 fallecidos en pandemia respecto a años anteriores | PERU | GESTIÓN. [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://gestion.pe/peru/segunda-ola-lleva-a-peru-a-rebasar-los-100000-fallecidos-en-pandemia-respecto-a-anos-antteriores-noticia/>
8. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LF. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1038/>
9. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Shalek AK. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>
10. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld CS, Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. 2020 [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://dx.doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00210>
11. Gao QY, Chen YX, Fang JY. 2019 Novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *J Dig Dis*. 2020;21(3):125–6.
12. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>
13. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(21).
14. Astuti I. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. 2020 [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020>

15. Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006 Jan 1;66:193–292.
16. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. 2020 [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
17. Kung YA, Lee KM, Chiang HJ, Huang SY, Wu CJ, Shih SR. Molecular Virology of SARS-CoV-2 and Related Coronaviruses. 2022;
18. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügger MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;75(7):1564–81.
19. van Eeden C, Khan L, Osman MS, Tervaert JWC. Molecular Sciences Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):1–17.
20. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org [Internet].* 2020 [cited 2023 Jun 17];1:1446. Available from: www.frontiersin.org
21. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):e46–7.
22. Fara A, Mitrev Z, Rosalia RA, Assas BM. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! *Open Biol.* 2020;10(9).
23. Sarzi-Puttini P, Giorgi V, Sirotti S, Marotto D, Ardizzone S, Rizzardini G, et al. COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? *Clin Exp Rheumatol.* 2020;38(2):337–42.
24. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. 2017 [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>
25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature [Internet].* 2020;584:463. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2588-y.pdf>
26. Pelaia C, Tinello C, Vatrella A, De Sarro G, Pelaia G. Lung under attack by COVID-19-induced cytokine storm: pathogenic mechanisms and therapeutic implications Corrado. [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1177/1753466620933508><https://doi.org/10.1177/1753466620933508>
27. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93(1):250–6.
28. Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, Wellington CL, Sekhon MS. Confronting the controversy: interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. [cited 2023 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1183/13993003.03006-2020>
29. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Wen C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front Immunol [Internet].* 2019 [cited 2023 Jun 18];11:1708. Available from: www.frontiersin.org
30. Hanff T, Mohareb A, Giri J, Cohen J, Chirinos JA. Thrombosis in COVID-19. 2021;95(12):1578–89.
31. Gupta S, Bi R, Kim C, Chiplunkar S, Yel L, Gollapudi S. Role of NF-κB signaling pathway in increased tumor necrosis factor-α-induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. *Cell Death Differ [Internet].* 2005 [cited 2023 Jun 18];12:177–83. Available from: www.nature.com/cdd
32. Chen DP, Wen YH, Lin WT, Hsu FP. Association between the side effect induced by COVID-19 vaccines and the immune regulatory gene polymorphism. *Front Immunol.* 2022 Oct 26;13.
33. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of

- regulated cell death. *Cell Res* [Internet]. [cited 2023 Jun 18]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
34. Fan EKY, Fan J. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation. [cited 2023 Jun 18]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0756-5>
 35. Morris G, Bortolasci CC, Puri BK, Olive L, Marx W, O'neil A, et al. The pathophysiology of SARS-CoV-2: A suggested model and therapeutic approach. 2020;
 36. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell* [Internet]. 2021 Jan 7 [cited 2021 Feb 4];184(1):149-168.e17. Available from: doi: 10.1016/j.cell.2020.11.025
 37. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 10Th ed. 2021.
 38. Jordan SC. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. 2021 [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://academic.oup.com/cei/article/204/3/310/6407867>
 39. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* [Internet]. [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
 40. Mehul Suthar AS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Ahmed R, Roback JD, Wrammert J, et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100040>
 41. Sun B, Feng Y, Mo X, Zheng P, Wang Q, Li P, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. 2020 [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>
 42. Ganesan S, Mohammad Baynouna Al Ketbi L, Al Kaabi N, Al Mansoori M, Nasser Al Maskari N, Saif Al Shamsi M, et al. Vaccine Side Effects Following COVID-19 Vaccination Among the Residents of the UAE-An Observational Study. *Frontiers in Public Health* | www.frontiersin.org [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 20];1:876336. Available from: www.frontiersin.org
 43. Zhou G, Zhao Q. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2020;16(10):1718–23. Available from: <http://www.ijbs.com/v16p1718.htm>
 44. Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, Dam KMA, Esswein SR, Gristick HB, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*. 2020 Dec;588(7839):682–7.
 45. Lozada-Requena I, Nuñez C. COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2020;37(2):312–9.
 46. Atmar RL, Lyke KE, Deming ME, Jackson LA, Branche AR, El Sahly HM, et al. Homologous and Heterologous Covid-19 Booster Vaccinations. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(11):1046–57.
 47. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol* [Internet]. [cited 2023 Jun 20]; Available from: www.nature.com/nri
 48. Vitiello A, Ferrara · F, Troiano · V, Porta · R La. COVID-19 vaccines and decreased transmission of SARS-CoV-2. *Inflammopharmacology* [Internet]. 123AD [cited 2023 Jun 20];1:1357–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00847-2>
 49. MINSA. MINSA. 2023 [cited 2023 Jun 22]. Protocolo para la administración de tercera dosis, cuarta dosis, y dosis de refuerzo de la vacuna contra la COVID-19 - 2023 - Informes y

