

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Evaluación Inmunológica de Terapias Inmunomoduladoras
con Inmunoglobulinas y con Células mesenquimales en
pacientes inmunosuprimidos por trasplante o por SARS-CoV-**

2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Judith Montánchez Mateo

Directores

Javier Alberto Carbone Campoverde
Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese
José María García Ruiz de Morales

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Evaluación Inmunológica de Terapias
Inmunomoduladoras con Inmunoglobulinas y con
Células mesenquimales en pacientes inmunosuprimidos
por trasplante o por SARS-CoV-2**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Judith Montánchez Mateo

DIRECTORES

Javier Alberto Carbone Campoverde

Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese

José María García Ruiz de Morales

Madrid, 2021



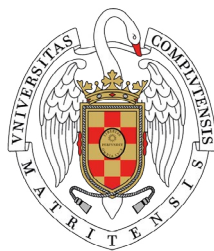
TESIS DOCTORAL 2021

**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE TERAPIAS
INMUNOMODULADORAS CON INMUNOGLOBULINAS Y
CON CÉLULAS MESENQUIMALES EN PACIENTES
INMUNOSUPRIMIDOS POR TRASPLANTE O POR
SARS-CoV-2**

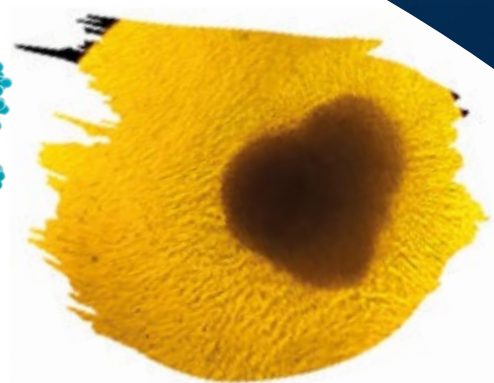
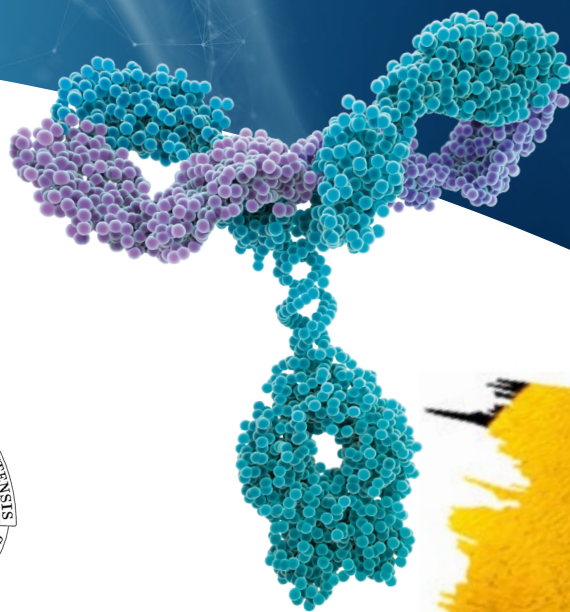
JUDITH MONTÁNCHEZ MATEO

DIRECTORES:

**JAVIER ALBERTO CARBONE CAMPOVERDE
ELIZABETH ANGÉLICA SARMIENTO MARCHESI
JOSÉ MARÍA GARCÍA RUIZ DE MORALES**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID**



Este trabajo se ha realizado gracias a

La financiación a cargo del proyecto FIS ECNC 11084 a JC,
Instituto de Salud Carlos III, ISR Grant, Grifols, California, USA a JC.

La financiación a cargo del proyecto GRS COVID 128/A/20-
Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, España a JMM.

Servicio de Inmunología Clínica del Hospital General
Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.

Servicio de Inmunología Clínica del Complejo Asistencial
Universitario Hospital de León, España

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y sus directores de tesis, no hubiese sido posible sin el apoyo desinteresado de todas y cada una de las personas que citaré a continuación y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en tiempos difíciles.

Quiero agradecer a Jesucristo, porque me guía, inspira y acompaña en este camino de la medicina e investigación, que bien sabe él que anhela mi corazón.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, a mi Madre por motivarme a seguir mis sueños desde mi querido Perú. A ti papá que ya estás en el cielo, te agradeceré siempre por darme tu ejemplo de perseverancia y tenacidad. A mi hermana Carmela y a mi hermano Ricardo, que han estado apoyándome en todo momento en estos años. A mi abuela Victoria, a la que llamaba cariñosamente Mami Tola, una mujer que se adelantó a su tiempo y nos dio un ejemplo de vida a sus nietas.

A mi tío Henry, por haber sido un ejemplo en nuestra familia, muy solidario y de gran entrega en la medicina en México y Perú. Muchas gracias, tío, por acompañarme en mis primeros pasos de la investigación en células madre en aquel día que me inspiraron tanto las palabras del Dr. Yamanaka cuando recibía unos de los galardones por ser premio Nobel junto al Dr. Gurdon. Te fuiste pronto, el COVID-19 nos ganó la batalla, pero tu ejemplo ha quedado en los corazones de los que afortunadamente te conocimos.

Agradezco a los pacientes trasplantados y de COVID-19 ,quienes voluntariamente han participado en nuestras investigaciones. Estos luchadores quienes me han enseñado a valorar más esta hermosa vida y un poco más de Inmunología.

Agradezco al Dr. Javier Carbone y a la Dra. Elizabeth Sarmiento porque a través de su loable trabajo de investigación en el ambiente hospitalario me dieron la oportunidad de aprender en el equipo de trasplante y dirigirme en la formación del doctorado.

Agradezco al Dr. José María García Ruiz de Morales, por todas sus enseñanzas en estos años durante mi residencia de Inmunología Clínica. Chema, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de investigar las células madre mesenquimales en el laboratorio del Hospital de León. Gracias por dedicar tu tiempo, asesoramiento y supervisión y sobre todo, motivarme en todo momento.

A mi tutora, la Dra. Narcisa Martínez y a la Dra. María Ángeles Vicente, coordinadora del programa de doctorado por facilitar tanto los trámites y evaluaciones.

A los doctores y enfermeras responsables de cada centro colaborador de los proyectos de investigación, cuyos datos son presentados en esta tesis doctoral.

A los colegas los doctores Paula Dios, Emiliano Honrado, Luis Molero por participar con su tiempo y dedicación para hacer realidad un sueño.

A mis colegas y amigos por estar ahí, a Marta, Ariana, Sandra, María Isabel, Fernando y a Carlos por darme ánimo en todo este tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	11
ABREVIATURAS	17
PRESENTACIÓN	29
RESUMEN	33
SUMMARY	39
PARTE I	
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓN	47
2. JUSTIFICACIÓN	51
3. ESTUDIO 1	57
3.1 HIPÓTESIS	57
3.2 OBJETIVO	57
3.3 METODOLOGÍA	57
3.3.1 Población de estudio	58
3.3.2 Protocolo de visitas	59
3.3.3 Variables del estudio	61
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
3.5 ASPECTOS ÉTICOS	62
3.6 RESULTADOS	62
3.6.1 Pacientes seleccionados	62
3.6.2 Características clínicas	62
3.6.3 Prevalencia de infección grave en el grupo GGIV	64
3.6.4 Niveles de IGG en pacientes tratados con GGIV	65
3.6.5 Tiempo de supervivencia	65
3.6.6 Análisis univariante de variables para identificar factores asociados a la variable muerte	66
3.6.7 Variable análisis multivariante de variables para identificar factores de riesgo de muerte	67
3.6.8 Reconstitución de GGIV	67
3.7 DISCUSIÓN	68
3.8 LIMITACIONES	69
3.9 CONCLUSIONES	69

4. ESTUDIO 2	73
4.1 HIPÓTESIS	73
4.2 OBJETIVO	73
4.2.1 Objetivo primario	73
4.2.2 Objetivo secundario	73
4.3 METODOLOGÍA	74
4.3.1 Diseño del estudio	74
4.3.2 Población de estudio	75
4.3.3 Variables del estudio	75
4.3.4 Periodo de estudio de parámetros inmunológicos	76
4.3.5 Análisis estadístico	76
4.3.6 Aspectos éticos	76
4.3.7 Definición de evento de re-infección grave	77
4.3.8 Profilaxis antimicrobiana	77
4.3.9 Terapia inmunosupresora	77
4.4 RESULTADOS	78
4.4.1 Pacientes	78
4.4.2 Características clínicas	80
4.4.3 Uso previo de profilaxis antimicrobiana	81
4.4.4 Uso de terapia inmunosupresora de inducción	82
4.4.5 Características por tipo de trasplante	82
4.4.6 Parámetros inmunológicos	88
4.4.7 Parámetros inmunológicos por tipo de trasplante	91
4.4.8 Tipo de reinfecciones en los pacientes	103
4.4.9 Análisis univariante de variables para identificar factores de riesgo para el desarrollo de un episodio de reinfección	105
4.4.10 Análisis multivariante de variables para identificar factores de riesgo para el desarrollo de un episodio de infección	106
4.4.11 Análisis de supervivencia	107
4.4.12 Cinética de IGG	107
4.5 DISCUSIÓN	108
4.6 LIMITACIONES	109
4.7 CONCLUSIONES	110
5. ESTUDIO 3	113
5.1 HIPÓTESIS	113
5.2 OBJETIVOS	113
5.2.1 Objetivo primario	113
5.2.2 Objetivos secundarios	114

5.3 METODOLOGÍA.....	115
5.3.1 Diseño de estudio.....	115
5.3.2 Protocolo de visitas.....	117
5.3.3 Población de estudio.....	117
5.3.4 Producto de estudio.....	117
5.3.5 Variables del estudio.....	118
5.3.6 Definición de evento infeccioso grave.....	120
5.3.7 Definición de inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos.....	121
5.3.8 Obtención de muestras sanguíneas.....	121
5.3.9 Parámetros bioquímicos y hematológicos.....	121
5.4 ASPECTOS ÉTICOS.....	122
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	122
5.6 RESULTADOS.....	123
5.6.1 Características clínicas.....	125
5.6.2 Tipo de infecciones en los pacientes aleatorizados.....	126
5.6.3 Tipo de re-infecciones en los pacientes aleatorizados.....	127
5.6.4 Variables principales de eficacia.....	127
5.6.5 Variables secundarias de eficacia.....	129
5.6.8 Variables de seguridad.....	132
5.6.9 Subestudio de monitorización de la inmunidad humoral.....	135
5.7 DISCUSIÓN.....	141
5.7.1 Eficacia.....	141
5.7.2 Seguridad.....	143
5.7.3 Inmunidad humoral.....	143
5.8 LIMITACIONES.....	145
5.9 CONCLUSIONES.....	145

PARTE II

6. ESTUDIO 1.....	151
6.1 DESCRIPCIÓN DE LOS MARCADORES DE ACTIVACIÓN.....	156
6.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CITOCINAS ANALIZADAS.....	157
6.3 DESCRIPCIÓN DE LAS QUIMIOCINAS INDUCIDAS POR IFN.....	159
7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	163
7.1 HIPÓTESIS.....	163
7.2 OBJETIVOS.....	163
7.2.1 Objetivo primario.....	163
7.2.2 Objetivos secundarios.....	163

8. MATERIALES Y MÉTODOS	167
8.1 DISEÑO DE ESTUDIO	167
8.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	167
8.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS pMSCs.	168
8.4 IDENTIFICACIÓN CELULAR DE LAS pMSCs.	172
8.5 IDENTIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS pMSCs	172
8.6 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS pMSCs	172
8.7 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.	173
8.8 INMUNIDAD DE CÉLULAS T REACTIVAS AL SARS-CoV-2.	173
8.9 ACTIVACIÓN DE LAS pMSCs POR IFN- γ	177
8.10 CO-CULTIVO IpMSCs/rCMPs.	177
8.11 ANÁLISIS DE DATOS.	179
8.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	179
8.13 ASPECTOS ÉTICOS	179
9. RESULTADOS	183
9.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	183
9.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS pMSCs	192
9.3 CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS pMSCs.	193
9.4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS pMSCs	195
9.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS pMSCs	196
9.6 INMUNIDAD DE CÉLULAS T REACTIVAS AL SARS-CoV-2	197
9.6.1 La magnitud y funcionalidad de la respuesta celular.	210
9.6.2 Quimiocinas inducidas por IFN- γ	211
9.7 ENSAYO DE CO-CULTIVO IpMSCs / rCMSPs	215
10. DISCUSIÓN.	231
10.1 RESPUESTA CELULAR T	231
10.2 EFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS IpMSCs	232
10.3 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.	233
10.4 CONCLUSIONES	233
11. CONCLUSIONES FINALES	237
12. REFERENCIAS	241
13. ANEXO 1.	255

ABREVIATURAS

- ADE** Potenciación dependiente de anticuerpos.
- AEMPS** Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios
- BAFF** Factor Activador de Linfocitos B perteneciente a la familia TNF.
- CD** (del inglés) clúster de diferenciación.
- CEIC** Comité Ético de Investigación Clínica
- CFU** (del inglés) unidad formadora de colonias.
- CFU-F** (del inglés) fibroblasto-unidad formadora de colonias.
- CMSPs** Células mononucleares de sangre periférica
- COVID-19** Enfermedad por coronavirus.
- CRD** Cuaderno de recogida de datos
- CRO** (del inglés) Organización de Investigación por Contrato
- CS** (del inglés) tormenta de citoquinas.
- DE** Desviación estándar
- dL** Decilitro
- DMEM** (del inglés) medio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO** dimetilsulfóxido.
- EA** Eventos adversos
- EAG** EA graves
- EAGI** EA graves inesperados
- ECA-2** Enzima convertidora de angiotensina tipo 2.
- ExoFlo™** producto de derivados de células madre mesenquimales de médula ósea alogénica.
- FBS** (del inglés) suero bovino fetal.
- FDA** Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos
- FT** Ficha Técnica
- GCP** (del inglés) Buenas prácticas clínicas
- GGIV** Gammaglobulina intravenosa
- GMP** (del inglés) normas de buena manufactura.
- HGG** Hipogammaglobulinemia IgG
- hUCMSC** (del inglés) células madre mesenquimal de cordón umbilical humano.
- IDO** indolamina 2-3 dioxigenasa.
- IDP** Inmunodeficiencia primaria
- IFN** interferón.
- IFN- γ** Interferón gamma
- IgA** Inmunoglobulina A
- IgG** Inmunoglobulina G
- IgM** Inmunoglobulina M
- IL** interleuquina.
- IpMSCs** Células madre mesenquimales de placenta humana pre-estimuladas con IFN- γ
- IRF3** (del inglés) factor 3 de regulación de interferón
- IRF7** (del inglés) factor 7 de regulación de interferón
- IS** Índice de estimulación
- IV** (del inglés) Vía intravenosa
- JAK-STAT1** (del inglés) transductor de señal y activador de la transcripción STAT de la quinasa Janus
- kg** Kilogramo
- M-** (del inglés) Membrana.
- min** Minutos

mL	Mililitro	SARS-CoV-2	(del inglés) coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo.
MSCs	(del inglés) células madre de origen mesenquimal.	SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo.
N-	(del inglés) Nucleocápside.	SNS	Sistema Nacional de Salud
NF-κB	(del inglés) Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	T°amb	Temperatura de ambiente
NO	Óxido nítrico	TAMC	Terapia antimicrobiana convencional
OMS	Organización Mundial de la Salud.	TC	Trasplante cardiaco
P	Pasaje	TF/CD142	(del inglés) Factor tisular plaquetario o proteína CD142.
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.	TH	Trasplante Hepático
PBS	(del inglés) solución salina tamponada con fosfato, búfer fosfato.	TLR	(del inglés) Receptores tipo Toll.
PC	Peso corporal	TMPRSS2	(del inglés) serina-proteasas transmembrana de tipo II.
PCR-RT	(del inglés) reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	TNF	(del inglés) Factor de necrosis tumoral.
PGE-2	Prostaglandina E2.	TOS	Trasplante de órgano solido
PHEIC	(del inglés) Emergencia de salud pública de alcance internacional.	TP	Trasplante Pulmonar
PK	Farmacocinética	TR	Trasplante Renal
PLX-PAD	(del inglés) células adherentes expandidas de la placenta.	TVP	Trombosis venosa profunda
(PLacental eXpanded)		U(I)	Unidad (internacional)
pMSCs	células madre de origen mesenquimal de placenta humana	UCI	Unidad de cuidados intensivos.
PRRs	(del inglés) receptores de reconocimiento de patrones.	UE	Unión Europea
PTI	Púrpura trombocitopénica idiopática	V	Visita
PVB19	Parvovirus B19	VS	Versus
RA	Reacción adversa al fármaco	VE	Vesículas extracelulares.
rCMSPs	Células mononucleares de sangre periférica previamente estimulados	VHB	Virus de Hepatitis B
RIQ	Rango Intercuartílico	VHC	Virus de Hepatitis C
RNA	ácido ribonucleico.	VIH-1/2	Virus de inmunodeficiencia Humana de tipo 1 y 2
rpm	revoluciones por minuto		
S-	(del inglés) Spike.		

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas basales de los pacientes trasplantados cardíacos de los grupos con GGIV y sin GGIV.	63
Tabla 2. Características cardiovasculares peri-trasplante de los pacientes trasplantados cardíacos de los grupos con GGIV y sin GGIV.	63
Tabla 3. Complicaciones y % de cáncer en el seguimiento de los pacientes post-trasplantados cardíacos en los grupos con GGIV y sin GGIV.	64
Tabla 5. Características de la IgG en el grupo de GGIV.	65
Tabla 6. Tiempo de supervivencia en los grupos de GGIV y no GGIV de los post-trasplantados cardíacos.	66
Tabla 7. Análisis univariante de variables para identificar factores asociados a la variable muerte.	66
Tabla 8. Variable análisis multivariante de variables para identificar factores de riesgo de muerte.	67
Tabla 9. Nº de pacientes por trasplante en los grupos GGIV y No GGIV.	79
Tabla 10. Nº de pacientes (%) por niveles séricos iniciales (pre) de IgG en los pacientes de los grupos GGIV y No GGIV.	79
Tabla 11. Nº de pacientes (%) con niveles séricos iniciales (PRE) de IgG por trasplante en los grupos GGIV y No GGIV.	80
Tabla 12. Características clínicas del estudio de cohortes retrospectivo.	81
Tabla 13. Terapia antimicrobiana profiláctica recibido por los pacientes del estudio de cohortes retrospectivo.	81
Tabla 14. Terapia inmunosupresora de inducción recibido por los pacientes del estudio de cohortes retrospectivo.	82
Tabla 15. Características clínicas de los pacientes post-trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo.	83
Tabla 16. Terapia antimicrobiana profiláctica recibido por los pacientes post-trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo.	83
Tabla 17. Terapia inmunosupresora de inducción recibido por los pacientes post-trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo.	84
Tabla 18. Características clínicas de los pacientes post-trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo.	85
Tabla 19. Terapia antimicrobiana profiláctica recibido por los pacientes post-	

trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo.	85
Tabla 20. Terapia inmunosupresora de inducción recibido por los pacientes post-trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo.	86
Tabla 21. Características clínicas de los pacientes post-trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo	86
Tabla 22. Terapia antimicrobiana profiláctica recibido por los pacientes post-trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo.	87
Tabla 23. Terapia inmunosupresora de inducción recibido por los pacientes post-trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo.	87
Tabla 24. Parámetros celulares del total de pacientes trasplantados del estudio de cohortes retrospectivo.	88
Tabla 25. Factores del complemento del total de pacientes trasplantados del estudio de cohortes retrospectivo	89
Tabla 26. Fenotipo linfocitario del total de pacientes trasplantados del estudio de cohortes retrospectivo.	90
Tabla 27. Reconstitución de parámetros celulares, factores del complemento y fenotipo linfocitario del total de pacientes trasplantados del estudio de cohortes retrospectivo.	91
Tabla 28. Parámetros celulares de los pacientes trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo.	92
Tabla 29. Factores del complemento de los pacientes trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo	92
Tabla 30. Fenotipo linfocitario de los pacientes trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo.	93
Tabla 31. Reconstitución de parámetros celulares y factores del complemento de los pacientes trasplantados cardíacos del estudio de cohortes retrospectivo	94
Tabla 32. Reconstitución del fenotipo linfocitario de los pacientes trasplantados cardíacos en los grupos GGIV y no GGIV	95
Tabla 33. Parámetros celulares de los pacientes trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo.	96
Tabla 34. Factores de complemento de los pacientes trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo	96
Tabla 35. Fenotipo linfocitario de los pacientes trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo.	97
Tabla 36. Reconstitución de parámetros celulares y factores de complemento de los pacientes trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo	98
Tabla 37. Reconstitución del fenotipo linfocitario de los pacientes trasplantados hepáticos del estudio de cohortes retrospectivo.	99
Tabla 38. Parámetros celulares de los pacientes trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo.	100
Tabla 39. Factores de complemento de los pacientes trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo	100

Tabla 40. Fenotipo linfocitario de los pacientes trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo.	101
Tabla 41. Reconstitución de parámetros celulares y factores del complemento de los pacientes trasplantados renales del estudio de cohortes retrospectivo	102
Tabla 42. Nº de pacientes trasplantados que presentaron o no una reinfección grave del estudio de cohortes retrospectivo	103
Tabla 43. Nº de eventos de reinfección grave por tipo de infección en los pacientes trasplantados del estudio de cohortes retrospectivo	103
Tabla 44. Nº de eventos de reinfección por tipo de microorganismo y tipo de enfermedad en los pacientes trasplantados del estudio de cohortes retrospectivo.	104
Tabla 45. Análisis de regresión logística univariante de las variables clínicas asociadas con el desarrollo de reinfección tras GGIV o no GGIV.	106
Tabla 46. Análisis multivariante de variables para identificar factores de riesgo de infección	106
Tabla 47. Cinética de los niveles de IgG del estudio de cohortes retrospectivo.	108
Tabla 48. Valores límite de la normalidad de los parámetros bioquímicos y hematológicos del hospital general universitario gregorio marañón.	122
Tabla 49. Características clínicas de los grupos GGIV + TAMC vs TAMC	125
Tabla 50. Tipo de microorganismo y enfermedad con el tratamiento correspondiente al momento de la aleatorización del ensayo clínico	126
Tabla 51. Tipo de microorganismo y enfermedad en el momento de la primera reinfección durante el seguimiento	127
Tabla 52. Análisis univariante de regresión logística, tras la V1, de variables clínicas asociada con el desarrollo de reinfección durante el seguimiento	128
Tabla 53. Análisis multivariante de regresión logística, tras la V1, de variables clínicas asociada con el desarrollo de reinfección durante el seguimiento	128
Tabla 54. Cinética del valor de IgG durante el seguimiento.	129
Tabla 55. Reacción adversa severa reportada a la CRO durante el período de estudio . .	135
Tabla 56. Cinética de anticuerpos específicos y otros biomarcadores en suero	139
Tabla 57. Límite teórico de detección para citocinas analizadas en el estudio	176
Tabla 58. Límite teórico de detección para quimiocinas analizadas en el estudio	177
Tabla 59. Características clínicas de los pacientes según la severidad clínica	184
Tabla 60. Características clínicas de los pacientes según edad e IMC.	185
Tabla 61. Hallazgos radiológicos y de laboratorio.	186
Tabla 62. Hallazgos radiológicos y de laboratorio.	187
Tabla 63. Parámetros inmunológicos durante la hospitalización	188
Tabla 64. Parámetros inmunológicos durante la hospitalización según el rango de referencia de laboratorio.	190
Tabla 65. Complicaciones y tratamiento	191
Tabla 66. Cronología de muestreo del estudio	198

Tabla 67. Citocinas basales tras la estimulación con péptidos S-, N-, M- del SARS-CoV-2.	206
Tabla 68. Magnitud de respuesta de las células T CD4+ específicas del SARS-CoV-2 en los pacientes recuperados de COVID-19.	211
Tabla 69. Magnitud de respuesta de las células T CD8+ específicas del SARS-CoV-2 en los pacientes recuperados de COVID-19	211
Tabla 70. Quimiocinas basales tras la estimulación con los péptidos S-, N-, M- del SARS-CoV-2	212
Tabla 71. Frecuencia de respuesta celular antígeno-específica de CD4+ en pacientes recuperados de COVID-19	215
Tabla 72. Frecuencia de respuesta celular antígeno-específica de CD8+ en pacientes recuperados de COVID-19	217
Tabla 73. Comparación de antes y después del co-cultivo de la magnitud de la respuesta de los linfocitos T CD4+ CD137+ CD134+ (linfocitos T CD4+específicos del SARS-CoV-2) frente a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	218
Tabla 74. Comparación de antes y después del co-cultivo de la magnitud de la respuesta de los linfocitos T CD8+ CD137+ CD134+ (linfocitos T CD4+específicos del SARS-CoV-2) frente a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	218
Tabla 75. Comparación de la mediana (RIQ) de los niveles de cada citocina en el sobrenadante PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteína-S-, N- y-M- del SARS-CoV-2	220
Tabla 76. Comparación de la mediana (RIQ) de los niveles de cada citocina en el sobrenadante PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteína S-, N- y M- del SARS-CoV-2 de muestras de pacientes según la gravedad de la enfermedad	223
Tabla 77. Comparación de la mediana (RIQ) de los niveles de cada quimiocina en el sobrenadante PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteína S-, N- y M- del SARS-CoV-2	224
Tabla 78. Comparación de la mediana (RIQ) de los niveles de cada quimiocina en el sobrenadante PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteína S-, N- y M- del SARS-CoV-2 de muestras de pacientes según la gravedad de la enfermedad	227

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Estudio de tasa de muerte en cohortes retrospectivo de pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e HGG expuestos o no a la terapia con GGIV	58
Figura 2: Uso compasivo del protocolo de GGIV	60
Figura 3 Reconstitución de GGIV posterior a un 1 año de seguimiento en los grupos GGIV y no GGIV.....	68
Figura 4. Estudio de incidencia de reinfección grave en cohortes retrospectivo de pacientes post-tos con infección grave e HGG expuestos o no a la terapia con GGIV	74
Figura 5 Curva de supervivencia Kaplan–Meier	107
Figura 6. Protocolo de ensayo clínico de la terapia GGIV- EudraCT 2012-001327-12	116
Figura 7. Flujograma del número de pacientes enrolados en el ensayo clínico aleatorizado que recibieron GGIV + TAMC o solo TAMC evaluables para el análisis de eficacia y seguridad	124
Figura 8. Cinética de los niveles de IgG	130
Figura 9. Curva de supervivencia Kaplan-Meier post-V1 sin reinfección de trasplantados de órgano sólido del grupo de GGIV + TAMC versus solo TAMC ...	131
Figura 10. Cinética de urea.....	132
Figura 11. Cinética de creatinina	133
Figura 12. Cinética de TGO	133
Figura 13. Cinética de TGP	134
Figura 14. Dinámica de las subclases IgG1 e IgG2	136
Figura 15. Dinámica de las subclases IgG3 e IgG4	136
Figura 16. Dinámica de anticuerpos IgG específicos frente a antígenos toxoide Tetánico	137
Figura 17. Dinámica de anticuerpos IgG específicos frente a antígenos polisacárido neumocócico.....	137
Figura 18. Dinámica de anticuerpos IgG específicos frente a antígenos toxina A y B de <i>Clostridium difficile</i>	138
Figura 19. Dinámica de anticuerpos IgG específicos frente a antígenos de <i>Citomegalovirus</i> y el <i>Virus de la Varicela-Zóster</i>	138
Figura 20. Dinámica de la IL-6 entre la V1 y V7	140
Figura 21. Dinámica de BAFF entre la V1 y V7	140
Figura 22. Dinámica de la IgD.....	141