- publicaciones - Ministerio de Salud - Plataforma del Estado Peruano. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/3955270-protocolo-para-la-administracion-de-tercera-dosis-cuarta-dosis-y-dosis-de-refuerzo-de-la-vacuna-contra-la-covid-19-2023>
50. Miyashita Y, Yoshida T, Takagi Y, Tsukamoto H, Takashima K, Kouwaki T, et al. Circulating extracellular vesicle microRNAs associated with adverse reactions, proinflammatory cytokine, and antibody production after COVID-19 vaccination. *NPJ Vaccines*. 2022;7(1):1–11.
 51. Bergamaschi C, Terpos E, Rosati M, Angel M, Bear J, Stellas D, et al. Systemic IL-15, IFN- γ , and IP-10/CXCL10 signature associated with effective immune response to SARS-CoV-2 in BNT162b2 mRNA vaccine recipients. *Cell Rep [Internet]*. 2021;36(6):109504. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109504>
 52. Van der Ploeg K, Kiro Singh AS, Mori DAM, Chakraborty S, Hu Z, Sievers BL, et al. TNF- α + CD4+ T cells dominate the SARS-CoV-2 specific T cell response in COVID-19 outpatients and are associated with durable antibodies. *Cell Rep Med [Internet]*. 2022;3(6):100640. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100640>
 53. Benning L, Klein K, Morath C, Bartenschlager M, Kim H, Buylaert M, et al. Neutralizing Antibody Activity Against the B.1.617.2 (delta) Variant Before and After a Third BNT162b2 Vaccine Dose in Hemodialysis Patients. *Front Immunol*. 2022 Mar 4;13.
 54. Kowitdamrong E, Puthanakit T, Jantarabenjakul W, Prompetchara E, Suchartlikitwong P, Puchcharoen O, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019. *PLoS One [Internet]*. 2020 [cited 2023 Jun 20];15(10):2–11. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240502>
 55. Organización Mundial de la Salud. Orientaciones sobre la bioseguridad en el laboratorio relacionada con la COVID-19 [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2021. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/339696/WHO-WPE-GIH-2021.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 56. OPS. Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID-19. [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://www.who.int/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory->
 57. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 2007;39(2):175–91.
 58. Martínez R, Tuya L, Martínez M, Pérez A, Cánovas A. El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman - Caracterización. *Rev haban cienc méd La Habana*. 2009;VIII(2).
 59. Yassine HM, Al-Jighefee H, Al-Sadeq DW, Dargham SR, Younes SN, Shurrab F, et al. Performance evaluation of five ELISA kits for detecting anti-SARS-COV-2 IgG antibodies. *International Journal of Infectious Diseases [Internet]*. 2021 [cited 2023 Jun 21];102:181–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.042>
 60. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11(May):1–7.
 61. AGUILLON G, Juan C; CRUZAT C, Andrea; CUENCA M, Jimena y CUCHACOVICH T, Miguel. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. *Rev. méd. Chile [online]*. 2002, vol.130, n.9 [citado 2023-11-09], pp.1043-1050. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-

98872002000900013&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-9887.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872002000900013>.