Figura 23. Estimulación peptídica de los linfocitos de pacientes recuperados de COVID-19.	174
Figura 24. Estrategia de “Gating” para la identificación de células T CD4+ y CD8+ antígeno-específicas frente al SARS-CoV-2.	175
Figura 25. Co-cultivo de rCMSPs (Células Mononucleares de sangre periférica re-estimuladas con los péptidos S-, N- y M- del SARS-CoV-2) y las IpMSCs (pMSCs activadas con IFN- γ) en un ensayo de sistema Transwell	178
Figura 26. Marcadores positivos por citometría de Flujo (FACS Canto II). Inmunofenotipo de las pMSCs. 2º criterio según la Sociedad Internacional de Terapia Celular	193
Figura 27. Marcadores negativos por citometría de flujo (FACS Canto II). Inmunofenotipo de las pMSCs. 2º criterio según la Sociedad Internacional de Terapia Celular	194
Figura 28. Marcador CD106+ asociado a propiedades inmunomoduladoras	194
Figura 29. Ensayo de proliferación mediante el Kit de Conteo celular-8	197
Figura 30. Plots representativos de las células T CD4+ y T CD8+ tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	199
Figura 31. Índice de estimulación de los linfocitos T CD4+ CD137+ CD134+ (Linfocitos T CD4+específicos del SARS-COV-2)	200
Figura 32. El índice de estimulación (IS) de los linfocitos T CD8+ CD137+ CD134+ CD8+ (linfocitos T CD8+específicos del SARS-CoV-2)	200
Figura 33. Porcentaje de pacientes con respuesta celular T CD4+ tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	201
Figura 34. Porcentaje de pacientes con respuesta celular T CD8+ tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-COV-2.	201
Figura 35. Diagramas de Venn de 20 pacientes con COVID-19 con respuesta celular antígeno-específica T CD4+ detectables (IS \geq 2) del SARS-CoV-2 tras la estimulación con las proteínas S-, N- Y M-.	202
Figura 36. Diagramas de Venn de 20 pacientes con COVID-19 con respuesta celular antígeno específica T CD8+ detectables (IS \geq 2) del SARS-CoV-2 tras la estimulación con las proteínas S-, N- Y M-.	203
Figura 37. Porcentaje de la respuesta celular T CD4+ (IS \geq 2) frente a la estimulación de las proteínas S-, N- Y M- del SARS-COV-2 según la severidad clínica	204
Figura 38. Porcentaje de la respuesta celular T CD8+ (IS \geq 2) frente a la estimulación de las proteínas S-, N- Y M- del SARS-CoV-2 según la severidad clínica	205
Figura 39. Niveles de IL-2 en el sobrenadante del control vs las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	207
Figura 40. Niveles de IFN- γ en el sobrenadante del control vs las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	207
Figura 41. Niveles de TNF- α en el sobrenadante del control vs las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	208

Figura 42. Niveles de IL-4 en el sobrenadante del control vs las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	208
Figura 43. Niveles de IL-17-A en el sobrenadante del control vs las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	209
Figura 44. Niveles de IL-1 β en el sobrenadante del control vs las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	210
Figura 45. Gráficos representativos de la producción de quimiocina CXCL10/IP-10 secretadas por las CMSPs en los sobrenadantes tras la estimulación con S-, N- y M- del SARS-CoV-2	213
Figura 46. Gráficos representativos de la producción de la quimiocina CCL2/MCP-1 secretadas por las CMSPs en los sobrenadantes tras la estimulación con S-, N- y M- del SARS-CoV-2	213
Figura 47. Gráficos representativos de la producción de quimiocina CXCL9/MIG secretadas por las CMSPs en los sobrenadantes tras la estimulación con S-, N- y M- del SARS-CoV-2	214
Figura 48. Gráficos representativos de la producción de la quimiocina CCL5/RANTES secretadas por las CMSPs en los sobrenadantes tras la estimulación con S-, N- y M- del SARS-CoV-2	214
Figura 49. Plot representativo de la comparación de PRE y POST del Co-cultivo de la frecuencia del Índice de estimulación (IS) de los linfocitos T CD4+ CD137+ CD134+ (linfocitos T CD4+específicos del SARS-CoV-2) frente a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	216
Figura 50. Plot representativo de la comparación de PRE y POST del Co-cultivo de la frecuencia del Índice de estimulación (IS) de los linfocitos T CD8+ CD137+ CD134+ (linfocitos T CD8+específicos del SARS-CoV-2) frente a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	217
Figura 51. Plot comparativo del PRE y POST del % de pacientes con respuesta celular T CD4+ antígeno-específica (IS \geq 2).	219
Figura 52. Plot comparativo del PRE y POST del % de pacientes con respuesta celular T CD8+ antígeno-específica detectables (IS \geq 2)	219
Figura 53. Plot comparativo de los niveles de la citocina IL-2 en el sobrenadante del cultivo PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	221
Figura 54. Plot comparativo de los niveles de la citocina IFN- γ en el sobrenadante del cultivo PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteína S-, N- y M- del SARS-CoV-2	221
Figura 55. Plot comparativo de los niveles de la citocina TNF- α en el sobrenadante del cultivo PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteínas-S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	222
Figura 56. Plot comparativo de los niveles de la citocina IL-1 β en el sobrenadante del cultivo pre (linfocitos estimulados) y post (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	222

Figura 57. Plot comparativo Pre y Post Co-cultivo de los niveles de la quimiocina CXCL10/IP-10 inducida por IFN secretada por las rCMSPs en el sobrenadante tras la estimulación con las proteínas S-, N- Y M- del SARS-CoV-2.	225
Figura 58. Plot comparativo Pre y Post Co-cultivo de los niveles de la quimiocina CCL2/MCP-1 inducida por IFN secretada por las rCMSPs en el sobrenadante tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	225
Figura 59. Plot comparativo Pre y Post Co-cultivo de los niveles de la quimiocina CXCL9/MIG inducida por IFN, secretada por las rCMSPs en el sobrenadante tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.	226
Figura 60. Plot comparativo Pre y Post Co-cultivo de los niveles de la quimiocina CCL5/RANTES inducida por IFN, secretada por las rCMSPs en el sobrenadante tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2	226

RELACIÓN DE FOTOS

Foto 1. Placenta humana	168
Foto 2. Proceso de obtención del corion de placenta humana	169
Foto 3. Mantenimiento de las células mesenquimales	170
Foto 4. “Fibroblasto formador de unidades de colonias”	171
Foto 5. Densidad celular (~ 90%)	171
Foto 6. Sistema de transwell	178
Foto 7. Caracterización de las pMSCs <i>in-vitro</i> – Adhesión al plástico 1º criterio según la Sociedad Internacional de Terapia Celular	192
Foto 8. Caracterización de las pMSCs <i>in-vitro</i> – morfología tipo fibroblástica o poligonales	192
Foto 9. Diferenciación osteogénica de las pMSC. 3º criterio según la Sociedad Internacional de Terapia Celular	195
Foto 10. Diferenciación adipogénica de las pMSCs. 3º criterio según la Sociedad Internacional de Terapia Celular	196

PRESENTACIÓN

El sistema inmunitario desempeña un papel fundamental en el trasplante de órgano sólido. Los complejos mecanismos de inmunidad, que en circunstancias normales trabajan para identificar microbios extraños y dirigir el sistema inmune para destruirlos, representan una barrera significativa para el trasplante exitoso. El reconocimiento directo de los aloantígenos del donante por las células T del receptor provoca la estimulación y activación de las células T dando lugar al proceso de rechazo al injerto.

Para reducir el riesgo de rechazo del trasplante, los pacientes son tratados con medicamentos inmunosupresores que se administran en dos fases; una fase inicial de inducción que implica una dosis alta, y una fase posterior de mantenimiento que implica el uso del medicamento a largo plazo en una dosis más baja que amortiguan la respuesta inmunitaria

Uno de los principales efectos de la inmunosupresión es la susceptibilidad a una infección oportunista en los pacientes trasplantados. La IgG es considerada como un biomarcador, dado que la hipogammaglobulinemia IgG se asocia con un incremento de la tasa de infecciones comparando con los receptores sin hipogammaglobulinemia (15 vs 5 %). No obstante, el rechazo del injerto *per se* aumenta las probabilidades de infección.¹⁴⁵

Durante la última década, la aplicación clínica de las células mesenquimales como terapia celular innovadora en el trasplante de órganos sólidos está enfocada principalmente en las expectativas de la prevención o tratamiento del rechazo agudo o la fibrosis intersticial y la atrofia tubular, la inducción de tolerancia al injerto a largo plazo y la minimización de los efectos adversos de los fármacos inmunosupresores.¹⁴⁶

Varios estudios preclínicos han sido publicados, especialmente aquellos que incluyen la demostración de la capacidad de las células mesenquimales para inhibir la proliferación de las células T desencadenada por estímulos alogénicos, mitogénicos o antígenos. Sin embargo, el impacto relativo de las células mesenquimales sobre las células T memoria y

efectoras pre-activadas en comparación con las células T naïve, además de la duración de la inmunomodulación, se entienden de forma incompleta.¹⁴⁶

En una primera parte, la tesis presentada evalúa a la terapia de gammaglobulina con factor protector frente a las infecciones en una cohorte, la mortalidad en otra de pacientes post trasplantados de órgano sólido que presentaron hipogammaglobulinemia e infección severa, asimismo demostrar la seguridad y eficacia del tratamiento se realizó un ensayo clínico.

En el contexto de la pandemia, los pacientes hospitalizados COVID-19 severos y críticos, según los estudios publicados presentan una alteración de la respuesta inmune como la activación de la célula T frente a los antígenos del SARS-CoV-2 que genera un ambiente celular pro-inflamatorio causando el deterioro del paciente con alto riesgo de mortalidad sobre todo en pacientes con comorbilidades. Aunque la correlación de protección no está bien definida aún, los estudios sugieren que los pacientes recuperados de COVID-19 pueden presentar memoria T. En una segunda parte de la tesis se evalúa *in-vitro* la capacidad inmunomoduladora de las células mesenquimales frente a las células T antígeno-específicas del SARS-CoV-2 pre estimuladas de pacientes recuperados de COVID-19.

La presente tesis doctoral comprende 2 partes que se detallan a continuación:

Parte I

1. Estudio de la tasa de muerte en una cohorte retrospectiva de pacientes post-trasplantados cardíacos con infección severa e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV.
2. Estudio de la frecuencia de re-infecciones en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV.
3. Ensayo clínico multicéntrico titulado: “Evaluación de la eficacia y toxicidad del uso de gammaglobulina intravenosa en el tratamiento de infecciones en pacientes con hipogammaglobulinemia IgG post-trasplante de órgano sólido”

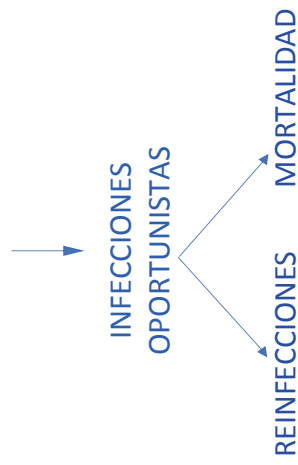
Parte II

1. Evaluación de la función inmunomoduladora *in-vitro* de las células mesenquimales de placenta humana frente a la respuesta celular T frente a antígenos virales de los pacientes recuperados de COVID-19 severo y crítico.

Trasplante de Órgano Sólido

→
INMUNOSUPRESIÓN

HIPOGAMMAGLOBULINEMIA



Terapia Gammaglobulina IV

Cohortes:

¿Disminuye la mortalidad?

Cohortes:

¿Disminuye la tasa de reinfección?

Ensayo clínico:

¿Disminuye la tasa de reinfección?

¿Es seguro y eficaz?

Infección por SARS-CoV-2

→
 Respuesta pro-inflamatoria descontrolada ante los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.

→
 Alta mortalidad en pacientes con comorbilidades.

No hay tratamiento definido para COVID-19 severo y crítico.

Células mesenquimales

Evaluación *in-vitro* de la capacidad inmunomoduladora

¿Modifica la activación celular?

¿Disminuye el ambiente pro-inflamatorio?



RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

PARTE 1

Las infecciones se mantienen como una causa relevante de morbilidad y de un incremento de costos tras un trasplante de órgano sólido (TOS). La inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos, definida como hipogammaglobulinemia IgG (HGG) se ha vinculado a un riesgo elevado de desarrollar infecciones severas en esta condición clínica.

PARTE 2

A la fecha, 15 de noviembre del 2021, se han realizado numerosas investigaciones intensivas y ensayos clínicos, sin embargo, no se ha encontrado un tratamiento eficaz para pacientes con la enfermedad por coronavirus (COVID-19) de grado severo o crítico. Estudios previos han reportado que las células madre mesenquimales de placenta humana (pMSCs) presentan propiedades inmunomoduladoras en otros contextos inflamatorios.

2. HIPÓTESIS

Hipótesis general

Las terapias inmunológicas pueden modular la respuesta frente a las infecciones en diferentes contextos clínicos.

- 2.1. Hipótesis del Estudio I:** La terapia con gammaglobulina intravenosa (GGIV) en los pacientes post-trasplantados cardíacos con infección severa e hipogammaglobulinemia disminuye la mortalidad.
- 2.2. Hipótesis del Estudio II:** La terapia GGIV en los pacientes post-trasplantados de órgano sólido tras una infección grave e hipogammaglobulinemia disminuye la incidencia de nuevos episodios de reinfección grave.
- 2.3. Hipótesis del Estudio III:** La terapia con GGIV añadida a la terapia antimicrobiana convencional (TAMC) es eficaz, segura y asociada con reconstitución de la inmunidad humoral en pacientes sometidos a TOS que desarrollan infecciones severas en presencia de HGG en el periodo post-trasplante, en comparación con pacientes que sólo usan terapia antimicrobiana convencional. En cuanto a la eficacia, la hipótesis planteada es de superioridad (menor incidencia de infecciones post tratamiento) de la terapia con GGIV añadida a la terapia antimicrobiana frente al uso convencional de terapia antimicrobiana.
- 2.4. Hipótesis del Estudio IV:** Las células mesenquimales de placenta humana pueden inmunomodular *in-vitro*, la respuesta celular T específica frente a los antígenos de spike (S-), nucleocápside (N-) y de membrana (M-) del Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) de pacientes recuperados de COVID-19 crítico o severo.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Evaluar la tasa de muerte en un seguimiento a largo plazo en una cohorte de pacientes post-trasplantados cardíacos con infección severa e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV + TAMC en comparación con una cohorte de pacientes del mismo centro que no recibieron GGIV.
- 3.2. Evaluar la incidencia de reinfección grave posterior a la terapia GGIV en los pacientes post-TOS con infección severa e HGG.
- 3.3. Evaluar la eficacia, reconstitución inmunológica de la inmunidad humoral y la seguridad luego de introducir la GGIV asociada a la terapia antimicrobiana convencional (TAMC) en pacientes con TOS que presentan infección grave e HGG post trasplante, en comparación con la administración de terapia antimicrobiana únicamente.
- 3.4. Evaluar si las células madre mesenquimales de placenta humana (pMSCs) bajo determinadas condiciones experimentales, *in-vitro*, pueden inmunomodular la respuesta celular T específicas frente a antígenos peptídicos específicos de SARS-CoV-2 de 20 pacientes recuperados con COVID-19 crítico o severo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.1. El Estudio I es un estudio de cohortes retrospectivo para evaluar la tasa de mortalidad posterior a la terapia GGIV en la terapia estándar de los receptores de trasplantes cardíacos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos e infecciones severa. Solo se estudió los pacientes de un centro de trasplante. Participaron 233 pacientes post-trasplantados cardíacos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos (definida como IgG < 600 mg/dL) detectada en el momento de una infección severa que fueron distribuidos en expuestos a la terapia GGIV y No expuestos. El periodo de estudio fue de 18 años (1998-2016). La variable principal fue la tasa de muerte. La variable secundaria fue la reconstitución de IgG en el periodo estudiado.
- 4.2. El Estudio II es un estudio de cohortes retrospectivo para evaluar la incidencia de reinfección grave posterior a la terapia GGIV añadido a la terapia estándar de los receptores de trasplantes de órganos sólidos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos e infección severa. Solo se observó a los pacientes de un centro de trasplante. Participaron

82 pacientes post-trasplantados de órganos sólidos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos (definida como IgG < 750 mg/dL) e infecciones severas. 51 pacientes post-trasplantados cardíacos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos e infección fueron expuestos a la terapia GGIV mientras 31 pacientes no lo fueron. El periodo de estudio fue de 3 meses. La variable principal fue la incidencia de un nuevo episodio de reinfección grave posterior a la exposición GGIV o a la detección de la inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos en los no expuestos. Las variables secundarias fueron la reconstitución de IgG en el periodo estudiado y reconstitución celular, factores de complemento y fenotipo linfocitario.

- 4.3. El Estudio III es un ensayo clínico controlado, abierto y multicéntrico para evaluar la eficacia, reconstitución inmunológica de la inmunidad humoral y la seguridad luego de introducir GGIV en la terapia estándar de los receptores de trasplantes de órganos sólidos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos e infecciones severas. Seis centros de trasplante participaron. Cuarenta y cuatro receptores de órganos sólidos con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos (definida como IgG < 600 mg/dL) detectada tempranamente en el momento de una infección severa fueron aleatorizados para recibir GGIV adicionalmente a la terapia antimicrobiana convencional o terapia antimicrobiana convencional por sí sola. Protocolo de GGIV: Dos dosis de 15 gramos (intervalo entre dosis de 7-15 días) seguidas de otras tres dosis de 20 gramos (intervalo entre dosis de 15-30 días) de GGIV 5%. Las variables principales de eficacia fueron la tasa y el número total de reinfecciones luego de la aleatorización de los pacientes. Se tomaron muestras de anticuerpos específicos en la inclusión en el ensayo clínico (Visita [V] 1, V1) y 30-45 días después de la última dosis de GGIV (última visita, V7) en un subgrupo de pacientes para analizar la cinética de la reconstitución de la inmunidad humoral.
- 4.4. El Estudio IV es un estudio experimental *in-vitro* de evaluación de la capacidad inmunomoduladora de las pMSCs tras un co-cultivo en un sistema de transwell con células madre mesenquimales de placenta humana pre-estimuladas con Interferón *gamma* (IpMSCs) y las células mononucleares de sangre periférica previamente estimulados (rCMSPs) frente a los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2 de 20 pacientes recuperados de COVID-19 severo y crítico.

Las células mesenquimales de placenta humana fueron aisladas de una donadora saludable tras una cesárea sin complicaciones. Se midieron los marcadores de activación linfocitaria CD4+ y CD8+ y las citocinas y quimiocinas en el sobrenadante antes y después del co-cultivo.

5. RESULTADOS

- 5.1. Resultados del Estudio I:** De una población de 233 pacientes post-trasplantados cardíacos tratados con GGIV por uso compasivo, se estudiaron 91 pacientes para la cohorte de tratados (expuestos) por disponibilidad de datos u otro motivo de selección. La cohorte de no expuestos fueron el resto de trasplantados, 142 receptores cardíacos del mismo centro, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, que no fueron tratados con GGIV durante el periodo de estudio. La mediana del tiempo de supervivencia fue de 54 meses en el grupo de GGIV vs 41 meses en el grupo de No GGIV ($p=0.078$). Se observa que la terapia GGIV se comporta como factor protector, OR 0.27 ($p=0.039$) para el evento muerte.
- 5.2. Resultados del Estudio II:** Se eligieron 82 pacientes post-trasplantados de órgano sólido con inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos e infección severa distribuidos en 51 expuestos en el grupo GGIV y a 31 pacientes en el grupo No GGIV. De los pacientes trasplantados 58 fueron trasplantados cardíacos, 11 hepáticos y 13 renales. En el análisis de Kaplan Meier, la supervivencia libre de reinfección en el periodo de estudio es mayor en el grupo de GGIV en comparación del grupo No GGIV, aunque no fue significativo, $p=0.06$. En el análisis de regresión logística multivariante se observa que la terapia GGIV se comporta como factor protector frente a nuevos eventos de reinfección grave OR 0.302, $p=0.021$ y el tiempo < de 6 meses post-trasplante permanece como factor de riesgo con OR 3.364, $p=0.019$.
- 5.3. Resultados del Estudio III:** Treinta y nueve pacientes fueron incluidos finalmente en el análisis (GGIV en combinación con terapia antimicrobiana convencional, $n=21$, versus terapia antimicrobiana convencional por sí sola, $n=18$). La tasa de reinfección se redujo significativamente en pacientes aleatorizados para recibir GGIV comparado con los pacientes que recibieron sólo la terapia antimicrobiana convencional (28.6 vs 66.7%, Chi-cuadrado, $p=0.017$). La media de reinfecciones tiende a menos en el grupo GGIV (0.47, intervalo 1-3; versus 0.89, intervalo 1-4; prueba de la U de Mann-Whitney, $p=0.056$). Los receptores de GGIV presentaron niveles de IgG significativamente inferior en V2, pero concentraciones significativamente superiores de IgG en las visitas de seguimiento V4 y V6. La GGIV fue segura y bien tolerada. En la V7 se encontraron niveles significativamente superiores de anticuerpos anti-citomegalovirus IgG-específico, anticuerpos anti- toxinas A y B del *Clostridium difficile* y anticuerpos IgG1 anti-tétanos que recibieron GGIV en comparación con los pacientes que fueron tratados solo con terapias antimicrobianas convencionales. Se comprobó una disminución significativa del factor activador de la célula B perteneciente a la familia del TNF (BAFF) en suero y en los niveles de IL-6 en comparación con la V1 en pacientes del grupo GGIV.

5.4. Resultados del Estudio IV: Se observó la respuesta celular T específica CD4+ y CD8+ frente al SARS-CoV-2 en los pacientes estudiados. Luego, las células mesenquimales aisladas expresaron los marcadores de superficie característicos y fueron capaces de auto-renovarse y diferenciarse en adipocitos y osteocitos. Tras el co-cultivo, los niveles de citocinas, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y otras quimiocinas inducidas por IFN, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 y CCL5/RANTES secretadas por las células mononucleares de sangre periférica previamente estimulados (rCMSPs) con los antígenos de SARS-CoV-2 se redujeron drásticamente.

6. CONCLUSIONES

- 6.1. La terapia con GGIV en pacientes post-trasplantados cardíacos con infección severa e HGG se asocia a menores tasas de muerte durante el seguimiento a largo plazo en comparación con los trasplantados no tratados con GGIV en un estudio de centro único.
- 6.2. La terapia con GGIV es un factor protector significativo ante una reinfección grave en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG durante el seguimiento posterior a la infusión.
- 6.3. En los resultados del ensayo clínico multicéntrico abierto y aleatorizado, se asocia la GGIV a una menor tasa de reinfecciones en trasplantes de órganos sólidos con infección severa e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos.
- 6.4. El modelo presentado sugiere que las IpMSCs modulan, reduciendo, las respuestas pro-inflamatorias de las células T helper de tipo 1 y CD8+ frente a las proteínas spike (S-), nucleocápside (N-) y membrana (M-) en pacientes con COVID-19 severo y crítico. Por consiguiente, estos datos sugieren que la terapia con las IpMSCs podría ser considerada como una posible estrategia terapéutica a evaluar en pacientes con COVID-19 severo y crítico.

SUMMARY

IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF IMMUNOMODULATORY THERAPIES WITH IMMUNOGLOBULINS AND MESENCHYMAL STEM CELLS IN PATIENTS IMMUNOSUPPRESSED BY TRANSPLANTATION OR BY SARS-CoV-2

1. INTRODUCTION

PART 1

Infections remain a significant cause of morbidity and increased costs after a solid organ transplant (SOT). Secondary antibody deficiency defined as IgG hypogammaglobulinemia (HGG), has been linked to an increased risk of developing severe infections in this clinical setting.

PART 2

To date, November 15, 2021, several intensive research, and clinical trials have been conducted, however, an efficacious treatment for severe and critical COVID-19 patients is lacking. Previous studies have reported that human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) have immunomodulatory properties in other inflammatory contexts.

2. HYPOTHESIS

General Hypothesis

Immunological therapies can modulate the response to infections in different clinical contexts.

- 2.1. Hypothesis of Study I:** IVIG therapy after heart transplant decreases the mortality in patients with severe infection and hypogammaglobulinemia.

- 2.2. **Hypothesis of Study II:** IVIG therapy after solid organ transplant (SOT) decreases the incidence of new episodes of reinfection in patients with severe infection and hypogammaglobulinemia (HGG).
- 2.3. **Hypothesis of Study III:** IVIG therapy added to conventional antimicrobial therapy is efficacious, safe, and associated with reconstitution of humoral immunity in patients undergoing SOT who develop severe infections in the presence of HGG in the post-transplant period compared to patients using conventional antimicrobial therapy only. Regarding efficacy, the hypothesis is of superiority (lower incidence of post-treatment infections) of IVIG therapy plus antimicrobial therapy compared to the conventional use of antimicrobial therapy.
- 2.4. **Hypothesis of Study IV:** Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) might immunomodulate *in-vitro* the specific T cell response against to spike (S-), nucleocapsid (N-) and membrane (M-) antigens of the severe acute respiratory syndrome B-coronavirus (SARS-CoV-2) in 20 patients with severe and critical COVID-19.

3. OBJECTIVE

- 3.1. To evaluate the death rate at a long-term follow-up in a cohort of post-cardiac transplant recipients with severe infection and hypogammaglobulinemia receiving IVIG therapy with conventional antimicrobial therapy compared with patients who did not receive IVIG.
- 3.2. To assess the incidence of severe re-infection following IVIG therapy in post-organ solid transplant recipients with severe infection and hypogammaglobulinemia compared with patients who did not receive IVIG therapy.
- 3.3. To evaluate the efficacy, immunological reconstitution of humoral immunity and safety after introducing IVIG associated with conventional antimicrobial therapy in patients with severe infection and post-transplant HGG with SOT, compared to the administration of antimicrobial therapy alone.
- 3.4. In this study, we investigated whether human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) under certain experimental conditions, *in-vitro*, can immunomodulate the specific T cell response against to S-, N- and M- antigens of SARS-CoV-2 in 20 patients with severe and critical COVID-19.

4. MATERIALS AND METHODS

- 4.1. Study I is a retrospective cohort study to evaluate the mortality rate in post heart transplant recipients with secondary antibody immunodeficiency and severe infections after IVIG therapy. Only patients from one transplant center were studied. Participants included 233 post-heart transplant recipients with secondary immunodeficiency of antibodies (defined as IgG < 600 mg/dL) detected at the time of severe infection who were grouped into exposed to IVIG therapy and not exposed recipients. The study period was 18 years (1998-2016). The primary endpoint was death rate. Reconstitution of IgG level was a secondary outcome.
- 4.2. Study II is a retrospective cohort study to evaluate the incidence of severe re-infection following IVIG therapy added to standard therapy of post- solid organ transplant recipients with secondary antibody immunodeficiency and severe infections. Only patients from one transplant center were observed. Participants included 82 post-solid organ transplant patients with secondary immunodeficiency of antibodies (defined as IgG < 750 mg / dL) and severe infections. 51 post-cardiac transplant patients with secondary immunodeficiency of antibodies and infection were exposed to IVIG therapy while 31 patients were not. The study period was 3 months. The primary endpoint was the incidence of a new episode of severe reinfection after IVIG exposure or detection of secondary antibody immunodeficiency in the unexposed. Secondary outcomes were IgG reconstitution in the study period and cellular reconstitution, complement factors and lymphocyte phenotype.
- 4.3. Study III is a controlled, open-label, multicenter clinical trial, to evaluate the efficacy, immunological reconstitution of humoral immunity and safety after addition of IVIG for the therapy of solid organ recipients with secondary antibody deficiency and severe infection to antimicrobial therapy. Six transplant centres participated. Forty-four solid organ recipients with secondary antibody deficiency (defined as IgG <600 mg/dL) detected soon at the time of severe infection were randomized to receive IVIG in addition to conventional antimicrobial therapy versus conventional antimicrobial therapy alone. IVIG protocol: Two doses of 15 grams (interval between doses 7-15 days) followed by another 3 doses of 20 grams (interval between doses 15-30 days) of a 5% IVIG product. The primary efficacy variables were the rate and total number of reinfections after randomization of the patients. Specific antibodies were tested at inclusion in the clinical trial (Visit [V] 1, V1) and 30-45 days after last IVIG dose (last-visit, V7) in a subgroup of patients to assess the kinetics of humoral immunity reconstitution.
- 4.4. Study IV is an *in-vitro* experimental study to evaluate the immunomodulatory capacity of pMSCs after co-culture in a transwell system of human placental mesenchymal stem cells pre-stimulated with interferon gamma (IpMSCs) and previously stimulated peripheral blood

mononuclear cells (rPBMCs) against S-, N- and M- antigens of SARS-CoV-2 of 20 recovered patients from severe and critical COVID-19. The mesenchymal cells of the human placenta were isolated from a healthy donor after an uncomplicated caesarean section. Lymphocyte activation markers CD4+ and CD8+ and cytokines and chemokines in the supernatant before and after co-culture were measured.