Anexos

Aprobación Comité de Ética



VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA E-111-19-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó la **ENMIENDA/MODIFICACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del Protocolo : **“Correlación entre el nivel de anticuerpos IgG (anti-spike) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en personas vacunadas contra el coronavirus SARS-CoV-2”**

Código del protocolo : **205327**

Investigador(a) principal(es) : **Paredes Inofuente, Diego Alexander**

La **enmienda/modificación** corresponde a los siguientes documentos:

1. **Solicitud de enmienda**, recibida en fecha 18 de octubre del 2022.
2. **Protocolo de investigación**, versión 2.0 recibida en fecha 21 de abril del 2023.

Lima, 16 de mayo del 2023.



Dr. Luis Arturo Pedro Saona Ugarte
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación

/cr

Av. Honorio Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado postal 4314
319 0000 Anexo 201302
vriive@oficinas-upch.pe
www.cayetano.edu.pe

Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación

(Adultos)	
Título del estudio :	Correlación entre el nivel de anticuerpos IgG (Anti-spike) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en personas vacunadas contra el coronavirus SARS-CoV-2
Investigador (a) :	Diego Paredes Inofuente - Ivan Lozada Requena
Institución :	Laboratorio Inmunología #108– Facultad de Ciencias y Filosofía - Universidad Peruana Cayetano Heredia

Propósito del estudio:

La población se encuentra vacunándose contra el COVID-19 brindando protección al mejorar nuestras defensas y así evitar la enfermedad grave. Sin embargo, tal protección puede variar dependiendo de la marca de vacuna con la que esta. Es por ello que nos interesa medir con técnicas inmunológicas de laboratorio unas moléculas (llamadas anticuerpos y citocinas o proteínas) que están presentes en su sangre producto de la estimulación de la vacuna de refuerzo y ver como se afectaron estas moléculas en cuanto a su cantidad y además si hay alguna relación entre ellas que incida sobre las defensas que Ud. debe generar frente al virus.

Por tal motivo, lo estamos invitando a participar en este estudio de investigación. Siendo su muestra de sangre una parte importante para realizar este estudio desarrollado por investigadores del Laboratorio de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Procedimientos:

Si decide participar en este estudio se realizará lo siguiente:

1. Se tomará dos muestras de sangre de 7ml del antebrazo, esto es aproximadamente 2 o 3 cucharadas soperas. Estas muestras serán tomadas dos veces, uno antes de haberse colocado la tercera dosis de la vacuna de refuerzo y el otro después de 30 días de colocarse la vacuna de refuerzo. Su participación será solo para la toma de muestra de sangre y no hay ningún tratamiento alternativo que se le ofrezca.

Riesgos:

La toma de muestra de sangre es ligeramente dolorosa y existe un riesgo muy pequeño de que se pueda inflamar la zona del pinchazo si no se mantiene la higiene adecuada, además la toma de muestra del antebrazo puede ocasionar un pequeño hematoma (moretón), el cual desaparecerá en aproximadamente en cinco días. De presentarse alguna complicación en la zona del pinchazo se le brindará una atención médica y orientación y seguimiento en caso necesite algún tratamiento.

Beneficios:

No existen beneficios por su participación en este estudio.

Costos y compensación

No deberá pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico, ni tratamiento, ni de otra índole.

(Adultos)	
Título del estudio :	Correlación entre el nivel de anticuerpos IgG (Anti- spike) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en personas vacunadas contra el coronavirus SARS-CoV-2
Investigador (a) :	Ivan Lozada Requena
Institución	Laboratorio de Ciencias y Filosofía - Universidad Peruana Cayetano Heredia

Confidencialidad:

Nosotros guardaremos su información con códigos y no con nombres. Solo los investigadores tendrán acceso a las bases de datos. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participaron en este estudio.

Derechos del participante:

Si decide participar en el estudio, puede retirarse de este en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin ninguna multa o pérdida de beneficios. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio o llame al Dr. Iván Lozada Requena (investigador del estudio), [REDACTED]

Si tiene preguntas sobre el estudio, los aspectos éticos del estudio, o sus derechos como participante puede contactar a la Dr. Luis Saona Ugarte, presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación y con la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia al teléfono 01-3190000 anexo 201355 o al correo electrónico: orvei.ciei@oficinas-upch.pe

Asimismo, puede ingresar a este enlace para comunicarse con el Comité Institucional de Ética en Investigación UPCH: <https://investigacion.cayetano.edu.pe/etica/ciei/consultasquejas>

USO FUTURO DE MUESTRAS

Deseamos conservar sus muestras (sangre) almacenándolas por 1 año. Estas muestras serán usadas en investigaciones futuras.