5. RESULTS

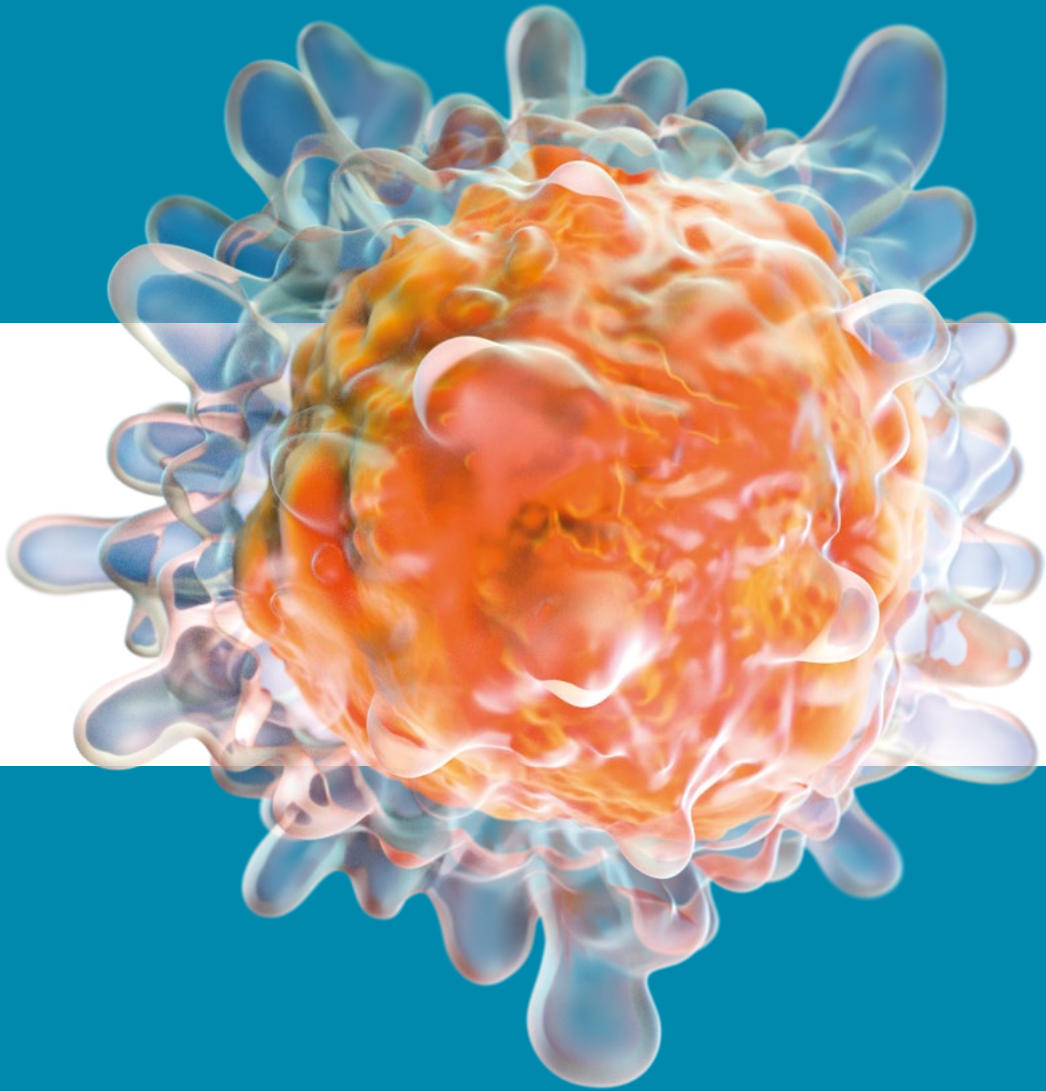
- 5.1. Results of Study I: From a population of 233 post-cardiac transplant patients treated with IVIG for compassionate use, 91 patients were studied for the cohort of treated (exposed) patients for data availability or other reason for selection. The nonexposed cohort were the rest of the transplanted patients, 142 cardiac recipients from the same center, the Gregorio Marañón General University Hospital, who were not treated with IVIG during the study period. The median survival time was 54 months in the IVIG group vs 41 months in the Non-IVIG group ($p=0.078$). It is observed that IVIG therapy behaves as a protective factor, OR 0.27 ($p=0.039$) for the event death.
- 5.2. Results of Study II: 82 post-solid organ transplant recipients with secondary immunodeficiency of antibodies and severe infection distributed in 51 exposed patients in the IVIG group and 31 patients in the non-IVIG group were observed. Of the transplanted patients, 58 were cardiac, 11 hepatic and 13 renal transplanted patients. In Kaplan Meier's analysis, reinfection-free survival in the study period was higher in the IVIG group compared to the non-IVIG group, although it was not significant, $p=0.06$. Multivariate logistic regression analysis showed that IVIG therapy behaves as a protective factor against new events of severe re-infection OR 0.302, $p=0.021$ and the time < 6 months post-transplant remains a risk factor with OR 3.364, $p=0.019$.
- 5.3. Results of Study III: Thirty-nine patients were finally included in the analysis (IVIG in combination with conventional antimicrobial therapy, $n=21$, versus conventional antimicrobial therapy alone, $n=18$). The rate of reinfection was significantly reduced in patients randomized to receive IVIG compared to patients who received only conventional antimicrobial therapy (28.6 vs 66.7%, Chi-square, $p=0.017$). Mean reinfections tend to be lower in the IVIG group (0.47, interval 1-3, versus 0.89, interval 1-4, Mann-Whitney test, $p=0.056$). IVIG recipients had significantly lower IgG levels at V2, but significantly higher IgG concentrations at V4 and V6 follow-up visits. IVIG was safe and well tolerated. Significantly higher levels of IgG specific anti-cytomegalovirus, anti-clostridium difficile toxins A and B and IgG1

anti-tetanus toxoid antibodies were founded in patients who received IVIG at V7 compared to patients treated with conventional antimicrobial therapies alone. A significant decrease in serum of B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) and IL-6 levels compared to V1 was observed in patients in the IVIG group.

- 5.4. Results of Study IV: SARS-CoV-2 CD4+ and CD8+ specific cell responses were observed in the studied patients. Isolated mesenchymal stem cells expressed characteristic surface markers and were able to self-renew and differentiate into adipocytes and osteoblasts. Following co-culture, levels of cytokines, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β and other IFN-induced chemokines, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 and CCL5/RANTES secreted by previously stimulated peripheral blood mononuclear cells (rPBMCs) with SARS-CoV-2 antigens were drastically reduced.

6. CONCLUSIONS

- 6.1. IVIG therapy in post-heart transplant recipients with severe infection and secondary immunodeficiency of antibodies is associated with lower death rates during long-term follow-up compared to transplanted patients not treated with IVIG therapy in a single-center study.
- 6.2. IVIG therapy is a significant protective factor against severe reinfection in post-transplant solid organ patients with severe infection and secondary immunodeficiency of antibodies during post-IVIG infusion follow-up.
- 6.3. In the results of the open-label, randomized, multicenter clinical trial, IVIG is associated at a lower rate of reinfections in solid organ transplants with severe infection and secondary antibody deficiency.
- 6.4. The model presented suggests that the IpMSCs down-modulate *in-vitro* the proinflammatory T helper Type 1 and CD8+ T cell response against to spike (S-), nucleocapsid (N-) and membrane (M-) proteins in patients with severe and critical COVID-19. Therefore, these data suggest that IpMSCs therapy could be considered as a possible therapeutic strategy to evaluate in patients with severe and critical COVID-19.



PARTE I

PARTE I

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

A pesar del éxito del uso profiláctico y terapéutico de las terapias antimicrobianas, las infecciones siguen siendo la principal causa de alta morbilidad y costos después del trasplante de órgano sólido.^{1,2}

La deficiencia secundaria de anticuerpos, definida como HGG, se observa con frecuencia después del trasplante de órganos sólidos. En estudios unicéntricos, multicéntricos y de metanálisis, se ha demostrado que la hipogammaglobulinemia IgG es un factor de riesgo de infección grave en todos los trasplantes de órgano sólido³⁻⁵.

La inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos está relacionada con los procedimientos del trasplante, la pérdida de proteínas, la terapia inmunosupresora de inducción y de mantenimiento.⁶ En el caso de una complicación infecciosa grave, la terapia antimicrobiana por sí sola no es capaz de restaurar la inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos. Se ha reportado previamente en estudios retrospectivos sobre el papel potencial de la reconstitución de la inmunidad humoral y sobre la tasa de recurrencia de infecciones (re infecciones) en receptores cardíacos que desarrollaron una infección grave y una inmunodeficiencia secundaria simultánea de anticuerpos después de la adición de GGIV a la terapia antimicrobiana convencional⁷.

Es necesario buscar alternativas efectivas para lograr un mejor control de las infecciones graves y re infecciones en este entorno^{8,9} El objetivo del uso terapéutico de GGIV es aumentar los niveles de anticuerpos totales y específicos de IgG que podrían tener un impacto en mejor control de las re infecciones⁷. No se han diseñado ensayos clínicos que utilicen GGIV para reconstituir componentes inmunes humorales y para evaluar si existe un efecto significativo sobre la tasa de re infecciones. Presentamos aquí por primera vez la eficacia, la reconstitución de la inmunidad humoral y la seguridad de un protocolo de GGIV para la terapia de receptores de órganos sólidos que desarrollan una infección grave y en los que se detecta una deficiencia secundaria de anticuerpos.

PARTE I

2. JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La infección es un factor de riesgo de muerte en TOS y la HGG es un factor de riesgo de infección en distintos TOS incluyendo al trasplante cardiaco (TC), pulmonar (TP), renal (TR) y hepático (TH). El coste generado del tratamiento y la prolongación de la hospitalización por aparición de eventos infecciosos es muy elevado.

La HGG y la deficiencia de anticuerpos específicos es uno de los pocos factores de riesgo inmunológico susceptibles de ser sustituibles mediante el uso de GGIV. Muy pocos estudios han evaluado previamente la eficacia del uso terapéutico de la GGIV inespecífica en TOS con HGG e infección severa. No se ha publicado ningún ensayo multicéntrico aleatorizado en la indicación a estudiar: tratamiento de pacientes con TOS que desarrollan infección severa e HGG en el periodo post-trasplante.

El potencial beneficio del uso de la GGIV en pacientes con HGG post TOS e infección severa es el mismo que justificó la aprobación de algunas indicaciones de este hemoderivado: prevenir infecciones cuando hay HGG. El contexto en que se plantea este ensayo es similar al del uso aprobado en pacientes con trasplante de médula ósea o con HGG primaria. En este estudio la HGG es secundaria a distintos factores relacionados con el TOS. El uso de GGIV en pacientes con HGG post TOS podría disminuir la aparición de eventos infecciosos y reconstituir anticuerpos. Ambos factores podrían impactar en el tiempo de estancias hospitalarias costosas derivadas de una complicación de este tipo.

PARTE I

3. ESTUDIO 1

Estudio de cohortes retrospectivo de la tasa de muerte de pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV

3. ESTUDIO 1

Estudio de cohortes retrospectivo de la tasa de muerte de pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV

3.1 HIPÓTESIS

La terapia GGIV en los pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e hipogammaglobulinemia disminuye la mortalidad.

3.2 OBJETIVO

Evaluar la tasa de muerte en seguimiento a largo plazo de una cohorte de pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV + terapia antimicrobiana convencional en comparación con una cohorte de pacientes del mismo centro que no recibieron GGIV.

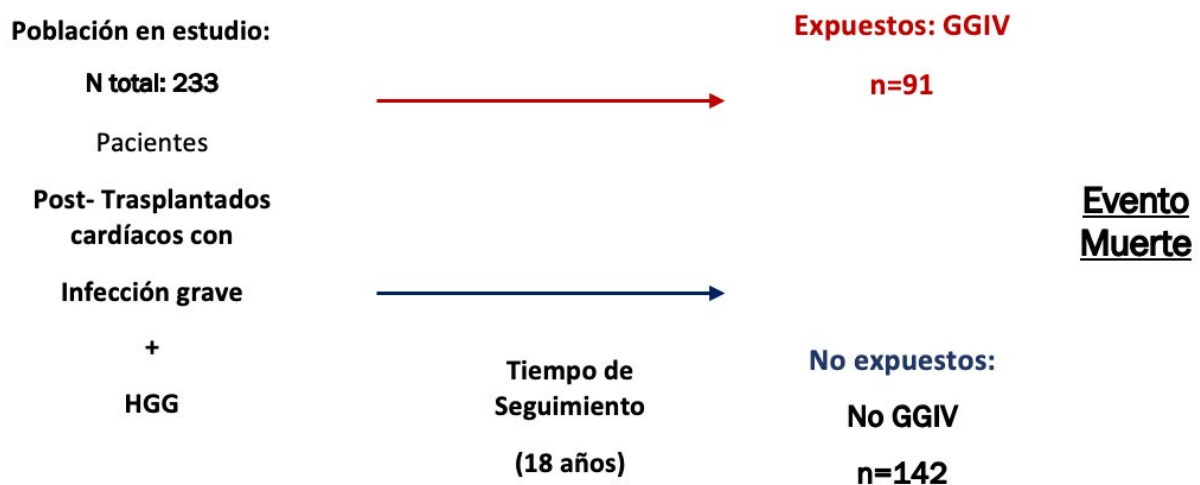
3.3 METODOLOGÍA

Es un estudio de cohortes tipo retrospectivo de pacientes post-trasplantados cardíacos que recibieron la terapia con GGIV por la indicación de infección grave e HGG IgG (IgG < 600 mg/dL) versus los que no recibieron. Se realizó el seguimiento de un período de 18 años tras la revisión de la historia clínica electrónica (1998 - 2016) (Figura 1)

Los participantes se distribuyeron en 2 grupos de la siguiente manera:

1. Cohorte expuestos: Pacientes post-trasplantados cardíacos con hipogammaglobulinemia IgG (IgG<600 mg/dl) que presenten una infección grave y reciben infusión de GGIV.
2. Cohorte no expuestos: Pacientes post-trasplantados cardíacos con hipogammaglobulinemia IgG (IgG<600 mg/dl) que presenten una infección grave y no fueron tratados con infusión de GGIV.

FIGURA 1. ESTUDIO DE TASA DE MUERTE EN COHORTES RETROSPECTIVO DE PACIENTES POST-TRASPLANTADOS CARDÍACOS CON INFECCIÓN GRAVE E HGG EXPUESTOS O NO A LA TERAPIA CON GGIV



GGIV: Gammaglobulina intravenosa. n: número de pacientes.

3.3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

De un estudio prospectivo se identificaron pacientes tratados con GGIV por la misma indicación de infección grave e hipogammaglobulinemia IgG y pacientes no tratados. 233 pacientes post-trasplantados cardíacos de un solo centro, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), fueron elegibles pacientes entre 18 y 85 años bajo terapia inmunosupresora protocolizada. Se configuran 2 cohortes retrospectivas, una con infección grave documentada e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos IgG (IgG<600 mg/dl) que reciben terapia con GGIV y la otra cohorte son los pacientes post-trasplantados con infección grave e HGG sin terapia GGIV.

Otros criterios de inclusión fueron el uso de terapia de inducción con anticuerpos monoclonales y la supervivencia de al menos un mes posterior al trasplante ya que la mortalidad en el primer mes suele deberse a complicaciones quirúrgicas.

El criterio de exclusión fue el uso de GGIV antes del trasplante cardíaco.

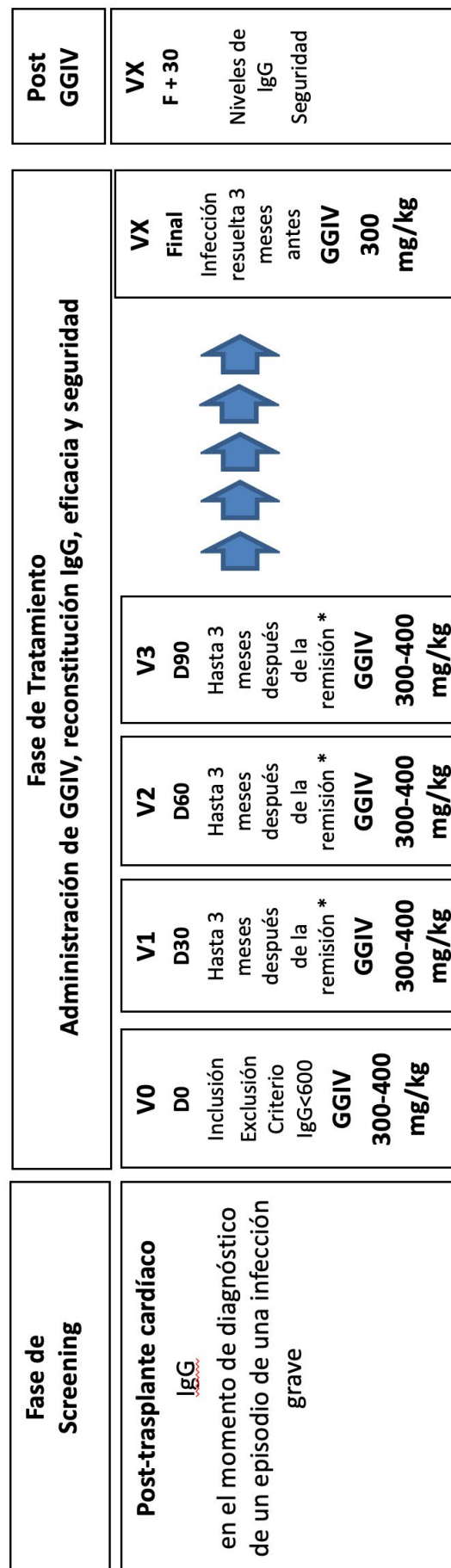
3.3.2 PROTOCOLO DE VISITAS

El protocolo de visitas del estudio retrospectivo se muestra en la Figura 2 y corresponden al diseño de práctica habitual, es decir, si el paciente ha tenido un evento infeccioso grave el paciente se hospitaliza y acude para la revisión cada semana, 15 días o mensual, y si no ha tenido un evento infeccioso relevante suelen acudir al hospital sistemáticamente al año sin intervención para este estudio. Las terapias con GGIV se administraron mediante protocolo de uso compasivo vigente en la época en que fueron tratados. En la rutina, los pacientes tratados con GGIV son sometidos a un protocolo de rutina que incluye la cuantificación de IgG en el momento de haberse detectado una infección grave post-trasplante. En el análisis retrospectivo los pacientes se incluyeron si cumplían los criterios de inclusión y exclusión. En la visita inicial rutinaria (V0) se inicia con la primera infusión de GGIV, seguido de la visita 1 (V1) 30 días tras la V0 para una segunda dosis, y posteriormente las visitas 2 (V2) tras 60 días de la V0, la visita 3 (V3) tras 90 días de la V0 hasta la visita final en donde la infección debió ser resuelta 3 meses antes. Es decir, se administró GGIV hasta que el paciente había cumplido con 3 meses sin infección. Las dosis de GGIV administradas en cada visita fue de 300-400 mg/kg/mes hasta 3 meses después de la resolución de la infección verificado con un cultivo negativo o niveles de antigenemia CMV negativa o resolución clínica de la infección. El cumplimiento de estas visitas de práctica rutinaria no siempre fue el mismo debido a distintas causas de la práctica clínica, (ver resultados). Finalmente 30 días tras la visita final se determinan los niveles de IgG y parámetros de seguridad.

FIGURA 2: USO COMPASIVO DEL PROTOCOLO DE GGIV

Uso compasivo del protocolo de GGIV

Inmunoguiado – Detección temprana de HGG en el momento de la infección– Reconstitución de IgG



D: Día de visita. HGG: Hipogammaglobulinemia IgG. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V: Visita programada del prospectivo por uso compasivo.

3.3.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables registradas fueron las demográficas, factores cardiológicos asociados a la cirugía del trasplante cardíaco, del tratamiento y evento infeccioso.

3.3.3.1 VARIABLE PRIMARIA

- Variable muerte en pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e HGG que reciben terapia GGIV y No GGIV.

3.3.3.2 VARIABLE SECUNDARIA

- Reconstitución de IgG definida como niveles séricos de IgG >750mg/dl en el período estudiado.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La data se analizó con el programa informático SPSS. Para comprobar la distribución de normalidad se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las variables continuas fueron expresadas como media con desviación estándar (DE) o mediana y rango intercuartílico (RIQ). Las variables categóricas fueron expresadas en conteo absoluto y porcentaje. Se utilizó las pruebas de T-Student o la U de Mann-Whitney según convenga para variables continuas y Chi-cuadrado para comparar variables categóricas.

Se utilizó el análisis de regresión logística para estudiar los factores asociados con la presencia de muerte. Se consideró el valor de p exacto de 2 colas y los valores <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo clínico fue aprobado por el comité de ética de investigación clínica (CEIC) del Instituto de investigación sanitaria Gregorio Marañón. Los participantes del estudio dieron su consentimiento informado por escrito para el uso compasivo de GGIV.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 PACIENTES SELECCIONADOS

El intervalo de estudio fue de 18 años (1998-2016) de seguimiento.

De una población de 233 pacientes post-trasplantados cardíacos tratados con GGIV por uso compasivo, se estudiaron 91 pacientes para la cohorte de tratados (expuestos) por disponibilidad de datos u otro motivo de selección de inclusión. La cohorte de no expuestos fueron el resto de trasplantados, 142 receptores cardíacos del mismo centro, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, que no fueron tratados con GGIV durante el periodo de estudio.

3.6.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los parámetros en las cohortes de expuestos y no expuestos a la terapia de GGIV fueron similares en los datos demográficos y variables clínicas. La edad media fue de 55 (DE±10) y 53 (DE±11) años en los grupos de GGIV y No GGIV respectivamente. Hubo una tendencia no significativa a que los tratados eran mayores a los no tratados. Además, la media del peso del receptor fue similar en ambos grupos. La prevalencia de las infecciones pre-trasplante cardíaco fue de 7.5% y 6.9% en el grupo de GGIV y No GGIV respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas. (TABLA 1)

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS DE LOS GRUPOS CON GGIV Y SIN GGIV

Variables	GGIV n=91	No GGIV n=142	Valor p
Edad (años, media ± DE)	55 ± 10	53 ± 11	0.19
Peso receptor (Kg, media ± DE)	69 ± 17	69 ± 13	0.98
Prevalencia pre-trasplante de infección (%)	7.5	6.9	0.89

Se utilizó la prueba T-Student para variable cuantitativas y Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan en medias con desviación estándar (\pm DE) y porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. Kilos: Kg.

Con relación a las características cardiovasculares peri-trasplante, la media de fracción de eyección izquierda fue de 23% (DE \pm 13) en el grupo de GGIV y de 21% (DE \pm 13) en el grupo de No GGIV, sin diferencias estadísticamente significativas. La media del tiempo de isquemia y la circulación extracorpórea fueron similares en ambos grupos. (TABLA 2)

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS CARDIOVASCULARES PERI-TRASPLANTE DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS DE LOS GRUPOS CON GGIV Y SIN GGIV

Variables	GGIV n=91	No GGIV n=142	Valor p
Fracción de eyección ventricular izquierda (% , media ± DE)	23 ± 13	21 ± 13	0.62
Tiempo de Isquemia (minutos, media ± DE)	210 ± 54	206 ± 59	0.71
Tiempo de circulación extracorpórea (minutos, media \pm DE)	140 ± 42	137 ± 43	0.64

Se utilizó la prueba T-Student para variable cuantitativas. Los valores se expresan en medias con desviación estándar (\pm DE). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

Tras el trasplante cardíaco, el porcentaje de pacientes que presentaron disfunción primaria del injerto fueron de 31% en el grupo de GGIV vs 22% en el grupo de no GGIV, sin diferencias estadísticamente significativas. Además, la enfermedad vascular del injerto se presentó en el 2.7 % de los pacientes tratados con GGIV y 5.6% en el grupo de No GGIV, sin diferencias estadísticamente significativas. En el 4.1% de pacientes del grupo de GGIV padecieron algún tipo de cáncer y 9.5% en el grupo de No GGIV, sin diferencias estadísticamente significativas. Esta prevalencia de cáncer es acumulada en el tiempo de seguimiento. (TABLA 3)

TABLA 3. COMPLICACIONES Y % DE CÁNCER EN EL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS CARDÍACOS EN LOS GRUPOS CON GGIV Y SIN GGIV

Variables	GGIV n=91	No GGIV n=142	Valor p
Disfunción primaria del injerto (%)	31	22	0.24
Enfermedad vascular del injerto (%)	2.7	5.6	0.51
Cáncer post-trasplante (%)	4.1	9.5	0.16

Se utilizó la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan en porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

3.6.3 PREVALENCIA DE INFECCIÓN GRAVE EN EL GRUPO GGIV

El tipo de infección en el grupo de tratados (n=91) principalmente fue de infección bacteriana (no neumonía) con un 33%, seguido de neumonía bacteriana con 20%. La enfermedad por *Citomegalovirus* (CMV) se presentó en un 10% y asociada a una infección bacteriana o fúngica en un 13% cada una. Menos frecuentes fueron la infección sistémica fúngica sola (3%) o infecciones por *Nocardia* (1%). (TABLA 4)

TABLA 4. PREVALENCIA DE INFECCIONES EN EL GRUPO DE GGIV

Tipo de Infección Número de eventos (%)	GGIV n=91
Infección bacteriana (no Neumonía)	30 (33)
Neumonía bacteriana	18(20)
Enfermedad CMV + Infección bacteriana	12(13)
Enfermedad CMV + Infección fúngica	12(13)
Enfermedad CMV	9 (10)
Infección sistémica fúngica	3(3)
Nocardiosis	1(1)
Otros	6(7)

Los valores se expresan en porcentaje (%). GGIV: Gammaglobulina intravenosa. CMV: Citomegalovirus.

3.6.4 NIVELES DE IGG EN PACIENTES TRATADOS CON GGIV

En el grupo de tratados con GGIV (n=91) la IgG media en el momento de infección es de 481 ± 87 mg/dL, rango (198-599) y el tiempo medio desde el trasplante hasta la primera infusión de GGIV fue de 65.4 ± 28.5 días, rango (7-180 días).

No todos los pacientes recibieron las mismas dosis de GGIV y por tanto no las mismas visitas, por eso la media del número de dosis administradas fue 5 con rango de 1 a 12 dosis por paciente. Las causas clínicas que condujeron a la variabilidad de visitas/dosis de GGIV incluyeron: Necesidad de seguir la terapia por persistencia de infección (los que tienen más dosis), cálculo de la tasa catabólica de IgG que decide el número de dosis a administrar, imposibilidad de administrar más dosis por inestabilidad hemodinámica del paciente y tiempo de resolución de la infección.

De los 91 pacientes, 75 (84,2%) normalizaron los niveles de IgG. (TABLA 5)

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LA IGG EN EL GRUPO DE GGIV

DESCRIPCIÓN	GGIV n=91
IgG media (\pm DE) en el momento de infección	481 ± 87 mg/dL. rango (198-599)
Tiempo medio (desde el trasplante hasta la primera dosis GGIV)	65.4 ± 28.5 días rango (7-180 días)
Media de dosis GGIV administradas por paciente	5 rango 1-12 dosis
Pacientes que normalizaron los niveles de IgG (>750 mg/dl)	75/91 (82,4%)

Los valores se expresan en medias con desviación estándar (\pm DE) y porcentaje (%). n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

3.6.5 TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

La mediana del tiempo de supervivencia desde la primera infusión de GGIV (en el grupo GGIV) o del diagnóstico de HGG (en el grupo no GGIV), fue de 54 meses vs 41 meses, respectivamente, $p=0.078$ (TABLA 6).

TABLA 6. TIEMPO DE SUPERVIVENCIA EN LOS GRUPOS DE GGIV Y NO GGIV DE LOS POST TRASPLANTADOS CARDÍACOS

PARÁMETRO	GGIV n=91	No GGIV N=142	Valor p
Mediana de tiempo de supervivencia (meses) (desde la 1ra infusión de GGIV o diagnóstico de HGG en los no expuestos hasta el evento muerte)	54	41	0.078

Se utilizó la prueba de la U Mann-Whitney. Los valores se expresan mediana. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

3.6.6 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES ASOCIADOS A LA VARIABLE MUERTE

En el análisis de regresión logística univariado, en la variabilidad de los factores de riesgo de muerte, se observan como factor protector al uso de GGIV OR de 0.31 ($p=0.0085$) y a la terapia de inducción no citolítica (Daclizumab o Basiliximab) OR 0.24 ($p=0.0002$). Sin embargo, los episodios de rechazo agudo se comportan como factor de riesgo para la variable muerte OR 2.37 ($p=0.0003$) (TABLA 7)

TABLA 7. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES ASOCIADOS A LA VARIABLE MUERTE

PARÁMETROS CLÍNICOS	OR	IC 95%	Valor p
Terapia GGIV	0.31	0.13-0.74	0.0085
Inducción no citolítica (Daclizumab o Basiliximab)	0.24	0.11-0.51	0.0002
Sexo/Femenino	0.85	0.36-2.009	0.71
Edad > 50 años	0.71	0.28-1.75	0.45
Disfunción primaria del injerto	1.39	0.47 -4.05	0.55
Nº de episodios de rechazo agudo	2.37	1.48-3.80	0.0003
Desarrollo del tumor	2.67	0.85-8.39	0.092
Tiempo de seguimiento	1.001	0.99-1.0006	0.64
Status seropositivo CMV	0.63	0.20-1.92	0.41
Asistencia ventricular pre-Tx	1.53	0.95-2.47	0.078

IC 95%: Intervalo de confianza del 95% OR: Odds Ratio. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. CMV: Citomegalovirus.

3.6.7 VARIABLE ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO DE MUERTE

En el modelo multivariante se introdujeron sólo las variables que resultaron significativamente asociadas al riesgo de muerte (ver TABLA 7). Se observa que la terapia GGIV OR 0.27 ($p=0.039$) y la terapia de inducción no citolítica OR 0.28 ($p=0.017$) permanecen como factor protector. El número de episodios de rechazo agudo permanece como factor de riesgo OR 2.17, $p=0.0062$. (TABLA 8)

TABLA 8. VARIABLE ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO DE MUERTE

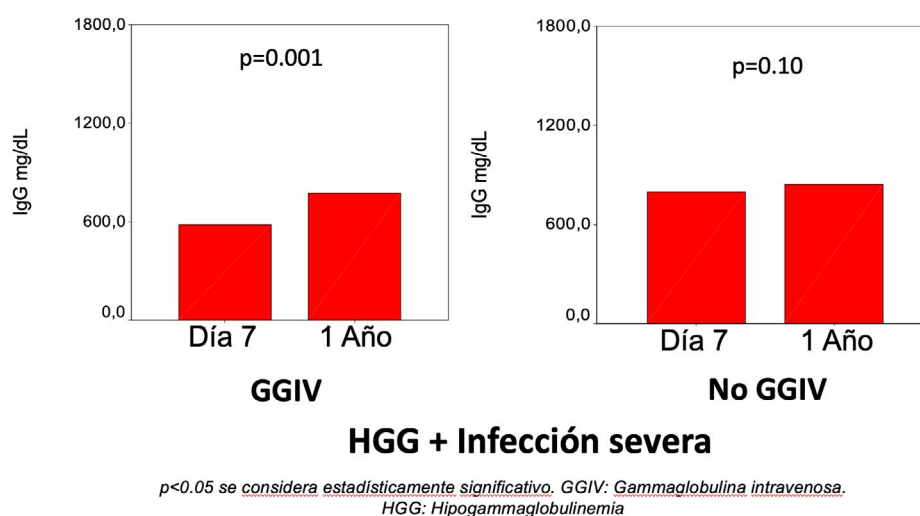
PARÁMETROS CLÍNICOS	OR	IC 95%	Valor p
Terapia GGIV	0.27	0.08-0.94	0.039
Inducción no citolítica	0.28	0.09-0.82	0.017
Número de episodios de rechazo agudo	2.17	1.25-3.78	0.0062

IC 95%: Intervalo de confianza del 95% OR: Odds Ratio. $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

3.6.8 RECONSTITUCIÓN DE GGIV

Se observa en los pacientes post-trasplantados cardíacos la reconstitución significativa ($p=0.001$) de los niveles de IgG posterior a un año mientras que en el grupo de No GGIV no se observa reconstitución significativa ($p=0.10$).

FIGURA 3 RECONSTITUCIÓN DE GGIV POSTERIOR A UN 1 AÑO DE SEGUIMIENTO EN LOS GRUPOS GGIV Y NO GGIV



3.7 DISCUSIÓN

Este estudio se diseñó para realizar una evaluación rápida del posible impacto de la terapia con GGIV en la variable más relevante, la variable muerte. Dado el seguimiento necesario para conseguir observar diferencias en las tasas de muerte no es posible hacer estudios prospectivos y menos ensayos clínicos. En el estudio de cohortes retrospectivo realizado para determinar la ocurrencia del evento muerte tras el seguimiento post trasplante cardíaco de pacientes que cumplían criterios de infección grave e hipogammaglobulinemia, en la cohorte tratados con GGIV, se observa menor tasa de muerte. Nuestro hallazgo, tras análisis de modelos multivariados, es similar a lo descrito por *Bourassa-Blanchette et al*¹⁰

Analizando la frecuencia de infecciones en los pacientes post-trasplantados cardíacos estudiados observamos que las infecciones bacterianas son las más prevalentes, similares a los datos reportados por la ISHLT.¹¹

La adición de la presencia de hipogammaglobulinemia a los riesgos asociados al trasplante cardíaco como procedimientos de asistencia circulatoria previo al trasplante, las drogas inmunosupresoras incrementa el riesgo de infecciones y mortalidad.⁵

Dada la alta mortalidad de los pacientes trasplantados cardíacos y los resultados de esta cohorte con un seguimiento a largo plazo deberían confirmarse con un ensayo clínico randomizado utilizando otras variables que sean factibles de recoger en un periodo razonable de tiempo.

3.8 LIMITACIONES

Una debilidad del modelo de cohortes retrospectivo es que depende de los registros históricos. Está asociado al riesgo de sesgos de selección. Para minimizar este riesgo se hizo un ajuste al menos por las variables que resultaron significativamente asociadas al riesgo de muerte. Otra limitación es que es probable que se hayan omitido otras variables relevantes de riesgo de muerte que podrían haber afectado el resultado del ajuste multivariable. No obstante, el valor de la variable GGIV individual es válido como tal y genera la hipótesis del posible beneficio de la GGIV. En este estudio la cohorte de comparación puede haber incluido un número de pacientes menor que cursaron con infección severa e hipogammaglobulinemia pero que no fueron tratados. Desde 1998 la práctica habitual en el HGUGM fue la terapia con GGIV en esta indicación por lo que eran pocos los pacientes a los que no se ofrecía esta posibilidad. En el año 2016 la situación de prescripción en esta indicación se vio restringida por la crisis económica y por la escasez que empezó a existir para administrar estas terapias. Por esta razón a partir de ese año el protocolo de uso compasivo fue mucho más restringido y tuvo que rediseñarse.

3.9 CONCLUSIONES

- La terapia de GGIV en pacientes post-trasplantados cardíacos con infección grave e HGG se asocia a menor tasa de muerte durante el seguimiento a largo plazo en comparación con trasplantados cardíacos no tratados con GGIV en un estudio de centro único.
- La terapia de inducción no citolítica en pacientes post-trasplantados cardíacos se asocia a una menor tasa de muerte durante el seguimiento a largo plazo.
- El número de episodios de rechazo agudo aumenta el riesgo de muerte en pacientes post-trasplantados cardíacos.

PARTE I

4. ESTUDIO 2

Estudio de incidencia de reinfección grave en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e hipogammaglobulemia que reciben GGIV

4. ESTUDIO 2

Estudio de incidencia de reinfección grave en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e hipogammaglobulinemia que reciben GGIV

4.1 HIPÓTESIS

La terapia GGIV en los pacientes post-trasplantados de órgano sólido tras una infección grave e hipogammaglobulinemia disminuye la incidencia de nuevos episodios de reinfección grave.

4.2 OBJETIVO

4.2.1 OBJETIVO PRIMARIO

- Evaluar la incidencia de reinfección grave posterior a la terapia GGIV en los pacientes post-TOS con infección grave e HGG.

4.2.2 OBJETIVO SECUNDARIO

- Evaluar la reconstitución de parámetros inmunológicos de inmunidad humoral y celular con la terapia GGIV vs No GGIV en los pacientes post-TOS con infección grave e HGG.

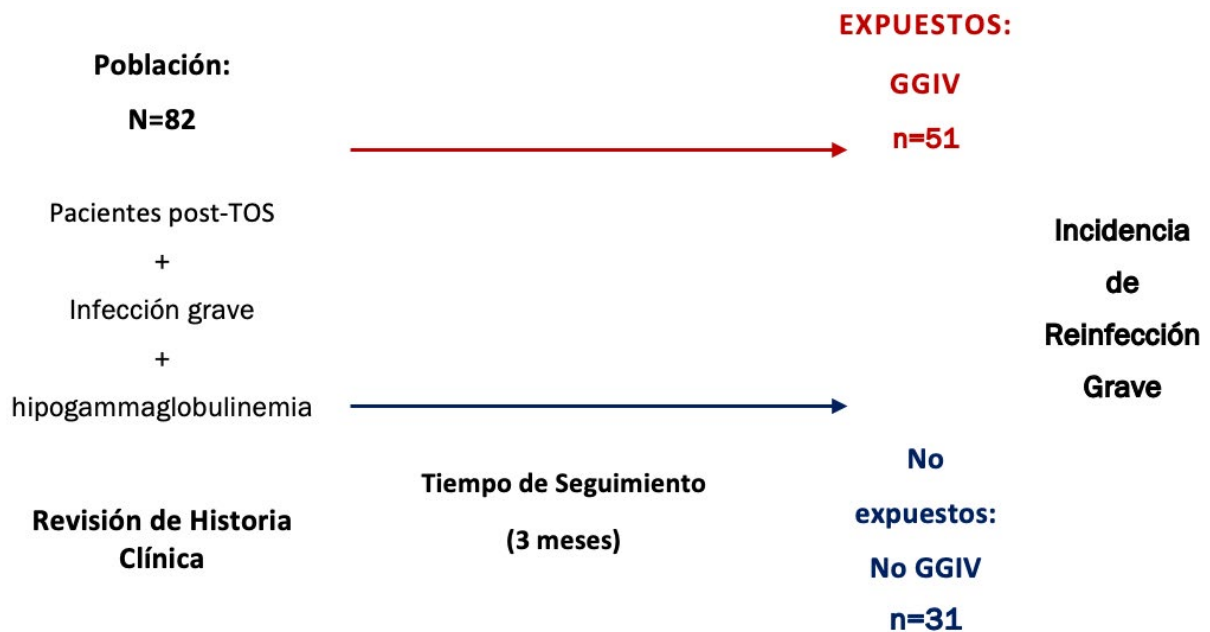
4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio de cohortes tipo retrospectivo. Se realizó el seguimiento en un período de 3 meses (Figura 4). Los participantes se asignaron a 2 grupos de la siguiente manera:

1. Cohorte grupo expuestos: Pacientes post-trasplantados de órgano sólido (cardíaco, hepático y renal) con hipogammaglobulinemia IgG (IgG<750 mg/dl) que presenten una reinfección grave y reciben infusión de GGIV adicional a la terapia antimicrobiana convencional.
2. Cohorte Grupo no expuestos: Pacientes post-trasplantados de órgano sólido (cardíaco, hepático y renal) con hipogammaglobulinemia IgG (IgG<750 mg/dl) que presenten una reinfección grave y no reciben infusión de GGIV (solo terapia antimicrobiana convencional (TAMC).

FIGURA 4. ESTUDIO DE INCIDENCIA DE REINFECCIÓN GRAVE EN COHORTES RETROSPECTIVO DE PACIENTES POST-TOS CON INFECCIÓN GRAVE E HGG EXPUESTOS O NO A LA TERAPIA CON GGIV



TOS: Trasplante de órgano sólido. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. n: número de pacientes.

4.3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los pacientes elegibles fueron personas entre 18 y 85 años con trasplante de órgano sólido bajo terapia inmunosupresora protocolizada que presentaron un episodio de infección severa documentada e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos IgG documentada durante la evaluación del evento infeccioso. Los pacientes fueron elegidos de un mismo centro, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM).

Otros criterios de inclusión fueron:

- El uso de terapia de inducción con anticuerpos monoclonales.
- La supervivencia de al menos un mes posterior al uso de GGIV adicional a TAMC o TAMC sola.

4.3.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables registradas fueron las demográficas, comorbilidades, parámetros hematológicos e inmunológicos, medicación profiláctica y terapéutica inmunosupresora relacionados al trasplante.

4.3.3.1 VARIABLE PRIMARIA

1. Incidencia de un nuevo episodio de reinfección grave en el periodo de 3 meses posterior a la terapia GGIV en el grupo de expuestos y posterior al diagnóstico de infección grave e hipogammaglobulinemia en el grupo de no expuestos, sin administración de GGIV, en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG.

4.3.3.2 VARIABLE SECUNDARIA

1. La reconstitución de IgG definida como niveles séricos de IgG >750 mg/dl, en el periodo de 3 meses posterior a la terapia GGIV en el grupo de expuestos y posterior al diagnóstico de hipogammaglobulinemia en el grupo de no expuestos, sin GGIV, en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG.
2. Reconstitución celular, factores del complemento y fenotipo linfocitario en el periodo de 3 meses posterior a la terapia GGIV en el grupo de expuestos y posterior al diagnóstico de hipogammaglobulinemia en el grupo de no expuestos, sin GGIV, en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG.

4.3.4 PERIODO DE ESTUDIO DE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

Se analizaron los parámetros inmunológicos de los pacientes post-TOS con infección grave e HGG distribuidos en los grupos con GGIV y No GGIV en dos puntos en el tiempo:

- Tiempo “PRE” o fecha previa a la terapia GGIV o fecha del diagnóstico de HGG en el grupo de No GGIV.
- Tiempo “POST” o a los 3 meses posteriores de la terapia GGIV o fecha del diagnóstico de HGG en el grupo de no expuestos.

4.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis con el programa informático SPSS. Para comprobar la distribución de normalidad se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las variables continuas fueron expresadas como media con desviación estándar (DE) o mediana y rango intercuartílico (RIQ). Las variables categóricas fueron expresadas en conteo absoluto y porcentaje. Se utilizó las pruebas de T-Student o de la U de Mann-Whitney según convenga para variables continuas y Chi-cuadrado para comparar variables categóricas. Para las comparaciones antes y después de muestras relacionadas se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se utilizó la p exacta de 2 colas y los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se realizó el análisis de supervivencia de Kaplan Meier considerando la fecha de administración de GGIV en la cohorte expuesta y tiempo similar en la cohorte no expuesta. Para minimizar el sesgo de selección se realizó regresión logística uni y multivariable.

4.3.6 ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo clínico fue aprobado por el comité de ética de investigación clínica (CEIC) del Instituto de investigación sanitaria Gregorio Marañón Los participantes del estudio dieron su consentimiento informado por escrito.

4.3.7 DEFINICIÓN DE EVENTO DE RE-INFECCIÓN GRAVE

La reinfección grave se definió como infección documentada (cultivo positivo y/o definición clínica), que requirió al menos una dosis de terapia antimicrobiana intravenosa posterior a la primera infusión de GGIV en los expuestos o HGG en los no expuestos. Los episodios infecciosos por citomegalovirus tratados con valganciclovir oral y las infecciones por *Clostridium difficile* tratadas por vía oral también se consideraron infecciones graves en este estudio.

La definición de primera infección en ambas cohortes siguió las mismas definiciones.

4.3.8 PROFILAXIS ANTIMICROBIANA

El protocolo de la medicación profiláctica de los pacientes trasplantados suele incluir, salvo excepciones por intolerancia, alergia u otros eventos adversos relacionados con la medicación, cefazolina 2gr IV 3 veces al día en el primer día posterior al trasplante; trimetoprim-sulfametoxazol 160/800 mg vía oral dos veces al día, 2 veces por semana durante el primer año; nistatina 500,000 UI vía oral tres veces por día durante el primer mes y norfloxacin 400 mg vía oral, cada 12 horas, durante el primer mes. Itraconazol suele indicarse en pacientes con algún riesgo de aspergilosis invasiva. En relación con la profilaxis CMV, el protocolo usado es híbrido, pues se utiliza una profilaxis seguida de terapia preventiva para mitigar los riesgos de la terapia anti-CMV. La profilaxis universal con ganciclovir IV o por valganciclovir por vía oral suele ser administrada a los receptores seropositivos en el período post-trasplante temprano de 14 días. La profilaxis frente a tuberculosis suele administrarse cuando está indicada. La inmunización previa a la cirugía suele incluir vacuna neumocócica y vacuna anti-hepatitis B (si está indicado). Los pacientes no suelen recibir vacunas neumocócicas adicionales posterior al trasplante.

4.3.9 TERAPIA INMUNOSUPRESORA

En el protocolo de la inmunosupresión en trasplantados cardíacos, los pacientes suelen recibir la terapia de inducción con el antagonista del receptor de la IL-2, Daclizumab o Basiliximab. La dosis de Daclizumab es de 1mg/Kg vía intravenosa, inicialmente dentro de las 24 horas previas al trasplante y la dosis siguiente a los 14 días, pudiendo añadir más dosis hasta 5 con el mismo intervalo de días. La dosis total estándar de Basiliximab es de 40 mg, administrada en dos dosis de 20 mg

cada una. La primera dosis de 20 mg suele ser administrada durante las dos horas previas al trasplante y la segunda dosis de 20 mg, 4 días después del trasplante. Tras la reconstitución suele ser administrada por inyección intravenosa en bolo o con una perfusión intravenosa. El Daclizumab o Basiliximab va en combinación con micofenolato mofetilo (1000mg IV o vía oral) y metilprednisolona (500 mg IV) en el período post-trasplante inmediato.

La inmunosupresión de mantenimiento incluye micofenolato de mofetilo, prednisona y ciclosporina o tacrolimus dependiendo de los efectos adversos.

En el trasplante hepático hasta el 2013, el protocolo de inmunosupresión en los pacientes trasplantados se basaba en la administración de basiliximab sólo a pacientes con factores de riesgo: insuficiencia renal pre-trasplante (FG menor de 60 ml/min/1,73 m² o creatinina sérica [Cr] mayor de 1,5 mg/dl), insuficiencia renal post-trasplante inmediato (primeras 48 horas) definida como oliguria menor de 0,5 ml/kg/h, FG menor de 60 ml/min/1,73 m² o elevación de Cr mayor de 1,5 mg/dl o en cirrosis con ascitis refractaria y desnutrición severa con presencia de insuficiencia renal pre-trasplante. En los pacientes que presentaban los factores de riesgo descritos, la dosis a administrar era de dos perfusiones de 20 mg el día del trasplante y 4 días post-trasplante. La segunda dosis se podía no administrar si el paciente en el cuarto día mantenía la función renal estable (FG mayor de 60 ml/min/1,73 m² o Cr menor de 1,2 mg/dl y diuresis mayor de 1 ml/kg/h).

Según el actual protocolo de inmunosupresión con administración universal del basiliximab vigente desde 2014, todos los pacientes recibirían una primera dosis de 20 mg el día del trasplante y una segunda dosis de 20 mg el cuarto día post-trasplante, que se individualiza según las características basales del paciente y su evolución clínica. La introducción del anti-calcineurínico se indica entre el quinto y el séptimo día en los que hayan recibido las dos dosis y el tercero o cuarto día si sólo han recibido una dosis.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 PACIENTES

Se eligieron 82 pacientes trasplantados de órgano sólido con HGG e infección severa distribuidos a 51 expuestos en el grupo GGIV y a 31 no expuestos en el grupo No GGIV. De los pacientes trasplantados 58 fueron cardíacos, 11 hepáticos y 13 renales (TABLA 9). Tras elegir los pacientes, se codificaron para la revisión de historia clínica, obtención de datos y análisis posterior.

TABLA 9. Nº DE PACIENTES POR TRASPLANTE EN LOS GRUPOS GGIV Y NO GGIV

Trasplante	Expuestos GGIV	No expuestos No GGIV
Cardíaco	36	22
Hepático	8	3
Renal	7	6
Total	51	31
TOTAL: 82 participantes		

GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

Para eludir el sesgo de selección, los controles fueron seleccionados en base al tipo de trasplante y edad.

Los pacientes presentaron los siguientes niveles de IgG en el punto pre, antes de la infusión de GGIV o diagnóstico de HGG en los no expuestos. Tabla 10.

De los 82 pacientes, el 83% presentaron niveles de IgG <600 mg/dl. Un 11% del total de pacientes estudiados presentaron niveles de IgG entre 600 y 650 mg/dl. El 5% de los pacientes presentaron niveles de IgG entre 650 y 750 mg/dl. Finalmente, 1 paciente, el 1% del total presentó un nivel pre de IgG de 722 mg/dl.

TABLA 10 Nº DE PACIENTES (%) POR NIVELES SÉRICOS INICIALES (PRE) DE IGG EN LOS PACIENTES DE LOS GRUPOS GGIV Y NO GGIV

Niveles IgG	GGIV	No GGIV	Total
<600mg/dl	45	23	68(83)
600-750 mg/dl	6	8	14(17)
Total, pacientes	n=51	n=31	82(100)

GGIV: Gammaglobulina. n=número de pacientes.

En la Tabla 11, se presenta los niveles de IgG por trasplante en cada grupo de exposición GGIV y No GGIV observándose que la mayoría de los pacientes presentan niveles de IgG <600 mg/dl.

TABLA 11. Nº DE PACIENTES (%) CON NIVELES SÉRICOS INICIALES (PRE) DE IGG POR TRASPLANTE EN LOS GRUPOS GGIV Y NO GGIV

Tipo de trasplante	Niveles IgG	GGIV	No GGIV	Total
Cardíaco	<600mg/dl	33	15	48(83)
	600-750 mg/dl	3	7	10(17)
	TOTAL, Cardíacos			58(100)
Hepático	<600mg/dl	6	3	9(82)
	600-750 mg/dl	2		2(18)
	TOTAL, Hepáticos			11(100)
Renal	<600mg/dl	6	5	11(85)
	600-750 mg/dl	1	1	2(15)
	TOTAL, Renales			13(100)

4.4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Fueron 31 pacientes del grupo No GGIV seleccionados con una edad media de 61 años (DE±10) mientras que en el grupo GGIV de 51 pacientes, la edad media fue 62 años (DE±17). En el grupo GGIV el sexo masculino fue de 64.7% de los pacientes mientras que en el grupo de No GGIV fue de 74.2%.

Considerando las comorbilidades, el antecedente registrado en la historia clínica cardiológica más prevalente en ambos grupos fue la dislipidemia, tanto para GGIV con el 43.1% de los trasplantados y sin GGIV el 61.3%. No hubo diferencias significativas entre la frecuencia de falla renal pre-trasplante, Hipertensión arterial (HTA), Diabetes Mellitus (DM) pre-tratada y la obesidad de los grupos GGIV y No GGIV (TABLA 12).

TABLA 12. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=51	No GGIV n=31	Valor p
Edad, media ± DE	62 ± 17	61 ± 10	0.253
Sexo, % masculino	64.7	74.2	0.177
Insuficiencia renal pre-trasplante %	35.3	48.4	0.241
Diabetes mellitus pre-tratada %	27.5	25.8	0.286
HTA %	29.4	32.4	0.424
Obesidad %	15.7	19.4	0.791
Dislipidemia	43.1	61.3	0.755

Se utiliza la prueba T-Student para variable cuantitativas y Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan en medias con desviación estándar (\pm DE) y porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.3 USO PREVIO DE PROFILAXIS ANTIMICROBIANA

Comparando los grupos por la medicación antimicrobiana profiláctica protocolizada observamos la profilaxis con valganciclovir en el 27.5% de los pacientes del grupo GGIV y en el 51.6% del grupo No GGIV con diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0.035$). Sin embargo, el 51% y 54.8% de los grupos con GGIV y sin GGIV respectivamente, usaron la profilaxis con ganciclovir. Además, se observa que en el 62% de los pacientes trasplantados del grupo con GGIV y en el 48.4% de los pacientes del grupo No GGIV recibieron la terapia profiláctica con cefalosporina. La profilaxis con norfloxacin se observó en el 29.4% y 48.4% de los pacientes con GGIV y sin GGIV respectivamente. (TABLA 13)

TABLA 13. TERAPIA ANTIMICROBIANA PROFILÁCTICA RECIBIDO POR LOS PACIENTES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV n=51	No GGIV n=31	Valor p
Profilaxis valganciclovir %	27.5	51.6	0.035
Profilaxis ganciclovir, %	51	54.8	0.821
Profilaxis cefalosporina, %	61	74.2	0.242
Profilaxis norfloxacin %	29.4	48.4	0.101

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.4 USO DE TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN

El uso de terapia de inducción inmunosupresora con basiliximab se observó en el 64.7% de los pacientes del grupo GGIV y en el 74.2% de los pacientes en el grupo No GGIV. La inducción con timoglobulina se observa en el 9.8% de los pacientes que recibieron GGIV mientras que ninguno de los pacientes del grupo de No GGIV lo recibieron como profilaxis. (TABLA 14)

TABLA 14. TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN RECIBIDO POR LOS PACIENTES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV n=51	No GGIV n=31	Valor p
Inmunosupresión de inducción de basiliximab, %	64.7	74.2	0.466
Inducción de timoglobulina %	9.8	0	

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5 CARACTERÍSTICAS POR TIPO DE TRASPLANTE

4.4.5.1 POR TRASPLANTE CARDÍACO

4.4.5.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

De 58 pacientes post trasplantados cardíacos con infección severa e HGG, se distribuyeron 36 pacientes en el grupo de GGIV y 22 pacientes en el grupo de No GGIV. La edad media fue similar en ambos grupos. El sexo masculino fue prevalente en ambos grupos.

Considerando las comorbilidades, la dislipidemia fue la más prevalente en ambos grupos, con 50% de los pacientes en el grupo GGIV y el 72% de los pacientes en el grupo No GGIV. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de falla renal pre-trasplante, HTA, DM pre-tratada y la obesidad de los grupos GGIV y No GGIV. TABLA 15.