Estas muestras almacenadas no tendrán nombres ni otro dato personal, solo serán identificables mediante códigos.

Si no desea que sus muestras permanezcan almacenadas ni utilizadas posteriormente, aún pueden seguir participando del estudio. En ese caso, terminada la investigación sus muestras serán eliminadas.

Previamente al uso de sus muestras en un futuro proyecto de investigación, ese proyecto contará con el permiso de un Comité Institucional de Ética en Investigación.

Autorizo el almacenamiento de mis muestras (por 1 año) para estudios futuros relacionados a la infección por coronavirus (Después de ese tiempo se eliminarán)

Si () No ()

Una copia de este consentimiento informado le será entregada.

(Adultos)	
Título del estudio :	Correlación entre el nivel de anticuerpos IgG (Anti- spike) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en personas vacunadas contra el coronavirus SARS-CoV-2
Investigador (a) :	Ivan Lozada Requena
Institución	Laboratorio de Ciencias y Filosofía - Universidad Peruana Cayetano Heredia

DECLARACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo las actividades en las que participaré si decido ingresar al estudio, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Autorizo al médico tratante y al equipo el uso de la información obtenida a partir de mi historia clínica para los fines del estudio.

**Nombres y
Apellidos
Participante**

**Fecha y
Hora**

**Nombres y
Apellidos
Investigador**

**Fecha y
Hora**

Datos de concentraciones de ELISA IgG y TNF- α

Resultados de ELISA para determinación de IgG en participantes vacunados

(Muestra 1 y 2 en U/mL)

N°	PARTICIPANTE	MUESTRA 1	MUESTRA 2
1	ATM-G1	422.400	587.198
2	SLC-G1	331.200	337.567
3	JCS- G1	511.700	1.023.525
4	ERE- G1	572.539	358.903
5	FRO- G1	1.342.835	433.733
6	DMV- G1	1.140.086	578.207
7	KDI- G1	598.300	463.028
8	MLT- G2	549.500	368.626
9	MAC- G2	307.100	530.980
10	DPT- G2	1.383.538	1.348.292
11	FRF- G2	1.067.630	463.749
12	MCA- G2	915.435	259.730
13	AAC- G2	238.329	333.706
14	PMT- G2	773.508	466.835
15	JRQ- G3	579.200	618.875
16	ABM- G3	240.600	1.016.082
17	FTP- G3	226.185	862.242
18	HVS- G3	133.926	319.180
19	ASM- G3	389.292	1.003.569
20	AOM- G3	1.001.739	355.506
21	AVV- G3	540.900	261.638
22	GRS- G3	737.066	357.085
23	AVQ- G3	1.387.142	801.449

Resultados de ELISA para determinación de TNF- α en participantes vacunados
(Muestra 1 y 2 en pg/mL)

N°	PARTICIPANTE	MUESTRA 1	MUESTRA 2
1	ATM-G1	0	64.18
2	SLC-G1	0	60.85
3	JCS- G1	0	0
4	ERE- G1	46.75	64.75
5	FRO- G1	48.28	54.94
6	DMV- G1	0	52.79
7	KDI- G1	103.35	97.13
8	MLT- G2	0	4.52
9	MAC- G2	85.21	438.22
10	DPT- G2	0	36.36
11	FRF- G2	40.39	415.61
12	MCA- G2	79.95	216.29
13	AAC- G2	118.33	6.77
14	PMT- G2	229.91	9
15	JRQ- G3	8.31	0
16	ABM- G3	0	0
17	FTP- G3	0	15.69
18	HVS- G3	0	5.04
19	ASM- G3	0	0
20	AOM- G3	0	0
21	AVV- G3	0	1.01
22	GRS- G3	47.49	0
23	AVQ- G3	16.92	0

Ficha epidemiológica de los participantes en el estudio

Disponible en:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1uB7g9MiHwliXj5HHgbrJK-1VfAEhvtQ/edit?usp=sharing&ouid=114332729368286464062&rtpof=true&sd=true>