TABLA 15. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=36	No GGIV n=22	Valor p
Edad, media ± DE	60.55±17.6	60.1±10.5	0.912
Sexo % masculino	63.9	68.2	0.783
Insuficiencia renal pre-trasplante %	30.6	40.9	0.570
Diabetes mellitus pre-tratada %	27.8	27.3	1.00
HTA %	25	22.7	1.00
Obesidad %	16.7	27.3	0.505
Dislipidemia %	50	72.7	0.106

Se utiliza la prueba T-Student para variable cuantitativas y Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan en medias con desviación estándar (± DE) y porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.1.2 USO PREVIO DE PROFILAXIS ANTIMICROBIANA

En los pacientes trasplantados cardíacos observamos que la medicación antimicrobiana profiláctica protocolizada como el uso profiláctico de valganciclovir se encuentra solo en el 33.3% de los pacientes del grupo GGIV mientras que en el 59.1% de los pacientes del grupo No GGIV si la recibieron ($p=0.063$). No hubo diferencias significativas del uso profiláctico de ganciclovir, cefalosporina, norfloxacin entre los grupos con GGIV y sin GGIV. (TABLA 16)

TABLA 16. TERAPIA ANTIMICROBIANA PROFILÁCTICA RECIBIDO POR LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=36	No GGIV n=22	Valor p
Profilaxis valganciclovir %	33.3	59.1	0.063
Profilaxis ganciclovir, %	63.9	77.3	0.430
Profilaxis cefalosporina, %	66.7	81.8	0.441
Profilaxis norfloxacin %	41.7	63.6	0.175

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.1.3 USO DE TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN

El uso de terapia de inducción inmunosupresora con basiliximab se observó en el 61.1% de los pacientes del grupo GGIV y en el 77.3% de los pacientes en el grupo No GGIV, sin diferencia estadística. La inducción con timoglobulina se observa en el 8.3% de los pacientes que recibieron GGIV mientras que ninguno de los pacientes del grupo de No GGIV lo recibieron como profilaxis. (TABLA 17)

TABLA 17. TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN RECIBIDO POR LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=36	No GGIV n=22	Valor p
Terapia de inducción con basiliximab, %	61.1	77.3	0.522
Inducción de timoglobulina %	8.3		

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.2 POR TRASPLANTE HEPÁTICO

4.4.5.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

De 11 pacientes post trasplantados hepáticos, se distribuyeron 8 en el grupo de GGIV y 3 en el grupo de No GGIV. No hubo diferencias estadísticamente significativas para la edad media, el porcentaje del sexo masculino, las comorbilidades de DM-pre-tratada entre los grupos con GGIV y No GGIV. No se encontró antecedentes de dislipidemia en los registros históricos de ambos grupos. Se observa pacientes post trasplantados hepáticos con antecedente de falla renal pre-trasplante y obesidad en el grupo de GGIV mientras que no se observa ningún paciente en el grupo No GGIV. Además, en el grupo de GGIV no se observan con antecedentes de HTA a diferencia del grupo No GGIV. (TABLA 18)

TABLA 18. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=8	No GGIV n=3	Valor p
Edad, media ± DE	64.12±11.6	65.5±4.4	0.854
Sexo, % masculino	62.5	66.7	1.00
Falla renal pre-trasplante %	12.5	0	
Diabetes mellitus pre tratada %	12.5	33.3	1.00
HTA %	0	33.3	0.273
Obesidad	12.5	0	
Dislipidemia %	0	0	

Se utiliza la prueba T-Student para variable cuantitativas y Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan en medias con desviación estándar (\pm DE) y porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.2.2 USO PREVIO DE PROFILAXIS ANTIMICROBIANA

Comparando los grupos por la medicación antimicrobiana profiláctica protocolizada observamos el uso profiláctico de ganciclovir en el 25% de los pacientes en el grupo GGIV mientras que en el grupo de No GGIV no recibieron la medicación. Por otro lado, la profilaxis con norfloxacina se observó en el 33.3% de los pacientes trasplantados hepáticos en el grupo sin GGIV mientras que los pacientes con GGIV no recibieron la quinolona profiláctica.

No se encontró en los registros profilaxis con valganciclovir ni cefalosporina recibida. (TABLA 19)

TABLA 19. TERAPIA ANTIMICROBIANA PROFILÁCTICA RECIBIDO POR LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=8	No GGIV n=3	Valor p
Profilaxis valganciclovir %	0	0	
Profilaxis ganciclovir, %	25	0	
Profilaxis cefalosporina, %	0	0	
Profilaxis norfloxacina %	0	33.3	

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa

4.4.5.2.3 USO DE TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN

El uso de terapia de inducción inmunosupresora con basiliximab se observó en el 62.5% y 66.7% de los pacientes trasplantados hepáticos de los grupos con GGIV y sin GGIV respectivamente. (TABLA 20)

TABLA 20. TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN RECIBIDO POR LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=8	No GGIV n=3	Valor p
Terapia de inducción con basiliximab, %	62.5	66.7	0.453

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.3 POR TRASPLANTE RENAL

4.4.5.3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

De 13 pacientes post trasplantados renales, se distribuyeron 7 en el grupo de GGIV y 6 en el grupo de No GGIV. No hubo diferencias en la edad media y el porcentaje del sexo masculino en ambos grupos de GGIV y No GGIV. Considerando las comorbilidades, la falla renal pre-trasplante fue la más prevalente en ambos grupos. Tampoco hubo diferencias entre las comorbilidades de HTA, dislipidemia y DM pre-tratada entre los grupos con GGIV y sin GGIV. Finalmente, el 14.3% de los pacientes trasplantados que recibieron GGIV presentó obesidad y ningún paciente en el grupo No GGIV. (TABLA 21).

TABLA 21. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=7	No GGIV n=6	Valor p
Edad, media \pm DE	69.7 \pm 15.9	64.38 \pm 8.8	0.912
Género, % masculino	71.4	83.3	1.00
Falla renal pre-trasplante %	100	100	
Diabetes mellitus pre tratada %	42.9	16.7	0.559
HTA %	85.7	66.7	0.559
Obesidad %	14.3	0	
Dislipidemia %	57.1	50	1.00

Se utiliza la prueba T-Student para variable cuantitativas y Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan en medias con desviación estándar (\pm DE) y porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.3.2 USO PREVIO DE PROFILAXIS ANTIMICROBIANA

Analizando los grupos por la medicación antimicrobiana profiláctica protocolizada observamos que tanto para el uso profiláctico de valganciclovir como de cefalosporina no hubo diferencias significativas entre los grupos GGIV y No GGIV. La profilaxis con ganciclovir se observa en el 14.3% de los pacientes del grupo GGIV, sin embargo, los pacientes del grupo GGIV no lo recibieron. Ningún paciente recibió norfloxacina profiláctica. (TABLA 22)

TABLA 22. TERAPIA ANTIMICROBIANA PROFILÁCTICA RECIBIDO POR LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=7	No GGIV n=6	Valor p
Profilaxis valganciclovir %	28.6	50	1.00
Profilaxis ganciclovir, %	14.3	0	
Profilaxis cefalosporina, %	100	83.3	0.774
Profilaxis norfloxacina %	0	0	

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.5.3.3 USO DE TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN

El uso de terapia de inducción inmunosupresora con basiliximab se observó en el 85.7% y 66.7% en los grupos con GGIV y No GGIV respectivamente. Finalmente, el 28.6% del grupo GGIV recibió la inducción de timoglobulina y ningún paciente del grupo de No GGIV la recibió. (TABLA 23)

TABLA 23. TERAPIA INMUNOSUPRESORA DE INDUCCIÓN RECIBIDO POR LOS PACIENTES POST-TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Variable	GGIV n=7	No GGIV n=6	Valor p
Terapia de inducción con basiliximab, %	85.7	66.7	0.754
Inducción de timoglobulina %	28.6	0	

Se utiliza la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores se expresan porcentaje (%). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.6 PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

4.4.6.1 PARÁMETROS CELULARES

En la TABLA 24 se presenta una comparación de los parámetros inmunológicos de los pacientes post trasplantados en cada punto de estudio en el intervalo de 3 meses; el primer punto, el tiempo denominado pre y en el segundo punto, a los 3 meses posteriores de la infusión de GGIV en el grupo de expuestos o diagnóstico de HGG en el grupo de no expuestos.

Se observa en la TABLA 24, en el punto pre, un nivel menor de linfocitos totales en el grupo que recibió GGIV en comparación con los que no recibieron, mediana (RIQ) 500 (200-975) vs. 800 (350-1300), $p=0,052$ y a los 3 meses posteriores, los niveles de linfocitos totales aumentaron en ambos grupos estudiados con diferencia estadísticamente significativa entre ellos, mediana (RIQ) 950 (500-1325) vs. 1250 (900-2075), $p=0.019$. También podemos observar que la cifra de monocitos/ mm^3 es menor en el grupo de GGIV en comparación con el grupo de No GGIV, mediana (RIQ) 400 (200-600) vs. 500 (300-850), $p=0.056$.

TABLA 24. PARÁMETROS CELULARES DEL TOTAL DE PACIENTES TRASPLANTADOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV n=51		No GGIV n=31		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
Linfocitos Totales/ mm^3	Pre	500	200-975	800	350-1300	0.052
	3 m	950	500-1325	1250	900-2075	0.018
Neutrófilos/ mm^3	Pre	3800	1100-7100	5800	2250-8675	0.169
	3 m	2650	1575-3825	3100	2375-4300	0.217
Monocitos/ mm^3	Pre	400	200-600	500	300-850	0.056
	3 m	500	300-600	500	325-700	0.483

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.6.2 PARÁMETROS DEL COMPLEMENTO

Considerando el sistema del complemento, en el punto, pre, se observa un valor menor de C3, aunque no significativo en el grupo que recibió GGIV en comparación con los que no recibieron GGIV, mediana (RIQ) 77.5 (62.8- 98.8) vs. 91.4 (74.4 – 123.3), $p=0.073$. (TABLA 25)

TABLA 25. FACTORES DEL COMPLEMENTO DEL TOTAL DE PACIENTES TRASPLANTADOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV n=51		No GGIV n=31		Valor p	
	mediana	RIQ	mediana	RIQ		
C3	Pre	77.5	62.8- 98.8	91.4	74.4 – 123.3	0.074
	3 m	101.5	83.8- 119.5	107.5	76.4- 118.8	0.862
C4	Pre	18.1	13.7-25.5	21.2	17.2- 28.8	0.175
	3 m	24.9	16.8- 27.7	26.3	17.1- 31.9	0.416

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

4.4.6.3 FENOTIPO TBNK

En la TABLA 26, se realiza la comparación de la distribución de las subpoblaciones TBNK de los pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG en los dos puntos estudiados, pre y a los 3 meses posteriores a la infusión de GGIV o diagnóstico de HGG.

En la TABLA 26 observamos en el primer punto, pre, un nivel menor significativo del conteo absoluto de CD3 en el grupo expuesto a GGIV en comparación a los no expuestos, mediana (RIQ) 300 (137.8-640) vs. 775.5(383-1045.5), $p=0,001$. También, para el conteo absoluto de CD4 en el punto pre encontramos una disminución significativa en el grupo de GGIV en comparación del grupo No GGIV, mediana (RIQ) 191.5 (81.5-356.8) vs. 473.5 (240.8-718.8), $p=0,001$ y para CD8 de forma similar, mediana (RIQ) 79.5 (47.8- 212.8) vs. 252(125.8- 455.8), $p=0,001$. Además, los valores absolutos de NK en el punto pre del grupo de GGIV fue menor significativamente en comparación con el grupo No GGIV, mediana (RIQ) 300 (137.8-640) vs. 775.5(383-1045.5), $p=0,001$.

TABLA 26. FENOTIPO LINFOCITARIO DEL TOTAL DE PACIENTES TRASPLANTADOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	Valor absoluto	GGIV n=51		No GGIV n=31		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
LT CD3+	Pre	300.5	137.8 - 640	775.5	383-1045.5	0.001
	3 m	1009	514-1137.3	1459	794.3–2082.5	0.123
LT CD4+	Pre	191.5	81.5-356.8	473.5	240.8-718.8	0.001
	3 m	604.5	206.3-683	876.5	403.3- 1421.5	0.108
LT CD8+	Pre	79.5	47.8- 212.8	252	125.8- 455.8	0.001
	3 m	274.5	156.3-449.3	436.5	322.3-752	0.061
NK	Pre	30.5	17.3-72.3	75	31-133.25	0.009
	3 m	88.5	51-132.3	139.5	69.3-299.5	0.287
LT CD19+	Pre	85.5	51.3-136	117	55-357	0.078
	3 m	59	29.5-86.8	75	42.5-276.5	0.485

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.6.4 COMPARACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

En la TABLA 27 se muestra la reconstitución de parámetros inmunológicos en el periodo de estudio de 3 meses, entre los valores Pre y a los 3 meses posteriores a la infusión de GGIV o diagnóstico de HGG en los pacientes del grupo No GGIV.

Analizando los valores del grupo GGIV se observa un aumento significativo para los parámetros de C3,pre, mediana (RIQ) 77.5 (62.8- 98.8) vs. 3m,101.5(83.8- 119.5), $p=0,01$; C4,pre, mediana (RIQ) 18.1 (13.7-25.5) vs. 3m, 24.9(16.8- 27.7), $p=0,005$; linfocitos totales/mm³,pre, mediana (RIQ) 500 (200-975) vs. 3m, 950 (500-1325), $p=0.005$; CD3,pre, mediana (RIQ) 300.5(137.8 – 640) vs. 3m, 1009 (514-1137.3), $p=0.020$; CD4,pre: mediana (RIQ) 191.5 (81.5-356.8) vs. 3m, 604.5(206.3-683), $p=0.005$; CD8, pre, mediana (RIQ) 79.5 (47.8- 212.8) vs. 3m, 274.5 (156.3-449.3), $p=0.015$; y NK, pre, mediana (RIQ) 30.5 (17.3-72.3) vs. 3m, 88.5 (51-132.3), $p=0,012$.

En el grupo No GGIV se observa aumento de los valores absolutos de linfocitos a los 3 meses posteriores al diagnóstico de HGG, pre, mediana (RIQ) 800 (350-1300) vs. 3m,1250 (900-2075), $p=0,05$.

TABLA 27. RECONSTITUCIÓN DE PARÁMETROS CELULARES, FACTORES DEL COMPLEMENTO Y FENOTIPO LINFOCITARIO DEL TOTAL DE PACIENTES TRASPLANTADOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV n=51			No GGIV n=31		
	Mediana (RIQ)	pre	3 m	Valor p	pre	3 m
Linfocitos Totales /mm ³	500 (200-975)	950 (500-1325)	0.005	800 (350-1300)	1250 (900-2075)	0.05
C3	77.5 (62.8- 98.8)	101.5 (83.8- 119.5)	0.01	91.4 (74.4 – 123.3)	107.5 (76.4- 118.8)	0.233
C4	18.1 (13.7-25.5)	24.9 (16.8- 27.7)	0.005	21.2 (17.2- 28.8)	26.3 (17.1- 31.9)	0.807
LT CD3+	300.5 (137.8 – 640)	1009 (514-1137.3)	0.020	775.5 (383-1045.5)	1459 (794.3–2082.5)	0.063
LT CD4+	191.5 (81.5-356.8)	604.5 (206.3-683)	0.005	473.5 (240.8-718.8)	876.5 (403.3- 1421.5)	0.063
LT CD8+	79.5 (47.8- 212.8)	274.5 (156.3-449.3)	0.015	252 (125.8- 455.8)	436.5 (322.3-752)	0.188
NK	30.5 (17.3-72.3)	88.5 (51-132.3)	0.012	75 (31-133.25)	139.5 (69.3-299.5)	0.063

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

4.4.7 PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS POR TIPO DE TRASPLANTE

4.4.7.1 POR TRASPLANTE CARDÍACO

4.4.7.1.1 PARÁMETROS CELULARES

En la TABLA 28 se presenta una comparación de los parámetros inmunológicos de los pacientes trasplantados cardíacos estudiados en dos puntos, en el primer punto en el tiempo denominado pre y a los 3 meses posteriores de la infusión de GGIV en el grupo de expuestos o diagnóstico de HGG en el grupo no expuestos.

En el primer punto, pre, se observa un nivel menor de linfocitos totales en el grupo que recibió GGIV en comparación con los que no recibieron, mediana (RIQ) 500 (200-975) vs. 900 (400-1300),

p=0,05, y a los 3 meses posteriores, los niveles de linfocitos totales aumentaron en ambos grupos estudiados, aunque mantuvieron una diferencia significativa, GGIV: mediana (RIQ) 1000 (400-1400) vs. 1500 (900-2400), p=0.017.

TABLA 28. PARÁMETROS CELULARES DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV n=36		No GGIV n=22		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
Linfocitos Totales/mm ³	pre	500	(200-975)	900	(400-1300)	0.050
	3 m	1000	(400-1400)	1500	(900-2400)	0.017
Neutrófilos/mm ³	pre	4500	(1400-7200)	5000	(2250-8325)	0.468
	3 m	2800	(1500-4200)	3100	(2300-4000)	0.326
Monocitos/mm ³	pre	400	(200-700)	500	(300-800)	0.251
	3 m	400	(300-600)	500	(300-700)	0.362

Los valores son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney. p<0.05 se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.7.1.2 FACTORES DEL COMPLEMENTO

Considerando el sistema del complemento, en el primer punto, pre, se observa un valor menor significativo de C3 en el grupo que recibió GGIV en comparación con los que no recibieron, mediana (RIQ) 77.38 (60.8- 99.9) vs. 91.6 (76.75 – 124.5), p=0.038 y a los 3 meses los valores se normalizaron en el grupo de GGIV sin diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo de No GGIV. (TABLA 29)

TABLA 29. FACTORES DEL COMPLEMENTO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV n=51		No GGIV n=31		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
C3	pre	77.382	(60.85-99.9)	91.6	(76.75-124.5)	0.038
	3 m	95	(83.25-116)	112	(74.8-119)	0.986
C4	pre	18.15	(14.5- 26)	23	(19.25-29.15)	0.115
	3 m	24.6	(16.78-27.7)	26.7	(16.1-31.2)	0.624

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). p<0.05 se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

4.4.7.1.3 FENOTIPO TBNK

La comparación de la distribución de las subpoblaciones TBNK de los pacientes trasplantados cardíacos expuestos a GGIV y No GGIV en 2 puntos, pre y 3 meses posteriores de la infusión de GGIV o HGG según el grupo de exposición se presenta en la TABLA 30.

En la TABLA 30 observamos en el primer punto, PRE, un nivel menor significativo del conteo absoluto de CD3 en el grupo expuesto a GGIV en comparación a los no expuestos, mediana (RIQ) 279.5 (143.25-663) vs. 775.5(357-998-75), $p=0,004$ y a los 3 meses posteriores, el conteo absoluto de CD3 aumentaron en ambos grupos estudiados, aunque permanecía la diferencia significativa entre ellos, mediana (RIQ) 1007 (429.5-1125.5) vs. 1895 (927-2087), $p=0.048$. También, en el punto pre encontramos una disminución significativa en el grupo de GGIV en comparación del grupo No GGIV tanto para el conteo absoluto de CD4, mediana (RIQ) 181 (82.5-479.5) vs. 473.5 (188.5-693), $p=0,014$, como para CD8, mediana (RIQ) 72 (49.3-208.8) vs. 250 (132.8-338), $p=0,002$. A los 3 meses posteriores de la exposición, el conteo absoluto de CD4 y CD8 aumentaron en ambos grupos de exposición, aunque permaneció la diferencia significativa para CD4, mediana (RIQ) 599 (175-724.5) vs. 1033 (592.5-1474), $p=0,039$, como para CD8, mediana (RIQ) 258 (147-431) vs. 445 (321.5-782), $p=0,046$.

TABLA 30. FENOTIPO LINFOCITARIO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV		No GGIV		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
LT CD3+	pre	279.5	(143.25-663)	775.5	(357-998-75)	0.004
	3 m	1007	(429.5-1125.5)	1895	(927-2087)	0.048
LT CD4+	pre	181	(82.5-479.5)	473.5	(188.5-693)	0.014
	3 m	599	(175-724.5)	1033	(592.5-1474)	0.039
LT CD8+	pre	72	(49.3-208.8)	250	(132.8-338)	0.002
	3 m	258	(147-431)	445	(321.5-782)	0.046
NK	pre	30.5	(15.75-79.75)	62	(25.75-133.75)	0.090
	3 m	70	(51-130)	113	(55.5-268)	0.436
LT CD19+	pre	86	(52-142)	133	(83-309)	0.083
	3 m	69	(29-88)	75	(42.5-276.5)	0.541

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.7.1.4 COMPARACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN LOS TRASPLANTADOS CARDÍACOS

En la TABLA 31 se observa la reconstitución de parámetros inmunológicos en el periodo de estudio de 3 meses, entre los valores Pre y a los 3 meses posteriores a la infusión de GGIV o diagnóstico de HGG en los pacientes post-TOS estudiados de ambos grupos, con GGIV y No GGIV.

Analizando los valores del grupo GGIV se observa un aumento significativo para los parámetros de linfocitos totales, pre: mediana (RIQ) 500 (200-700) vs. 3m: 1000(400-1400), $p=0,003$. En el grupo no expuesto se encuentra un aumento no significativo para los linfocitos totales, pre: mediana (RIQ) 900 (400-1300) vs. 3m: 1500(900-2400), $p=0,071$. TABLA 31

Analizando los valores del grupo GGIV se observa un aumento significativo para los parámetros CD4, pre, mediana (RIQ) 181 (82.5-479.5) vs. 3m: 599 (175-724.5), $p=0.018$; CD8, pre, mediana (RIQ) 72 (49.25- 208.75) vs. 3m: 258 (147-431), $p=0.043$ y NK, pre, mediana (RIQ) 30.5 (15.75- 79.75) vs. 3m: 70 (51-130), $p=0,020$. En el grupo de No GGIV no se observa aumento significativo del fenotipo TBNK. TABLA 32.

TABLA 31. RECONSTITUCIÓN DE PARÁMETROS CELULARES Y FACTORES DEL COMPLEMENTO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV			NO GGIV		
	mediana (RIQ)	pre	3m	Valor p	pre	3 m
Linfocitos totales /mm ³	500 (200-700)	1000 (400-1400)	0.003	900 (400-1300)	1500 (900-2400)	0.071
Neutrófilos / mm ³	4500 (1400-7200)	2800 (1500-4200)	0.103	5500 (2250-8325)	3100 (2300-4000)	0.241
Monocitos / mm ³	400 (200-700)	400 (300-600)	0.389	500 (300-800)	500 (300-700)	0.829
C3	77.38 (60.85-99.9)	95 (83.25-116)	0.093	91.6 (76.75-124.5)	112 (74.8-119)	0.109
C4	18.15 (14.475-26.025)	24.6 (16.8-27.7)	0.056	23 (19.25-29.15)	26.7 (16.1-31.2)	0.578

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

TABLA 32. RECONSTITUCIÓN DEL FENOTIPO LINFOCITARIO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS EN LOS GRUPOS GGIV Y NO GGIV

Parámetro	GGIV			No GGIV		
	Mediana (RIQ)	pre	3 m	Valor p	pre	3 m
LT CD3+	279.5 (143.25-663)	1007 (429.5-1125.5)	0.058	775.5 (357-998.75)	1895 (927-2087)	0.063
LT CD4+	181 (82.5-479.5)	599 (175-724.5)	0.018	473.5 (188.5-693)	1033 (592.5-1474)	0.063
LT CD8+	72 (49.25-208.75)	258 (147-431)	0.043	250 (132.75-338)	445 (321.5-782)	0.188
NK	30.5 (15.75-79.75)	70 (51-130)	0.020	62 (25.75-133.75)	113 (55.5-268)	0.063
LT CD19+	86 (52-142)	69 (29-88)	0.235	133 (83-309)	75 (42.5-276.5)	0.438

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.7.2 POR TRASPLANTE HEPÁTICO

4.4.7.2.1 PARÁMETROS CELULARES

En la TABLA 33 se presenta una comparación de los parámetros inmunológicos de los pacientes trasplantados hepáticos en los dos grupos de exposición, con GGIV y sin GGIV, en el primer punto pre y a los 3 meses posteriores de la infusión de GGIV en el grupo de expuestos o del diagnóstico de HGG en el grupo de no expuestos.

En el primer punto, pre, se observa un nivel menor de monocitos totales en el grupo que recibió GGIV en comparación con los que no recibieron, mediana (RIQ) 281 (125-375) vs. 600 (500-1900), $p=0,030$ y a los 3 meses posteriores, los niveles de linfocitos totales aumentaron en ambos grupos sin diferencia significativa.

TABLA 33. PARÁMETROS CELULARES DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV n=8		No GGIV n=3		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
Linfocitos Totales/mm ³	pre	550	(225-975)	800	(200-2600)	0.661
	3 m	650	(475-1150)	1000	(675-1300)	0.464
Neutrófilos/mm ³	pre	2315.5	(550-4300)	8900	(3100-15200)	0.133
	3 m	2050	(1450-2300)	3850	(2335-3925)	0.071
Monocitos/mm ³	pre	281	(125-375)	600	(500-1900)	0.030
	3 m	500	(200-725)	450	(225-925)	1.00

Los valores son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.7.2.2 FACTORES DEL COMPLEMENTO

Considerando los factores del complemento, en los trasplantados hepáticos no se observaron diferencias significativas entre los grupos GGIV y No GGIV en los puntos pre y a los 3 meses posteriores a la infusión de GGIV o HGG en el grupo de no expuestos. (TABLA 34)

TABLA 34. FACTORES DE COMPLEMENTO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV n=8		No GGIV n=3		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
C3	pre	72.55	(52.3-112.83)	50.3	(49.3-74.4)	0.381
	3 m	83.9	(39.4-97)	90.45	(50.53-	0.500
C4	pre	10.75	(7.6-21.6)	10.5	(9-15)	0.905
	3 m	10.3	(7.8-21)	15.65	(8.4-24.1)	0.500

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

4.4.7.2.3 FENOTIPO TBNK

La comparación de la distribución de las subpoblaciones TBNK de los pacientes trasplantados hepáticos expuestos a GGIV y No GGIV en 2 puntos, pre y 3 meses posteriores de la infusión de GGIV o HGG según el grupo de exposición se presenta en la TABLA 35.

En la TABLA 35 observamos en el primer punto, pre, un nivel menor del conteo absoluto de CD4 en el grupo expuesto a GGIV en comparación a los no expuestos, mediana (RIQ) 251 (63-313) vs. 807.5(282-993), $p=0,056$. Los valores del primer punto pre, se observa disminución del conteo absoluto NK en el grupo de GGIV en comparación con los no expuestos, mediana (RIQ) 29 (12-50) vs. 75 (54.75-61.5), $p=0,056$. No se encontraron los valores de algunos parámetros inmunológicos en los registros históricos a los 3 meses posteriores de la GGIV o HGG.

TABLA 35. FENOTIPO LINFOCITARIO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV n=8		No GGIV n=3		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
LT CD3+	pre	452	(92-771)	1108.5	(357-1309.5)	0.333
	3 m	850.5	(390-891)	NA		
LT CD4+	pre	251	(63-313)	807.5	(282-933)	0.056
	3 m	452	(209.3-474)	NA		
LT CD8+	pre	130	(37-447)	271	(73.5-336.75)	0.889
	3 m	380.5	(169.5-406.5)	NA		
NK	pre	29	(12-50)	75	(54.75-61.5)	0.056
	3 m	NA		NA		
LT CD19+	pre	93.5	(51.5-166)	486	(363-369.8)	0.071
	3 m	NA		NA		

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango intercuartílico (RIQ). $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gamma globulina intravenosa. NA: no existe en el registro histórico.

4.4.7.2.4 COMPARACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN LOS TRASPLANTADOS HEPÁTICOS

En relación con la reconstitución de parámetros inmunológicos de los trasplantados hepáticos, en el grupo de No GGIV no se encontraron registros de los valores del complemento C3 y C4 en el segundo punto, 3 meses posteriores a la infusión de GGIV o al diagnóstico de HGG. Para los demás parámetros no se observan diferencias significativas en ambos grupos con GGIV y No GGIV. (TABLA 36)

En los registros históricos no se encontraron, los parámetros del fenotipo TBNK para los trasplantados hepáticos en el segundo punto, 3 meses posteriores, en el grupo de GGIV para los valores de NK y CD19. En el grupo de no GGIV tampoco se encontraron los datos en el segundo punto de estudio. (TABLA 37)

TABLA 36. RECONSTITUCIÓN DE PARÁMETROS CELULARES Y FACTORES DE COMPLEMENTO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro mediana (RIQ)	GGIV			No GGIV		
	pre	3 m	Valor p	pre	3 m	Valor p
Linfocitos Totales /mm³	550 (225-975)	650 (475-1150)	0.750	800 (200-2600)	1000 (675-1300)	1.00
Neutrófilos / mm³	2315.5 (550-4300)	2050 (1450-2300)	0.563	8900 (3100-15200)	3850 (2335-3925)	1.00
Monocitos / mm³	281 (125-375)	500 (200-725)	0.250	600 (500-1900)	450 (225-925)	1.00
C3	72.55 (52.3-112.83)	83.9 (39.4-97)	1.00	50.3 (49.3-74.4)	NA	
C4	10.75 (7.6-21.6)	10.3 (7.8-21)	1.00	10.5 (9-15)	NA	

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4. NA: no existe en el registro histórico.

TABLA 37. RECONSTITUCIÓN DEL FENOTIPO LINFOCITARIO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV			No GGIV			
	mediana (RIQ)	pre	3 m	Valor p	pre	3 m	Valor p
LT CD3+	452 (92-771)	850.5 (390-891)	0.500	1108.5 (357-1309.5)	NA		
LT CD4+	251 (63-313)	452 (209.25-474)	0.500	807.5 (282-933)	NA		
LT CD8+	130 (37-447)	380.5 (169.5-406.5)	0.500	271 (73.5-336.75)	NA		
NK	29 (12-50)	NA		75 (54.75-61.5)	NA		
LT CD19+	93.5 (51.5-166)	NA		486 (363-369.75)	NA		

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. NA: no existe en el registro histórico.

4.4.7.3 POR TRASPLANTE RENAL

4.4.7.3.1 PARÁMETROS CELULARES

En la TABLA 38 se presenta una comparación de los parámetros inmunológicos de los pacientes trasplantados renales en los dos grupos de exposición, con GGIV y sin GGIV, en el primer punto pre y a los 3 meses posteriores de la infusión de GGIV en el grupo de expuestos o del diagnóstico de HGG en el grupo de no expuestos. No se observa diferencia estadísticamente significativa en ambos grupos en los 2 puntos de estudio.

TABLA 38. PARÁMETROS CELULARES DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV		No GGIV		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
Linfocitos Totales/mm ³	pre	600	(300-1350)	500	(250-1800)	0.960
	3 m	1200	(750-1750)	1000	(600-2000)	0.732
Neutrófilos/mm ³	pre	5450	(1125-11650)	8300	(700-8550)	0.413
	3 m	3700	(2750-8100)	2600	(1700-4400)	0.286
Monocitos/mm ³	pre	500	(425-575)	500	(200-850)	1.00
	3 m	500	(500-1150)	500	(500-700)	1.00

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.7.3.2 FACTORES DE COMPLEMENTO

En la TABLA 39 se presenta una comparación de los parámetros del complemento de los pacientes trasplantados renales en los dos grupos de exposición, con GGIV y sin GGIV, en el primer punto pre y a los 3 meses posteriores de la infusión de GGIV en el grupo de expuestos o del diagnóstico de HGG en el grupo de no expuestos. No se observa diferencia significativa en los 2 puntos de estudio de ambos grupos.

TABLA 39. FACTORES DE COMPLEMENTO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV		No GGIV		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
C3	pre	81.6	(74.5-116)	112	(78.23-130)	0.249
	3 m	126	(108.5-179.5)	104	(75.6-119.5)	0.167
C4	pre	21.4	(14.1-24.1)	20.5	(17.25-31.55)	0.974
	3 m	25.7	(25.15-35.95)	29	(17.85-32.23)	0.905

Se utiliza la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas no paramétricas. Los valores se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

4.4.7.3.3 FENOTIPO TBNK

La comparación del fenotipo TBNK de los pacientes trasplantados renales expuestos a GGIV y No GGIV en 2 puntos, pre y 3 meses posteriores de la infusión de GGIV o HGG según el grupo de exposición se presenta en la TABLA 40. No se observa diferencia estadísticamente significativa en ambos grupos en el primer punto de estudio. No se encontraron los datos en el registro histórico del segundo punto de estudio.

TABLA 40. FENOTIPO LINFOCITARIO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro		GGIV		No GGIV		Valor p
		mediana	RIQ	mediana	RIQ	
LT CD3+	pre	524	(40-592)	768	(414.75-2146.5)	0.229
	3 m	NA		NA		
LT CD4+	pre	366	(18-376)	393	(194-831.25)	0.629
	3 m	NA		NA		
LT CD8+	pre	156	(21-215)	396.5	(109.25-1175)	0.229
	3 m	NA		NA		
NK	pre	45	(25-57)	97	(51.75-175.25)	0.229
	3 m	NA		NA		
LT CD19+	pre	31	(19-99)	55	(20.25-89)	0.857
	3 m	NA		NA		

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. NA: no existe en el registro histórico.

4.4.7.3.4 COMPARACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN LOS TRASPLANTADOS RENALES

En relación con la reconstitución de parámetros inmunológicos de los trasplantados renales, no se observan diferencias significativas entre los parámetros del pre y 3 meses posteriores a la infusión de GGIV o el diagnóstico de HGG en los no expuestos para ambos grupos de estudio, GGIV y No GGIV. TABLA 41.

En los registros históricos no se encontraron, los valores del TBNK de los trasplantados renales en el segundo punto, 3 meses posteriores para ambos grupos GGIV y No GGIV por lo que no se realizó el análisis.

TABLA 41. RECONSTITUCIÓN DE PARÁMETROS CELULARES Y FACTORES DEL COMPLEMENTO DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Parámetro	GGIV N=7			No GGIV N=6		
	mediana (RIQ)	pre	3m	Valor p	pre	3 m
Linfocitos totales / mm ³	600 (300-1350)	1200 (750-1750)	0.750	500 (250-1800)	1000 (600-2000)	0.250
Neutrófilos / mm ³	5450 (1125-11650)	3700 (2750-8100)	1.00	8300 (700-8550)	2600 (1700-4400)	0.500
Monocitos / mm ³	500 (425-575)	500 (500-1150)	1.00	500 (200-850)	500 (500-700)	1.99
C3	81.6 (74.5-116)	126 (108.5-179.5)	0.125	112 (78.23-130)	104 (75.6-119.5)	0.375
C4	21.4 (14.1-24.1)	25.7 (25.15-35.95)	0.63	20.5 (17.25-31.55)	29 (17.85-32.23)	1.00

Los valores de los parámetros son absolutos y se expresan con la mediana y rango Intercuartílico (RIQ). Se utiliza la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas (antes y después). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. n: número de pacientes. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. C3: Complemento 3. C4: Complemento 4.

4.4.8 TIPO DE REINFECCIONES EN LOS PACIENTES

Tras el seguimiento de 3 meses posteriores a la infusión de GGIV en el grupo expuesto o el diagnóstico de HGG en el grupo no expuesto, de 51 pacientes del grupo GGIV, 22 (43%) pacientes presentaron reinfección mientras 29 (57%) pacientes no. En el grupo de No GGIV 20 (64.5%) de 31 pacientes presentaron reinfección mientras 11(35%) se mantuvieron sanos. Al comparar entre los que no presentaron una nueva reinfección, se observa mayor número de pacientes en el grupo GGIV. (TABLA 42)

TABLA 42. Nº DE PACIENTES TRASPLANTADOS QUE PRESENTARON O NO UNA REINFECCIÓN GRAVE DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Número de pacientes /total de pacientes (%)	GGIV	No GGIV
Infección	22/51(43)	20/31 (64.5)
No infección	29/51(57)	11/31(35)

Se realizó la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. GGIV: Gammaglobulina intravenosa

De los pacientes infectados, las infecciones bacterianas (no neumonía) son las más frecuentes en ambos grupos. No obstante, las neumonías bacterianas están presentes en ambos grupos. Las infecciones por virus son principalmente por CMV, que además pueden presentarse asociada con una enfermedad bacteriana. Las infecciones fúngicas también están presentes en ambos grupos. (TABLA 43)

TABLA 43. Nº DE EVENTOS DE REINFECCIÓN GRAVE POR TIPO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES TRASPLANTADOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Tipo de Infección Número de eventos/Total de eventos infecciosos (%)	GGIV n=22	No GGIV n=20	Total
Infección bacteriana (No Neumonía)	8/22 (36)	5/20 (25)	13
Neumonía bacteriana	3/22 (14)	1/20(5)	4
Infección bacteriana + Infección fúngica	3/22 (14)	0/20(0)	3
Enfermedad CMV + Infección bacteriana	2/22 (9)	4/20(20)	6
Enfermedad CMV + Infección por otros virus	0/22 (0)	1/20(5)	1
Enfermedad CMV	3/22 (14)	7/20(35)	10
Infección sistémica fúngica	2/22 (9)	2/20(10)	4
Otros virus	1/22 (4)	0/20(0)	1
Total	22	20	42

GGIV: Gammaglobulina intravenosa. CMV: Citomegalovirus, n: número de pacientes

La distribución según el tipo de microorganismo asociado al tipo de enfermedad de las nuevas infecciones graves en cada grupo de estudio, GGIV y No GGIV, se puede observar en la siguiente tabla 44.

Se observan que algunos de los eventos pueden ser polimicrobianos, es decir que una misma reinfección grave puede tener varios cultivos positivos o test diagnósticos a distintos microorganismos. De los 22 eventos infecciosos en el grupo GGIV, se encuentra 26 agentes etiológicos asociado a enfermedad. En el grupo de No GGIV, de los 20 eventos se encontraron 28 agentes etiológicos asociado a enfermedad. TABLA 44.

TABLA 44. N° DE EVENTOS DE REINFECCIÓN POR TIPO DE MICROORGANISMO Y TIPO DE ENFERMEDAD EN LOS PACIENTES TRASPLANTADOS DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Tipo de microorganismo	Tipo de enfermedad	GGIV	No GGIV	TOTAL
A. VIRUS				
<i>Citomegalovirus</i>	Síndrome viral	5	10	15
<i>Citomegalovirus</i>	Enteritis	0	1	1
<i>Citomegalovirus</i>	Enfermedad diseminada	0	1	1
Otros virus				
<i>Virus BK</i>	Nefropatía	0	1	1
<i>Adenovirus</i>	Enfermedad diseminada	1	0	1
B. BACTERIAS				
Bacterias Gram Positivas				
<i>Clostridium difficile</i>	Diarrea	4	2	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía	0	1	1
<i>Streptococcus viridans</i>	Neumonía	1	0	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteremia	0	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteremia	1	0	1
<i>Enterococcus faecium</i>	Neumonía	1	0	1
<i>Enterococcus faecium</i>	Peritonitis	1	0	1
Bacterias Gram Negativas				
<i>Klebsiella pneumoniae BLEE</i>	Bacteremia	1	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae BLEE</i>	ITU	1	2	3

Tipo de microorganismo	Tipo de enfermedad	GGIV	No GGIV	TOTAL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Neumonía	2	0	2
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ITU	0	1	1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacteremia	1	0	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bacteremia	1	0	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ITU	0	1	1
<i>Bacteroides fragilis</i>	Bacteremia	0	1	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sepsis	0	1	1
<i>Escherichia coli BLEE</i>	ITU	1	0	1
<i>Escherichia coli</i>	Neumonía	1	0	1
<i>Morganella morganii</i>	Neumonía	1	0	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Neumonía	1	0	1

C. LEVADURAS

<i>Candida parapsilosis</i>	Neumonía	1	0	1
<i>Candida tropicalis</i>	Neumonía	0	1	1
<i>Candida glabrata</i>	Neumonía	0	1	1
<i>Candida lusitaniae</i>	Neumonía	0	1	1
<i>Aspergillus flavus</i>	Neumonía	1	0	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Neumonía	0	1	1
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	Sepsis	0	1	1

CMV: Citomegalovirus. ITU: infección del tracto urinario. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

4.4.9 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE UN EPISODIO DE REINFECCIÓN

Analizando la regresión logística univariada en la variabilidad de los factores de riesgo de reinfección, se observan que el tiempo < 6 meses tras el trasplante es un factor de riesgo significativo OR de 0.41 (p=0.038). Existe una tendencia del uso de GGIV como factor protector con OR 0.41 sin significancia estadística (p=0.063). (TABLA 45)

TABLA 45. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA UNIVARIANTE DE LAS VARIABLES CLÍNICAS ASOCIADAS CON EL DESARROLLO DE REINFECCIÓN TRAS GGIV O NO GGIV

Parámetros en el Modelo Univariante	OR	IC-95%	Valor p
Uso GGIV	0.41	0.16 – 1.048	0.063
Sexo (masculino)	0.542	0.21 - 1.39	0.205
Tipo de trasplante (cardíaco, renal, hepático)	0.921	0.52 – 1.693	0.779
Tiempo tras el trasplante < 6 meses	2.677	1.054 – 6.794	0.038
Inducción con timoglobulina	4.11	0.44 – 38.42	0.216
Edad > 50 años	1.13	0.345 – 3.719	0.836
Dislipidemia pre-trasplante	0.67	0.283 – 1.613	0.377
Diabetes mellitus tratada pre-trasplante	0.729	0.274 – 1.94	0.52
Serología positiva CMV del receptor	1.285	0.043 – 3.808	0.65
Falla renal crónica pre-trasplante	1.02	0.422 – 2.466	0.965
Terapia de inducción con basiliximab, %	1.363	0.522 – 3.559	0.526
Uso de norfloxacina	1.143	0.464 – 2.81	0.771
Uso de trimetoprim – sulfametoxazole	1.357	0.337 – 5.46	0.667
Hipogammaglobulinemia IgG severa (< 400 mg/dL) V0	0.786	0.239 – 2.578	0.691
Linfocitos totales < 500 cells/uL V0	1.222	0.46 – 3.24	0.686
Hipocomplementemia C3 (< 80 mg/dL) V0	1.696	0.67 – 4.272	0.262
Conteo NK- < 30 cells/uL V0	0.942	0.351 – 2.52	0.916

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

4.4.10 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE UN EPISODIO DE INFECCIÓN

En el modelo multivariante se observa que la terapia GGIV se asocia como factor protector OR 0.302, $p = 0.021$ y el tiempo menor de 6 meses post-trasplante en el cual ocurrieron las infecciones permanece como factor de riesgo con OR 3.364, $p = 0.019$. (TABLA 46)

TABLA 46. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE VARIABLES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN

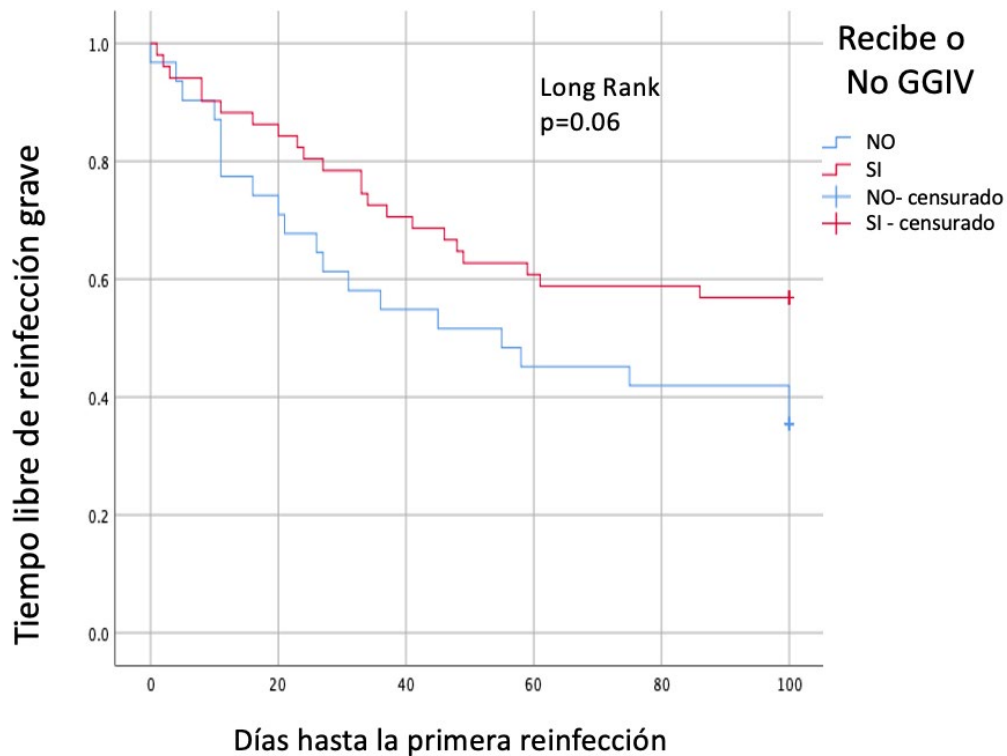
Parámetros en el Modelo Multivariado	OR	IC-95%	Valor p
Uso de GGIV	0.302	0.11 – 0.832	0.021
Género (masculino)	0.542	0.21 - 1.39	0.205
Terapia de inducción con timoglobulina	7.54	0.71 – 80.08	0.094
Tiempo < 6 meses post-trasplante	3.364	1.22 – 9.27	0.019

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

4.4.11 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

En el análisis de Kaplan-Meier, no muestra diferencias significativas entre ambos $p=0.06$.

FIGURA 5 CURVA DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER



En la prueba de igualdad de distribución de supervivencia según el tiempo libre de reinfección.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Valor p
Log Rank (Mantel-Cox)	3.544	1	0,060

4.4.12 CINÉTICA DE IGG

En la siguiente Tabla 47 se observa un nivel de IgG menor significativo inicial del grupo de GGIV en comparación con el grupo No GGIV. Sin embargo, a los 3 meses posteriores aumentan en ambos grupos, sin diferencia estadísticamente significativa.

TABLA 47. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE IGG DEL ESTUDIO DE COHORTES RETROSPECTIVO

Puntos de estudio	GGIV		No GGIV		Valor p
	mediana	RIQ	mediana	RIQ	
pre	459	402-551	565	484-602	0.001
3m	765.5	595.8-983.3	718	612-801	0.400

RIQ: Rango Intercuartílico. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

4.5 DISCUSIÓN

La administración de GGIV en los pacientes trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG fue asociada como factor protector para el desarrollo de reinfección OR 0.302 ($p=0.021$) y el tiempo < de 6 meses post-trasplante como factor de riesgo con OR 3.364 ($p=0.019$) tras el análisis multivariante de regresión logística.

Los pacientes no expuestos del grupo No GGIV fueron comparables con los pacientes del grupo GGIV según los datos clínicos de edad, sexo y comorbilidades desde el punto de vista de variable clínicas.

El tratamiento profiláctico que recibieron ambos grupos era similar, aunque, la profilaxis con valganciclovir fue recibida por el 51.6% de los pacientes del grupo No GGIV mientras que solo 27.5% de los pacientes del grupo GGIV la recibieron ($p=0.035$). Lo último descrito es importante, porque en el seguimiento observamos que el grupo No GGIV presenta mayor número de eventos infecciones por CMV en comparación con los pacientes que si recibieron GGIV.

En relación con los parámetros inmunológicos iniciales en el punto pre, se observa que los pacientes trasplantados de órgano sólido expuestos a GGIV presentan niveles más bajos que los que no fueron expuestos. Por ejemplo, inicialmente en el grupo de GGIV, se presentan un nivel menor significativo del conteo absoluto de CD3 en comparación a los no expuestos (GGIV: mediana (RIQ) 300 (137.8-640) vs. No GGIV: 775.5(383-1045.5), $p=0,001$), tanto para el valor absoluto de CD4 (GGIV: mediana (RIQ) 191.5 (81.5-356.8) vs. No GGIV: 473.5 (240.8-718.8), $p=0,001$) como para CD8 (mediana (RIQ) 79.5 (47.8- 212.8) vs. 252(125.8- 455.8), $p=0,001$). También, los valores absolutos de NK en el punto pre del grupo de GGIV fue menor estadísticamente significativo en comparación con el grupo No GGIV (mediana (RIQ) 300 (137.8-640) vs. 775.5(383-1045.5), $p=0,001$).

Entre las reinfecciones más frecuentes en los pacientes trasplantados de órgano sólido observadas son las infecciones bacterianas (no neumonía) y la infección por CMV como lo reportado por la ISHLT.² Además, se observa infecciones fúngicas grave en pacientes inmunosuprimidos.⁵

Tras el seguimiento de 3 meses posteriores a la infusión de GGIV en el grupo expuesto o el diagnóstico de HGG en el grupo no expuesto, el 57% de los pacientes del grupo GGIV y el 35% de los pacientes del grupo no GGIV no presentaron nuevas infecciones.

Posterior a la exposición de GGIV, los pacientes presentaron buena tolerancia y no se observó en los registros históricos ningún evento grave relacionado al producto.

La reconstitución inmunológica de la IgG a los 3 meses posteriores de la infusión en el grupo de expuestos es significativa ($p < 0.0001$). Además observamos la reconstitución de otros parámetros inmunológicos en el grupo GGIV como un aumento significativo para C3 (pre: mediana (RIQ) 77.5 (62.8- 98.8) vs. 3m: 101.5(83.8- 119.5), $p=0,01$), C4 (pre: mediana (RIQ) 18.1 (13.7-25.5) vs. 3m: 24.9(16.8- 27.7), $p=0,005$), linfocitos totales/ mm^3 (pre: mediana (RIQ) 500 (200-975) vs. 3m: 950 (500-1325), $p=0.005$), CD3 (pre: mediana (RIQ) 300.5(137.8 – 640) vs. 3m: 1009 (514-1137.3), $p=0.020$), CD4 (pre: mediana (RIQ) 191.5 (81.5-356.8) vs. 3m: 604.5(206.3-683), $p=0.005$), CD8(pre: mediana (RIQ) 79.5 (47.8- 212.8) vs. 3m: 274.5 (156.3-449.3), $p=0.015$) y NK (pre: mediana (RIQ) 30.5 (17.3-72.3) vs. 3m: 88.5 (51-132.3), $p=0,012$). Los datos llaman la atención puesto que los pacientes que no recibieron GGIV, no tuvieron una reconstitución significativa lo que sugiere que la GGIV podría inmunomodular por mecanismos no establecidos la reconstitución de algunos parámetros inmunológicos además de la IgG.

Los datos presentados en este estudio sugieren una disminución de la incidencia de infecciones en los pacientes trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG que reciben GGIV. Estudios controlados, randomizados son necesarios para evaluar la eficacia y confirmar la seguridad de la medicación GGIV.

4.6 LIMITACIONES

Por el diseño del estudio de cohortes retrospectiva, en los registros históricos no se encontraron datos a los 3 meses posteriores de la exposición que pudieron aportar información de la reconstitución de parámetros por trasplante.

Para dar conclusiones más definidas, nuestra limitación es nuestra N relativamente pequeña; además al analizar por trasplante, los resultados del total de pacientes podrían ser menos extrapolables a todos los tipos de trasplante estudiados como consecuencia del menor tamaño muestral de algunos trasplantes posiblemente. Para minimizar el riesgo de selección se realizó un análisis de regresión logística multivariable que mantiene la variable de intervención como asociada a protección incluso mejorando su fuerza de asociación que pasa a ser significativa tras ajuste.

Un tiempo de seguimiento más largo para evaluar la incidencia de infecciones posterior a la terapia GGIV es necesario.

4.7 CONCLUSIONES

- La terapia GGIV es un factor protector significativo ante una reinfección grave en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG durante el seguimiento posterior a la infusión.
- El tiempo tras el trasplante < 6 meses es un factor de riesgo significativo de reinfección en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG.

PARTE I

5. ESTUDIO 3

Ensayo clínico multicéntrico: "Evaluación de la eficacia y toxicidad del uso de gammaglobulina intravenosa en el tratamiento de infecciones en pacientes con hipogammaglobulinemia IgG post-trasplante de órgano sólido"

5. ESTUDIO 3

Ensayo clínico multicéntrico: “Evaluación de la eficacia y toxicidad del uso de gammaglobulina intravenosa en el tratamiento de infecciones en pacientes con hipogammaglobulinemia IgG post-trasplante de órgano sólido”

5.1 HIPÓTESIS

La GGIV añadida a la terapia antimicrobiana es segura, eficaz y se asocia a la reconstitución de la inmunidad humoral en pacientes post-TOS que desarrollan infecciones graves en presencia de hipogammaglobulinemia IgG.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 OBJETIVO PRIMARIO

Evaluar la seguridad y eficacia de la GGIV asociada a la terapia antimicrobiana convencional en pacientes con TOS que presentan infección grave e HGG post trasplante, en comparación con la administración única de terapia antimicrobiana.

5.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Evaluar la tasa de reconstitución de la inmunidad humoral tras el uso de GGIV en estos pacientes, concretamente la concentración sérica de IgG al final del periodo de seguimiento.
2. Evaluar otros factores relacionados con la reconstitución de la inmunidad humoral:
 - a. Tiempo (número de días) en alcanzar la normalización de IgG (>750 mg/dl) después de la primera dosis de GGIV o V2 del ensayo.
 - b. Tiempo (número de días) que se mantiene la IgG >750 mg/dl durante el periodo de seguimiento.
3. Evaluar el impacto de la terapia con GGIV inespecífica sobre los tiempos de hospitalización motivados por complicaciones infecciosas graves en pacientes sometidos a TOS que desarrollan infecciones graves en presencia de hipogammaglobulinemia IgG en el periodo post trasplante, concretamente:
 - a. Tiempo acumulado de hospitalización
 - b. Número total de ingresos durante el tiempo de seguimiento debido a una infección grave.
 - c. Supervivencia libre de nueva infección grave desde la administración de la primera dosis de GGIV (grupo terapéutico) o inclusión en el ensayo (grupo control).
4. Evaluar la incidencia de acontecimientos adversos graves durante el periodo de seguimiento del estudio.
5. Evaluar la cinética de distintos anticuerpos específicos (anti-CMV, anti-clostridium difficile, anti-varicela zóster, anticuerpos IgG e IgG1 anti-toxoide tetánico, anticuerpos IgG2 anti-neumococo) en un subgrupo de pacientes trasplantados de órgano sólido con hipogammaglobulinemia e infección grave con y sin terapia de GGIV adicional al tratamiento antimicrobiano convencional.
6. Evaluar la cinética de BAFF en un subgrupo de pacientes trasplantados de órgano sólido con hipogammaglobulinemia e infección grave con y sin terapia de GGIV adicional al tratamiento antimicrobiano convencional.
7. Evaluar la cinética de IL-6 en un subgrupo de pacientes trasplantados de órgano sólido con hipogammaglobulinemia e infección grave con y sin terapia de GGIV adicional al tratamiento antimicrobiano convencional.
8. Evaluar la cinética de IgD en un subgrupo de pacientes trasplantados de órgano sólido con hipogammaglobulinemia e infección grave con y sin terapia de GGIV adicional al tratamiento antimicrobiano convencional.

5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 DISEÑO DE ESTUDIO

El estudio es un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado, multicéntrico de fase 2 para evaluar la eficacia, la reconstitución inmunológica y la seguridad de un protocolo terapéutico de GGIV inespecífica administrada por vía intravenosa además de la terapia antimicrobiana convencional en receptores de órganos sólidos con infección grave e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos realizado en 6 centros de trasplante en España. El centro coordinador fue el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Los participantes elegibles se asignaron al azar a 2 brazos de estudio de la siguiente manera:

1. GGIV añadida a la terapia antimicrobiana convencional;
2. terapia antimicrobiana convencional por sí sola.

El código de la lista aleatoria fue creado por un programa de computadora siguiendo un patrón 1:1. Este mismo programa generó un código único para cada participante en el tratamiento. El tratamiento con GGIV fue abierto. Los participantes aleatorizados fueron monitorizados hasta la última visita programada en el protocolo del ensayo clínico (Figura 6).

La duración del período de reclutamiento fue de 80 meses y el estudio se completó con el fin de proporcionar un seguimiento completo de todos los participantes según el protocolo.

Los centros participantes se distribuyen como figura a continuación: Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Corazón n=15, Riñón n=5, Hígado n=4); Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, (Pulmón n=5, Corazón n=3); Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, (Pulmón n=1); Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, (Pulmón n=5); Hospital Universitario Valle de Hebrón, Barcelona, (Pulmón n=4); y Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona. (Corazón n=2).

FIGURA 6. PROTOCOLO DE ENSAYO CLÍNICO DE LA TERAPIA GGIV- EUDRACT 2012-001327-12

EudraCT 2012-001327-12 Protocolo de Ensayo Clínico

Screening Fase Detección HGG + infección grave	Fase de tratamiento Administración de GGIV Reconstitución IgG, Eficacia y Seguridad						Post GGIV						
✓ V1 Test IgG en el momento del diagnóstico de un episodio de infección grave ✓ Criterios de Inclusión y Exclusión ✓ Aleatorización	V2 No más de 7±3 días después de la V1	V3 7-15±5 días después de la V2	V4 15-30±5 días después de la V3	V5 15-3±5 días después de la V4	V6 15-30±5 días después de la V5	V7 30-45±5 días después de la V6		GGIV 15 gramos + TAMC vs TAMC	GGIV 15 gramos + TAMC vs TAMC	GGIV 20 gramos + TAMC vs TAMC	GGIV 20 gramos + TAMC vs TAMC	GGIV 20 gramos + TAMC vs TAMC	Visita Final Salida Seguridad

TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. HGG: Hipogammaglobulinemia. IgG (IgG < 600mg/dL). GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V: Visita programada del ensayo clínico.

5.3.2 PROTOCOLO DE VISITAS

En la figura 6 se muestra una descripción de las visitas iniciales, de seguimiento y posteriores a GGIV. Una visita inicial (V1) en el momento de la aleatorización, una visita en el momento de la primera infusión de GGIV (V2) y visitas de seguimiento de V3 a V6 fueron planificadas en las que se administraron infusiones de GGIV. Se realizó una visita final (V7) 30-45 días después de la última visita de infusión de GGIV (V6). Las ventanas permitidas en distintas visitas se describen en la figura 6. El tiempo máximo permitido desde la aleatorización hasta la primera dosis de GGIV fue de 7 días.

5.3.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los participantes elegibles fueron personas entre 18 y 70 años con trasplante de órgano sólido bajo terapia inmunosupresora protocolizada con infección grave documentada e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos en el momento de la aleatorización. Se incluyeron pacientes de TC, TP, TR y TH.

Otros criterios de inclusión fueron la prueba de embarazo negativa en mujeres en edad reproductiva y el consentimiento informado por escrito.

Los criterios de exclusión incluyeron pacientes con antecedentes de hepatitis C, receptores renales hipersensibilizados, pacientes con intolerancia conocida a la fructosa, pacientes con eventos tromboembólicos conocidos durante los últimos 3 meses antes de la aleatorización, pacientes con hipersensibilidad conocida a los productos de GGIV y pacientes con antecedentes de deficiencia selectiva de IgA.

5.3.4 PRODUCTO DE ESTUDIO

Se usó GGIV no específica que cumplía con las especificaciones predeterminadas en el expediente del medicamento en investigación aprobado. La Flebogamma DIF 5% es una solución para perfusión intravenosa que contiene 50 g/l de inmunoglobulina humana normal. El producto de GGIV con distribución fisiológica de subclases de IgG contiene trazas de IgA (menos de 0.05 mg/ml). Otros ingredientes son sorbitol al 5% y agua para inyección. Este medicamento pertenece al grupo farmacoterapéutico denominado sueros inmunes e inmunoglobulinas. Al comienzo de la infusión intravenosa se utilizó una velocidad lenta (30 ml/hora). La velocidad de perfusión se incrementó gradualmente de 30 a 90 ml/hora.

Todos los participantes tratados asignados al azar a GGIV recibieron dos dosis de 15 gramos (intervalo entre dosis de 7 a 15 días) seguidas de otras 3 dosis de 20 gramos (intervalo entre dosis de 15 a 30 días) de GGIV. Los fármacos del estudio se mantuvieron en los departamentos de Farmacia de los centros participantes.

5.3.5 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables demográficas del donante y del receptor se registraron al inicio del estudio.

5.3.5.1 VARIABLES DE EFICACIA PRINCIPALES

Se definieron dos variables principales de eficacia:

1. La incidencia de reinfección después de la aleatorización de los pacientes definidos como un nuevo episodio infeccioso.
2. Incidencia acumulada (número total de reinfecciones) durante el seguimiento después de la aleatorización.

5.3.5.2 VARIABLES DE EFICACIA SECUNDARIAS

1. Reconstitución de IgG definida como niveles séricos de IgG en cada visita de estudio del protocolo en ambos grupos.
2. Otros factores relacionados con la reconstitución de la inmunidad humoral:
 - A) Tiempo (número de días) para alcanzar una concentración sérica de IgG > 750 mg/dL después de la visita 2 del ensayo clínico.
 - B) Tiempo (número de días) que la IgG permanece > 750 mg/dL durante el seguimiento después de la visita 2 del ensayo clínico.
3. Impacto de la terapia con GGIV sobre los tiempos de hospitalización motivados por complicaciones de infecciones graves en pacientes sometidos a TOS que desarrollan infecciones en presencia de hipogammaglobulinemia IgG.
 - A) Tiempo acumulado de días de hospitalización.
 - B) Número total de nuevos ingresos durante el seguimiento que se consideraron relacionados con una infección grave.
 - C) Tiempo de supervivencia libre sin infección grave tras la primera dosis de GGIV o V2 del ensayo clínico en el grupo GGIV o inclusión del ensayo en el grupo control.

5.3.5.3 VARIABLES DE SEGURIDAD

La seguridad se evaluó como la tasa de aparición de eventos adversos (EA), EA graves (EAG) y EA graves inesperados (EAGI), que estaban al menos posiblemente relacionados con los procedimientos o productos del estudio.

5.3.5.3.1 INCIDENCIA DE EAS GRAVES

La monitorización específica de biomarcadores para detectar EA durante el período de estudio incluyó:

- Monitorización de la función renal: niveles de urea y creatinina durante el seguimiento.
- Monitorización de la función hepática: niveles de AST y ALT durante el seguimiento.
- Monitoreo de la serología viral HBsAg, VHC y VIH al inicio y en la visita final.

5.3.5.4 SUBESTUDIO DE MONITORIZACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

Para comprender mejor la reconstitución de la inmunidad humoral y los posibles efectos inmunomoduladores de la GGIV en este ensayo clínico, se evaluaron las concentraciones de subclases de IgG, los distintos anticuerpos antimicrobianos específicos, los niveles de IgD, los niveles de BAFF y los niveles de IL-6 en muestras de suero congeladas del centro coordinador al inicio del estudio (V1 antes de la aleatorización) y en la V7 del protocolo del ensayo clínico.

5.3.5.5 METODOLOGÍA PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

Se realizaron pruebas comerciales de ELISA para medir las concentraciones séricas de los biomarcadores.

- Los títulos de IgG anti-CMV fueron analizados por Enzygnost® Anti-CMV / IgG, Siemens Healthcare GmbH, Marburg, Alemania. Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático indirecto cuantitativo. Los micropocillos están recubiertos con antígeno CMV inactivado derivado de fibroblastos humanos infectados con CMV.
- Los anticuerpos IgG contra el virus de la varicela zóster (VVZ) se analizaron mediante el kit de Enzimoimmunoensayo de VaccZyme™ Glicoproteína VVZ IgG nivel bajo EIA, Binding site, Birmingham, U.K. Este kit de ELISA indirecto está diseñado para la medición *in-vitro* de anticuerpos IgG específicos contra VVZ presentes en el suero, con el fin de determinar el estado de protección. Los micropocillos están pre-recubiertos con glicoproteínas VVZ purificadas. Realizamos una dilución mayor (1:200) que la dilución propuesta por el fabricante (1:100).

- Los anticuerpos anti-neumocócicos IgG e IgG2 se probaron con el Kit de ELISA Anti-PCP IgG VaccZyme y Anti-PCP IgG2 VaccZyme™, Binding site, Birmingham, Reino Unido. Estos kits de ELISA indirectos están diseñados para medir las respuestas de anticuerpos a las vacunas anti-neumocócicas que incorporan 23 polisacáridos aislados de *Streptococcus pneumoniae*. Los micropocillos están pre-cubiertos con los antígenos neumocócico (1-5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F - nomenclatura danesa).
- Los anticuerpos anti-toxoide tetánico IgG e IgG1 se determinaron mediante el kit de ELISA IgG Anti-toxoide tetánico VaccZyme™ y Anti-toxoide tetánico IgG1 VaccZyme™, Binding site, Birmingham, Reino Unido. Estos kits de ELISA indirecto están destinados a la medición *in-vitro* de anticuerpos IgG o IgG1 específicos contra el toxoide tetánico presentes en el suero, con el fin de determinar el estado protector. Los micropocillos están pre-recubiertos con antígeno del toxoide tetánico.
- La concentración de anticuerpos IgG anti-toxina A y B de *clostridium difficile* se realizó mediante kits de ELISA de tgcBIOMICS GmbH, Bingen am Rhein, Alemania. Estos ensayos emplean la técnica de inmunoensayo enzimático indirecto cuantitativo. Los micropocillos están recubiertos con la toxina A o la toxina B de *Clostridium difficile*.
- Los niveles séricos de IL-6 se realizaron mediante un kit de ELISA de IL-6 humana: Interleucina 6 humana), Elabscience, Texas, EE. UU. Este kit de ELISA utiliza el principio Sandwich-ELISA. La placa de micro ELISA proporcionada en este kit se ha recubierto previamente con un anticuerpo específico para IL-6R humano.
- Los niveles séricos de BAFF se investigaron mediante un kit de ELISA Quantikine de BAFF / BlyS / TNFSF13B humano, Bio-Techne R&D Systems, Minneapolis, EE. UU. Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático tipo sándwich. Se ha recubierto previamente una microplaca con un anticuerpo monoclonal específico para BAFF / BlyS humanos.
- Los niveles séricos de IgD se analizaron mediante un kit de reactivos líquidos de IgD humana, Binding Site, Birmingham, Reino Unido en Siemens BNII.

5.3.6 DEFINICIÓN DE EVENTO INFECCIOSO GRAVE

La infección grave se definió como infección documentada (cultivo positivo y/o definición clínica), que requirió al menos una dosis de terapia antimicrobiana intravenosa en cualquier momento después del trasplante. Los episodios infecciosos por *citomegalovirus* tratados con valganciclovir oral y las infecciones por *Clostridium difficile* tratadas por vía oral también se consideraron infecciones graves en este ensayo clínico.

5.3.7 DEFINICIÓN DE INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA DE ANTICUERPOS

La deficiencia secundaria de anticuerpos se definió como hipogammaglobulinemia de IgG (con IgG <600 mg/dL). La nefelometría y la turbidimetría fueron aceptadas como metodologías de laboratorio.

5.3.8 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

De cada participante en el estudio, se recogieron muestras de sangre periférica en cada uno de los puntos de estudio propuestos como al inicio y en las visitas de seguimiento. Se obtuvieron 10 mL de sangre total, tratados con ácido etilen diamino-tetraacético (EDTA) de Greiner bio-one, como agente anticoagulante, para realizar la titulación de las células sanguíneas: leucocitos totales y sus sub-poblaciones, neutrófilos y linfocitos, de forma absoluta y porcentual.

Se recogen 10 mL en tubos con heparina de sodio (Greiner bio-one) a partir de los cuales se obtiene el suero de la muestra mediante técnicas de centrifugación (3500 revoluciones por minuto durante cinco minutos), para la determinación de los distintos parámetros séricos bioquímicos e inmunológicos.

Las muestras de suero se obtuvieron y almacenaron en el centro de coordinación para determinación de subestudios en el Servicio de Inmunología (subclases de IgG), Laboratorio Experimental de Inmunología de Trasplantes del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (anticuerpos específicos, IL-6, BAFF) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid) y en el Laboratorio de Inmunología, Complejo Asistencial Universitario Hospital de León (IgD), (León, Castilla y León).

5.3.9 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS

A continuación, se muestran los valores límite de la normalidad de los parámetros bioquímicos y hematológicos del hospital de referencia coincidente con el punto de inflexión utilizado en la asociación con los eventos clínicos estudiados.

TABLA 48. VALORES LÍMITE DE LA NORMALIDAD DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN

Parámetros Hematológicos	Parámetros Bioquímicos
Leucocitos >10.00 (x1000)/mL	GOT >40 U/L
Linfocitos porcentual < 16%	GPT > 41 U/L
Valor absoluto de Linfocitos < 1300/mL	GGT >60 U/L
Valor absoluto de Linfocitos > 3500/mL	PT < 6.40 gr/dL
Leucocitos <4.00 (x1000)/mL	ALB < 3.40 gr/dL
Neutrófilos porcentual < 42%	UREA > 45 mg/dL
Valor absoluto de neutrófilos < 1800/mL	Cr > 1.20 mg/dL
Valor absoluto de neutrófilos > 7500/mL	BT > 1.10 mg/dL

5.4 ASPECTOS ÉTICOS

Los participantes fueron informados en detalle sobre todos los procedimientos y objetivos del estudio y dieron su consentimiento informado por escrito.

El protocolo clínico fue aprobado por el comité de ética de investigación clínica (CEIC) del Instituto de investigación sanitaria Gregorio Marañón y por la Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y es consistente con los Principios de la Declaración de Estambul sobre el Tráfico de Órganos y el Turismo de Trasplantes. El ensayo se registró en el Registro de ensayos clínicos de la UE con el número Eudra-CT 2012-001327-12.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tamaño de la muestra se calculó considerando un error tipo 1 del 5% y una potencia del 80% teniendo en cuenta que al menos el 56% de los participantes asignados al grupo de terapia antimicrobiana sola tendrían una incidencia de reinfección detectable durante el seguimiento. Se necesitó un total de 38 participantes en cada grupo para detectar tal diferencia. Se realizaron análisis de eficacia y seguridad en la población por protocolo. Se ha realizado un análisis descriptivo de todas

las variables a nivel basal para comprobar la homogeneidad entre grupos. Las características basales se describieron mediante la media (con DE), la mediana (con rango Intercuartílico) o las frecuencias (porcentaje) según correspondiera. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de la t de Student o las pruebas no paramétricas de la U de Mann-Whitney según fuera apropiado para las variables continuas y la prueba de Chi-cuadrado para las variables categóricas. La supervivencia sin reinfección se estimó mediante curvas de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba de log-Rank para comparar la supervivencia censurada por reinfección entre los 2 grupos. Se utilizó el análisis de regresión logística para estudiar los factores asociados con la reinfección. Todos los factores del receptor, donante y trasplante que se asociaron significativamente o con tendencia con el resultado (significativo $p < 0.05$, tendencia 0,05-0,10) se incluyeron en el modelo multivariado. El criterio de valoración principal de seguridad se describe por porcentaje y número de EA y EAG. Todos los valores de p fueron exactos y de 2 colas, y los valores $< 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS para todos los análisis estadísticos.

5.6 RESULTADOS

Entre 2014 y 2020, se asignó al azar a un total de 44 receptores de órganos sólidos que desarrollaron infecciones graves y que presentaron una inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos. Cinco participantes que fueron asignados al azar no recibieron ningún procedimiento de estudio o fueron retirados del estudio (Figura 7). Se excluyeron 2 pacientes que fueron aleatorizados al brazo de GGIV por un fallo en la aleatorización; se retiraron 2 pacientes aleatorizados a la terapia antimicrobiana convencional porque los investigadores decidieron iniciar la terapia con GGIV debido al deterioro significativo de la reinfección poco después de la aleatorización y el otro se aleatorizó a la terapia antimicrobiana convencional debido a fallos de seguimiento. Un total de 39 participantes completaron la fase de protocolo del estudio y fueron seguidos hasta el final del estudio (Figura 7). Distribución: Corazón 20, Pulmón 12, Riñón 5, Hígado 2. La inscripción de pacientes planificada no se logró debido a restricciones presupuestarias, reclutamiento lento de pacientes y el efecto de la pandemia COVID-19 durante 2020.

FIGURA 7. FLUJOGRAMA DEL NÚMERO DE PACIENTES ENROLADOS EN EL ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO QUE RECIBIERON GGIV + TAMC O SOLO TAMC EVALUABLES PARA EL ANÁLISIS DE EFICACIA Y SEGURIDAD

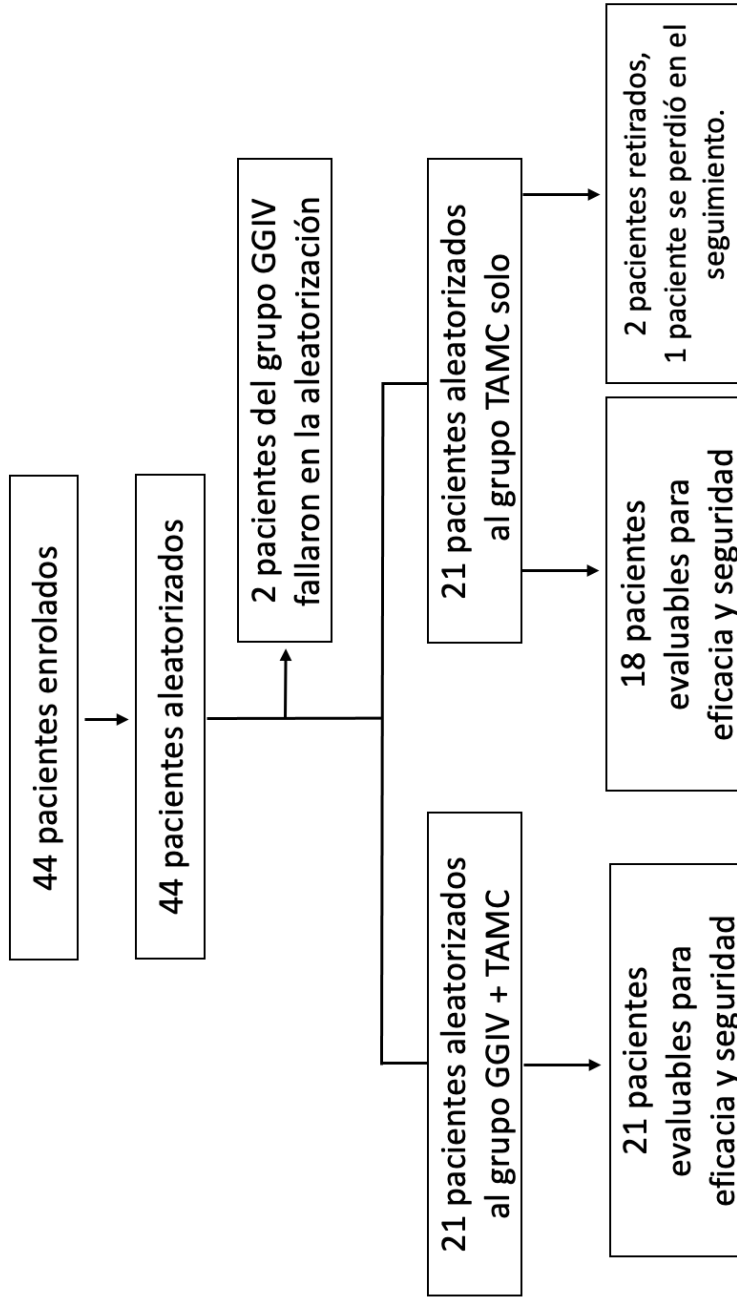


Figura 2

El flujoograma muestra el número de pacientes que fueron enrolados en el ensayo clínico aleatorizado y recibieron GGIV + TAMC o solo TAMC siendo evaluables para el análisis de eficacia y seguridad.

TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. GGIV: Gammaglobulina intravenosa.

5.6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las características iniciales de los participantes se muestran en la TABLA 49.

TABLA 49. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS GRUPOS GGIV + TAMC VS TAMC

Parámetro	GGIV+TAMC	TAMC	Valor p
Edad, media ± DE	54 ± 11	55 ± 11	0.77
Sexo, % masculino	76.19	94.44	0.12
Tiempo desde el trasplante a V1 en días RIQ	41 - 205	34 - 282	0.878
Re trasplante, %	0	0.05	0.310
Falla renal pre trasplante, %	20	29.4	0.51
Diabetes mellitus tratada pre-trasplante, %	14.3	41.2	0.06
Uso de dispositivo de asistencia ventricular pre-trasplante, %	14.3	22.2	0.52
Infecciones pre trasplante, %	45	35.3	0.55
Serología positiva CMV del donante, %	94.1	88.2	0.55
Serología negativa CMV del receptor, %	5	22.2	0.12
Serología CMV discordante D+R-, %	5,88	23,52	0.15
Vacuna neumocócica polisacárida pre-trasplante, %	64.7	70.6	0.71
Vacuna neumocócica conjugada pre-trasplante, %	43.8	23.08	0.24
Trasplante urgente, %	40	22.2	0.24
Complicaciones quirúrgicas post trasplante, %	30	11	0.15
Rechazo celular agudo antes de V1, %	15.7	0	0.079
Profilaxis valganciclovir, %	57.14	61.1	0.80
Profilaxis ganciclovir, %	61.9	50	0.45
Profilaxis cefalosporina %	55.5	64.7	0.58
Inmunosupresión de inducción de basiliximab, %	61.9	100	0.003
Disfunción primaria del injerto, %	5	11.1	0.27
Hemodiálisis pre trasplante, %	10	11.1	0.91
Peso del receptor, media ± DE	69 ± 16	73 ± 14	0.426
Hemoglobina - V1, g/dL, media ± DE	9.8 ± 1.23	11.04 ± 2.15	0.034
IgA mg/dL - V1, media ± DE	178 ± 154	140 ± 59	0.931
IgM mg/dL - V1, media ± DE	51 ± 30	60 ± 25	0.144
Linfocitos - V1, célula/uL, RIQ	425 -1250	375 - 1425	0.646
Neutrófilos - V1, célula/uL, RIQ	3145 - 11400	2700 - 6925	0.335
Leucocitos - V1, célula/uL, RIQ	4750 - 12435	4175 - 9075	0.46
Tiempo al alta, días, RIQ	24 - 78	21 - 62	0.598

TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. CMV: Citomegalovirus. RIQ: Rango Intercuartílico. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. DE: Desviación estándar. V1: Visita 1 del ensayo clínico (enrolamiento y aleatorización) D: donante. R: receptor. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

5.6.2 TIPO DE INFECCIONES EN LOS PACIENTES ALEATORIZADOS

La distribución de los tipos de microorganismos y de enfermedad se describe en la TABLA 50.

TABLA 50. TIPO DE MICROORGANISMO Y ENFERMEDAD CON EL TRATAMIENTO CORRESPONDIENTE AL MOMENTO DE LA ALEATORIZACIÓN DEL ENSAYO CLÍNICO

Tipo de microorganismo	Tipo de enfermedad	Terapia	Número
<i>Citomegalovirus</i>	Síndrome viral	Valganciclovir	5
<i>Citomegalovirus</i>	Síndrome viral	Ganciclovir	6
<i>Citomegalovirus</i>	Citopenia	Ganciclovir	3
<i>Citomegalovirus</i>	Enteritis	Ganciclovir	1
<i>Citomegalovirus</i>	Enteritis	Valganciclovir	1
<i>Herpes</i>	Esofagitis	Aciclovir	1
<i>Clostridium difficile</i>	Diarrea	Fidaxomicina	2
<i>Clostridium difficile</i>	Diarrea	Metronidazol	1
<i>Escherichia Coli BLEE</i>	Bacteriemia + ITU	Meropenem, Cefalosporina	1
<i>Escherichia Coli BLEE</i>	Bacteriemia + ITU	Ceftazidima	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Neumonía	Piperacillin-Tazobactam, Levofloxacina	1
<i>Klebsiella BLEE</i>	Bacteriemia	Ertapenem	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía	Ciprofloxacina	1
<i>Nocardia</i>	Neumonía	Amikacina, Imipenem, Linezolid	1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacteriemia	Ceftazidima	1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Neumonía	Piperacillin Tazobactam	2
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Neumonía	Meropenem + Cefalosporina	1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Mediastinitis	Ceftolozano, Tazobactam	1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ITU	Meropenem	1
<i>Serratia marcescens</i>	Bacteriemia	Piperacillin-Tazobactam	1
<i>Serratia marcescens</i>	Neumonía	Piperacillin-Tazobactam	2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Neumonía	Micafungina, Posaconazol	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bronquitis	Isavuconazol	1
<i>Aspergillus terreus</i>	Mediastinitis	Voriconazol	1
Sin diagnóstico microbiológico	Neumonía	Linezolid, Meropenem	1
	Neumonía	Levofloxacina	1
	Neumonía	Piperacillin-Tazobactam	3
	Neumonía	Ceftriaxona	2
	Neumonía	Meropenem, Linezolid	1
	ITU	Ceftriaxona	1

ITU: Infección del tracto urinario. BLEE: betalactamasa de espectro extendido

5.6.3 TIPO DE RE-INFECCIONES EN LOS PACIENTES ALEATORIZADOS

La distribución y los tipos de reinfecciones que se desarrollaron después de V1 se presentan en la TABLA 51.

TABLA 51. TIPO DE MICROORGANISMO Y ENFERMEDAD EN EL MOMENTO DE LA PRIMERA REINFECCIÓN DURANTE EL SEGUIMIENTO

Grupo	V3	V4	V5	V6	V7
GGIV +	CMV	Pneumonia+	<i>Clostridium</i>		
TAMC	Enteritis (2) <i>Klebsiella pneumoniae</i> Neumonía (2)	Sepsis	<i>difficile</i> Diarrea		
TAMC	<i>Pseudomona aeruginosa</i> Mediastinitis	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ITU CMV Infección (3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ITU CMV Infección (2)	<i>Staphylococcus aureus</i> Neumonía InfecciónCMV	<i>Escherichia coli</i> ITU <i>Streptococcus viridans</i> Neumonía + <i>Escherichia coli</i> ITU

TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. CMV: Citomegalovirus. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. ITU: Infección del tracto urinario. (número de infecciones). V: Visita.

5.6.4 VARIABLES PRINCIPALES DE EFICACIA

La tasa de reinfección fue significativamente menor en los pacientes aleatorizados para recibir GGIV en comparación con los pacientes que recibieron solo terapia antimicrobiana convencional (28,6 % frente a 66,7%, prueba de Chi-cuadrado, $p = 0,017$).

La mediana de nuevos episodios infecciosos después de la aleatorización tendió a ser menor en el grupo de GGIV, pero la diferencia no fue significativa (0,47, (1-3), versus 0,89, (1-4) la prueba de la U de Mann-Whitney, $p = 0,056$).

En el análisis de regresión logística, el uso de GGIV se asoció con una tasa más baja de desarrollar reinfección grave durante el seguimiento. Las variables clínicas que resultaron ser significativamente

diferentes o tendían a ser diferentes entre pacientes con GGIV y sin GGIV se introdujeron luego en modelos de regresión univariante para evaluar su posible asociación con el riesgo de reinfección. La única de estas variables clínicas que se asoció significativamente o tendió a estar asociada con el desarrollo de reinfección en el análisis de regresión logística univariante fue el sexo (las mujeres se asociaron con un menor riesgo de reinfección) (Tabla 52). En el análisis de regresión logística multivariante, la GGIV se mantuvo significativamente asociada con tasas más bajas de reinfección después del ajuste por sexo (Tabla 53).

TABLA 52. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA, TRAS LA V1, DE VARIABLES CLÍNICAS ASOCIADA CON EL DESARROLLO DE REINFECCIÓN DURANTE EL SEGUIMIENTO

Parámetros	OR	IC-95%	Valor p
Uso GGIV	0.20	0.05 - 0.78	0.021
Sexo(mujer)	0.296	0.05 - 1.68	0.170
Tipo de trasplante (corazón, pulmón, riñón, hígado)	0.848	0.413 – 1.739	0.848
Diabetes mellitus pre-trasplante tratada	1.231	0.320 - 4.74	0.51
Serología CMV positiva del receptor	0.596	0.089 - 4.008	0.595
Estatus serológico discordante (D+R-) no presente	0.625	0.091 – 4.275	0.632
Basiliximab no usada como terapia de inducción	0.889	0.19 - 4.150	0.55
Complicación quirúrgica	1.062	0.227 – 4.981	0.939
Rechazo celular agudo antes de V1 no presente	0.444	0.072 – 2.760	0.444
Hemoglobina en V1, por cada disminución mg/dL	1.020	0.726 -1.434	0.909
IgM en V1 es > 50 mg/dL	0.360	0.032 – 4.006	0.406

OR: Odds Ratio. CMV: Citomegalovirus. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V1: Visita 1 del ensayo clínico (enrolamiento y aleatorización). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

TABLA 53. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA, TRAS LA V1, DE VARIABLES CLÍNICAS ASOCIADA CON EL DESARROLLO DE REINFECCIÓN DURANTE EL SEGUIMIENTO

Parámetros	OR	IC-95%	Valor p
Uso GGIV	0.234	0.05 – 0.945	0.041
Sexo (mujer)	0.281	0.027 – 2.954	0.290

OR: Odds Ratio. CMV: Citomegalovirus. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V1: Visita 1 del ensayo clínico (enrolamiento y aleatorización). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

5.6.5 VARIABLES SECUNDARIAS DE EFICACIA

5.6.5.1 RECONSTITUCIÓN DE IGG

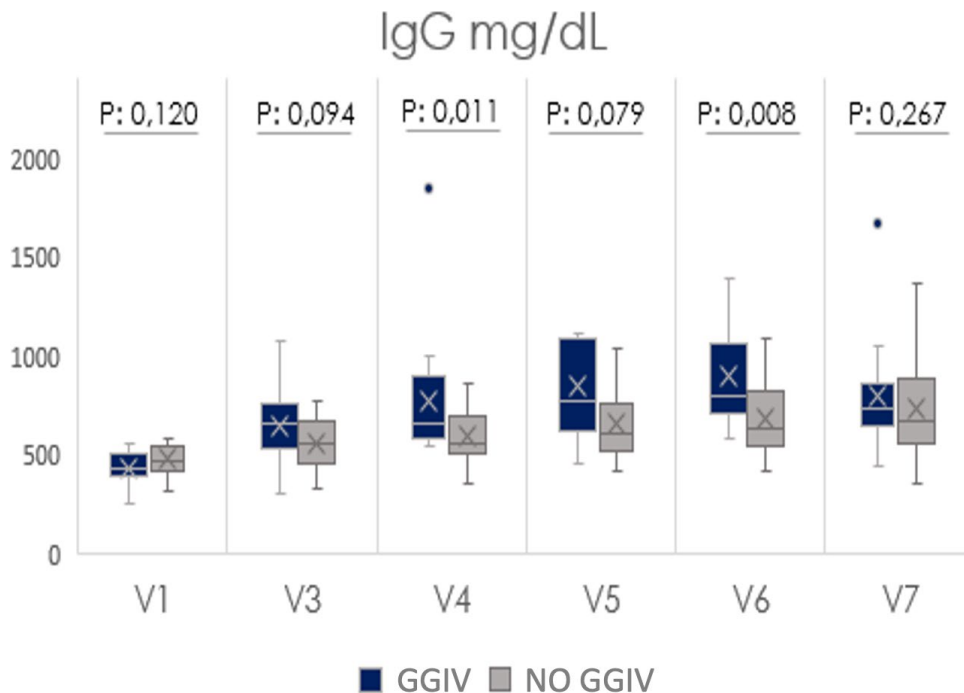
Se evaluó la reconstitución inmunitaria de los niveles de IgG en todos los sujetos en la aleatorización de todas las visitas del estudio hasta la visita final del estudio (V7). Al inicio del estudio (V1), los niveles de IgG tendieron a ser más bajos en el grupo de GGIV que en el grupo de antimicrobianos convencionales. En V2 en el momento de la primera infusión de GGIV, los niveles de GGIV fueron significativamente más bajos en el grupo de GGIV. Se presentó hipogammaglobulinemia severa (IgG <400 mg/dl) en 10 casos. El 70% de estos casos estaban en el grupo GGIV. La magnitud de la reconstitución de IgG se demostró a lo largo del tiempo comenzando en V3 después de que la primera dosis de GGIV fue significativamente mayor en V4 y V6 en el grupo de GGIV. Los niveles medios de IgG en cada grupo después de la aleatorización se describen en la Tabla 54 y la Figura 8.

TABLA 54. CINÉTICA DEL VALOR DE IGG DURANTE EL SEGUIMIENTO

Visita	GGIV + TAMC		TAMC		Valor p
	media±DE	RIQ	media±DE	RIQ	
V1	435±84	389-502	476±75	416-538	0.120
V2	441±97	364-529	515±109	441-587	0.039
V3	652±181	528-766	559±138	475-668	0.094
V4	775±301	581-899	611±136	509-745	0.011
V5	845±342	615-1085	656±167	528-755	0.079
V6	903±305	704-1065	696±207	552-823	0.008
V7	797±256	652-861	731±268	566-852	0.267

TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. RIQ: Rango Intercuartílico. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. DE: Desviación estándar. V: Visitas del ensayo clínico (V1: enrolamiento y aleatorización, V2: primera dosis de GGIV, V3-V6: Seguimiento, V7: Visita final. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 8. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE IgG



GGIV fue asociado con la reconstitución IgG iniciado en la V3 del ensayo clínico. V: Visita del ensayo clínico. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

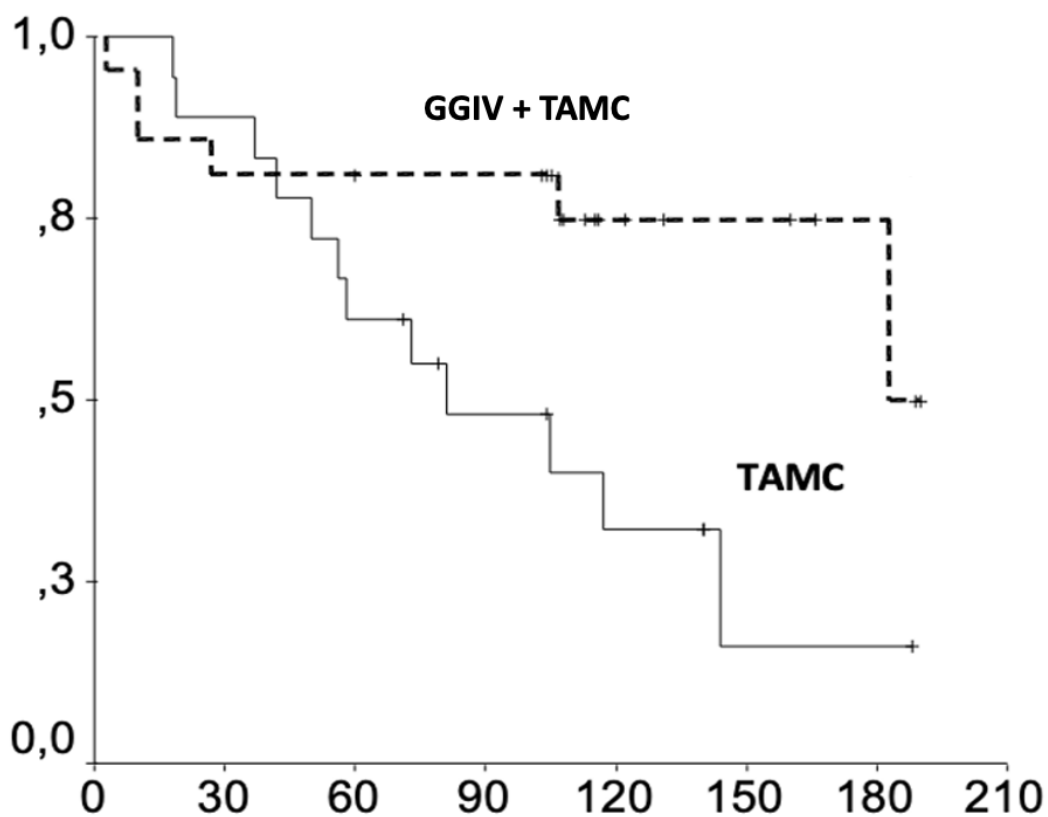
5.6.6 FACTORES RELACIONADOS A LA RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

- A) El tiempo medio (número de días) para alcanzar una concentración sérica de IgG > 750 mg/dL después de la visita 1 del ensayo clínico tendió a ser más corto en el grupo de GGIV (66 frente a 96 días, $p = 0,106$).
- B) El tiempo medio (número de días) que la IgG permaneció > 750 mg/dl durante el seguimiento después de la visita 1 del ensayo clínico se prolongó en el grupo de GGIV, pero sin significación estadística (47 frente a 27 días, $p = 0,271$). Al final del estudio, después de la aleatorización, 14 de 27 (51,85%) participantes en el grupo de GGIV tenían al menos un nivel de IgG > 750 mg/dl, mientras que 8 de 18 (44,4%) en el grupo de tratamiento antimicrobiano convencional revelaron niveles de IgG > 750 mg/dl ($p = 0,163$). El número medio de visitas en las que los niveles de IgG fueron > 750 mg/dl fueron de 2 y 1 días ($p = 0,165$) en los grupos de GGIV y no GGIV, respectivamente. La reconstitución de los niveles de IgG entre V1 y V7 fue significativamente mayor en el grupo de GGIV en comparación con el grupo sin GGIV (361 ± 223 vs 255 ± 275 mg/dL, $p = 0.038$).

5.6.7 IMPACTO DE LA TERAPIA DE GGIV EN LOS TIEMPOS DE HOSPITALIZACIÓN

- A) El tiempo acumulado de días de hospitalización durante el seguimiento del ensayo fue similar en ambos grupos (33 ± 25 frente a 38 ± 21 días, $p = 0,398$).
- B) El número total de nuevos ingresos durante el seguimiento que se consideraron relacionados con una infección grave fue similar en ambos grupos (rango 0-1 vs 0-3, $p = 0,518$). Durante el seguimiento, 2 pacientes del grupo de GGIV desarrollaron rechazo celular agudo (2 frente a 0, $p = 0,18$).
- C) En el análisis de Kaplan Meier, la supervivencia sin reinfección grave después de V1 del ensayo clínico fue significativamente menor entre los pacientes tratados con GGIV (Log Rank 5.09, $p = 0.024$, Figura 9).

FIGURA 9. CURVA DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER POST-V1 SIN REINFECCIÓN DE TRASPLANTADOS DE ÓRGANO SÓLIDO DEL GRUPO DE GGIV + TAMC VERSUS SOLO TAMC

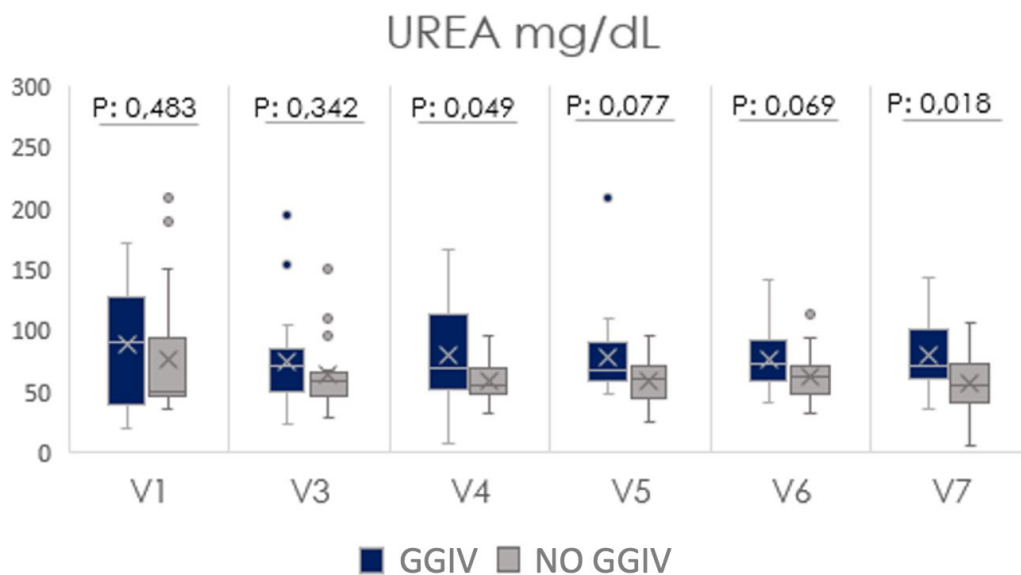


TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. Tiempo: meses posteriores a la V1. V1: visita 1 del ensayo clínico (aleatorización).

5.6.8 VARIABLES DE SEGURIDAD

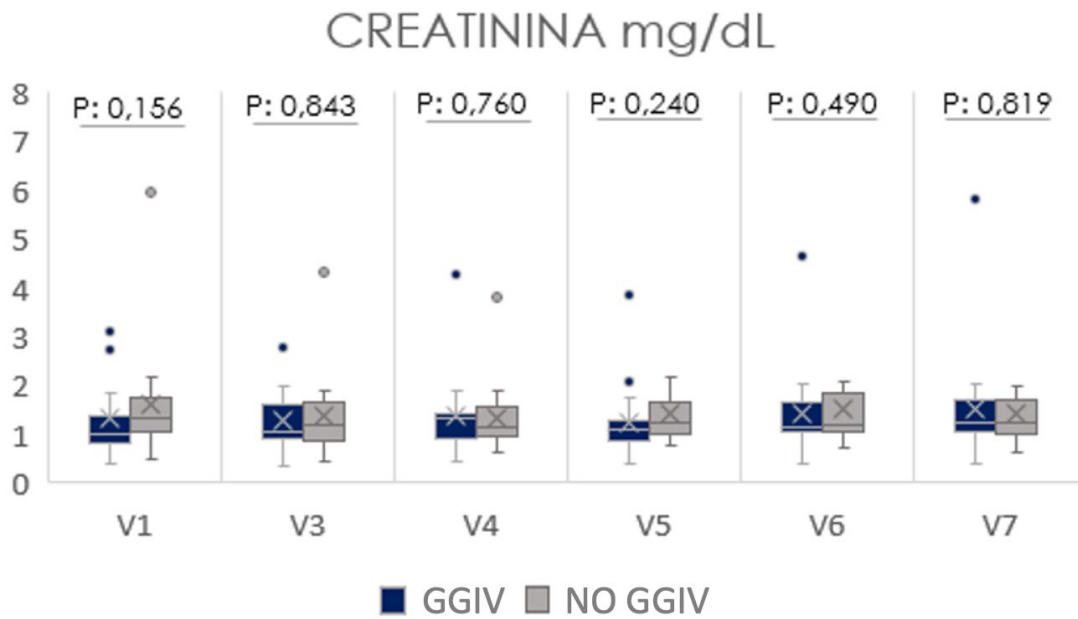
Los 39 pacientes se incluyeron en el análisis de seguridad. La GGIV en combinación con la terapia antimicrobiana convencional fue bien tolerada. Todos los pacientes asignados al azar a GGIV completaron el protocolo del estudio. Los niveles medios de urea fueron más altos en el grupo de GGIV en V4 y V7. El porcentaje de pacientes con niveles elevados de urea, según el laboratorio de referencia (>40 mg/dL) fue mayor en el brazo de GGIV, pero la diferencia no fue significativa en ninguna visita. Los niveles medios de urea de V7 fueron similares a los valores iniciales en V1 en ambos grupos (Figura 10) Los valores de creatinina fueron similares en ambos grupos (Figura 11). Los niveles de transaminasas fueron similares en ambos grupos (Figura 12 y Figura 13).

FIGURA 10. CINÉTICA DE UREA



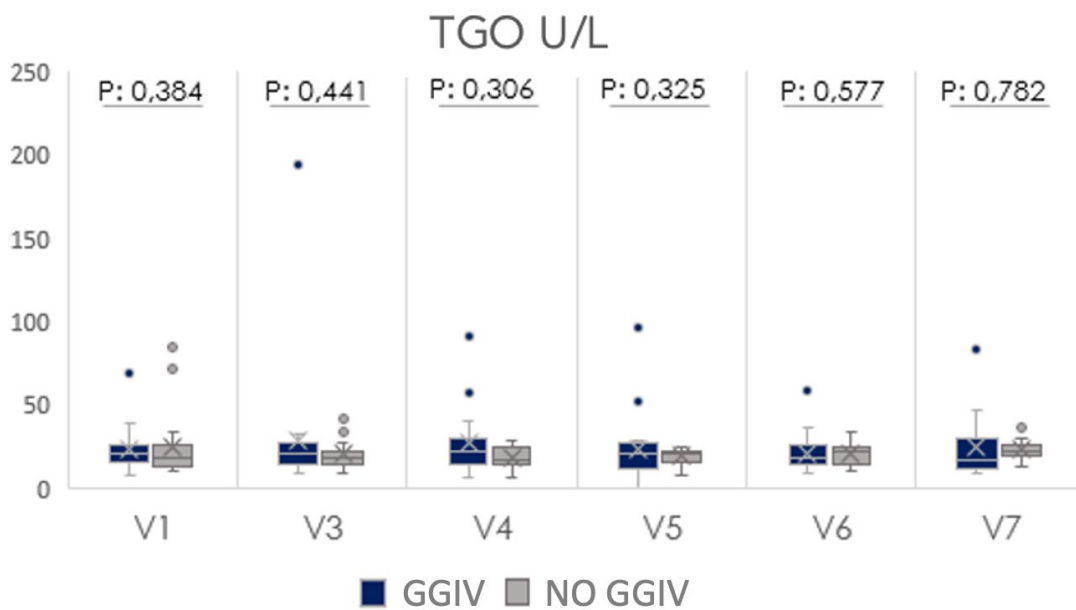
GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V: Visita, V1: visita 1 del ensayo clínico (aleatorización). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 11. CINÉTICA DE CREATININA



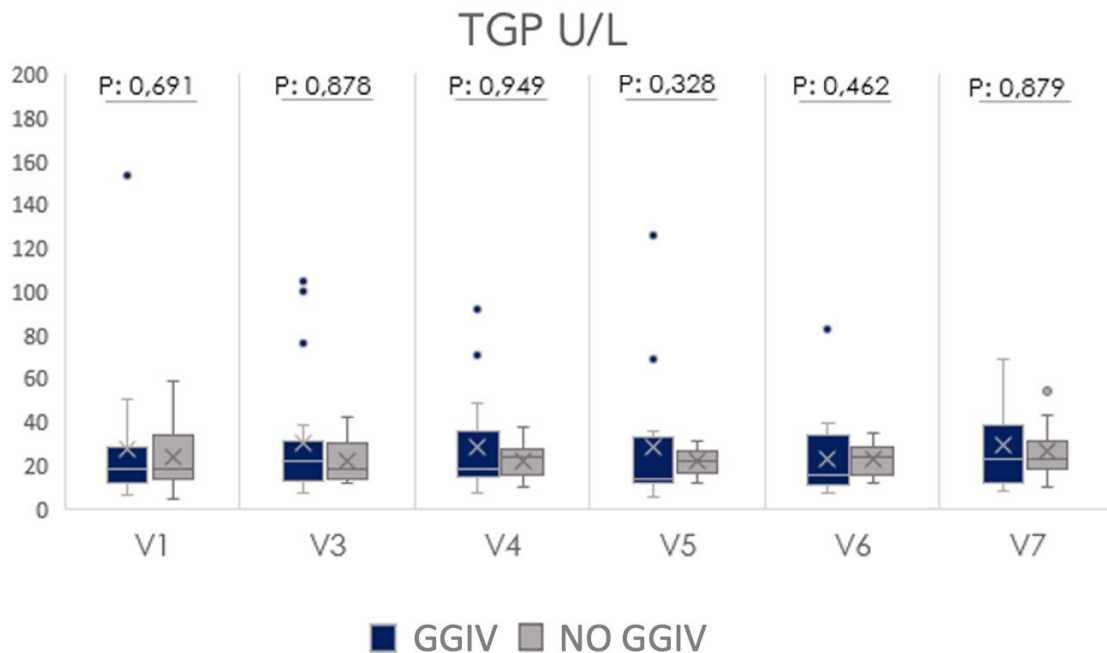
GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V: Visita, V1: visita 1 del ensayo clínico (aleatorización). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 12. CINÉTICA DE TGO



GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V: Visita, V1: visita 1 del ensayo clínico (aleatorización). $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 13. CINÉTICA DE TGP



GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V: Visita, V1: visita 1 del ensayo clínico (aleatorización). $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Se notificaron a la CRO un total de 16 EAG en 13 pacientes (Tabla 55). La prevalencia de eventos adversos graves fue de 6/21 pacientes tratados con GGIV (28,57%) y de 7/18 pacientes sin GGIV (38,88%) (prueba de Chi-cuadrado bilateral, $p = 0,496$). Ninguno de los eventos adversos graves se consideró relacionado con el fármaco del estudio según los informes de los investigadores. Ninguno de los pacientes tratados con GGIV tuvo que interrumpir la medicación del estudio y se completaron todas las dosis del protocolo. Entre los pacientes, hubo un participante que recibió GGIV que fue diagnosticado de shock séptico registrado en el informe V7 del ensayo clínico y murió 32 días después de la última dosis de GGIV. Este paciente desarrolló previamente neumonía y sepsis después de las 2 primeras dosis de GGIV. La infección que condujo al reclutamiento fue una neumonía, los niveles basales de IgG fueron 436 mg/dL y los recuentos de linfocitos 300/uL. Los niveles de GGIV en V6 fueron 803 mg/dl en este paciente. Un paciente tratado con GGIV desarrolló trombosis venosa profunda (TVP) durante el seguimiento. Otro participante que fue asignado al grupo de terapia antimicrobiana convencional sola también reveló TVP. No se informaron EAGI. De acuerdo con el protocolo, la serología de hepatitis B, C y VIH se realizó en V7 y fue negativa en todos los pacientes del brazo de GGIV. En el grupo sin GGIV se encontró que dos pacientes eran positivos para HBsAg en V7.

TABLA 55. REACCIÓN ADVERSA SEVERA REPORTADA A LA CRO DURANTE EL PERÍODO DE ESTUDIO

Grupo	Descripción	Relación con el fármaco de estudio
GGIV	Linfoma Non-Hodgkin	No
GGIV	Efusión pericárdica	No
GGIV	Neutropenia	No
GGIV	Efusión pleural	No
GGIV	Perforación Intestinal	No
GGIV	Trombosis venosa profunda	No
GGIV	Neumonía and sepsis	No
TAMC	Neutropenia	-
TAMC	Caquexia	-
TAMC	Fractura cubital	-
TAMC	Hemorragia cerebral	-
TAMC	Debilidad adquirida en la UCI	-
TAMC	Trombocitopenia	-
TAMC	Trombosis venosa profunda	-
TAMC	Neumonía	-
TAMC	Neutropenia	-

CRO: Organización de Investigación por Contrato. GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

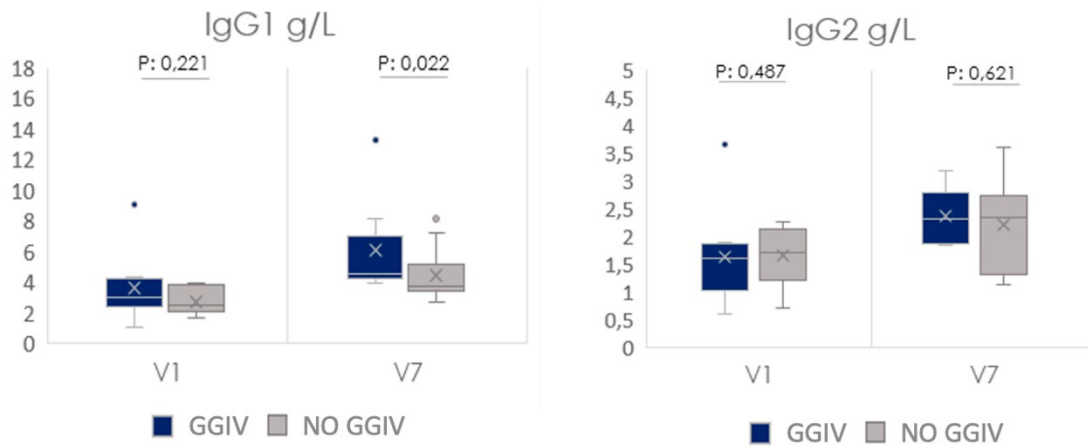
5.6.9 SUBESTUDIO DE MONITORIZACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

Observamos el efecto de la GGIV sobre los parámetros de inmunidad humoral.

Analizamos la dinámica de la inmunidad humoral de distintos parámetros de inmunidad humoral en un subgrupo de receptores de órganos sólidos que participan en el centro de coordinación (9 en el grupo de GGIV [6 de corazón, 2 de riñón, 1 de hígado] y 10 en el grupo de no GGIV [7 de corazón, 2 de riñón, 1 receptor de hígado]).

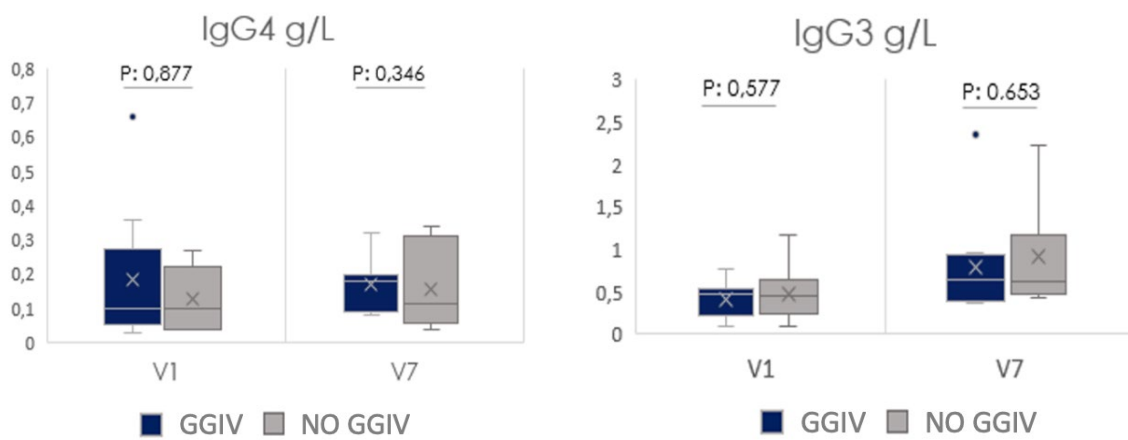
En la V1 del ensayo clínico, las subclases de IgG fueron similares en ambos grupos (Figura 14 y Figura 15). En V7, los niveles de IgG1 fueron significativamente más altos en el grupo de GGIV. Se demostraron niveles significativamente más altos de anti-citomegalovirus IgG específico, anticuerpos IgG anti-toxina A y B de *Clostridium difficile* y toxoide antitetánico IgG1 en V7 en pacientes que recibieron GGIV en comparación con pacientes que fueron tratados con terapia antimicrobiana sola (Figura 16, Figura 17 y Figura 18).

FIGURA 14. DINÁMICA DE LAS SUBCLASES IGG1 E IGG2



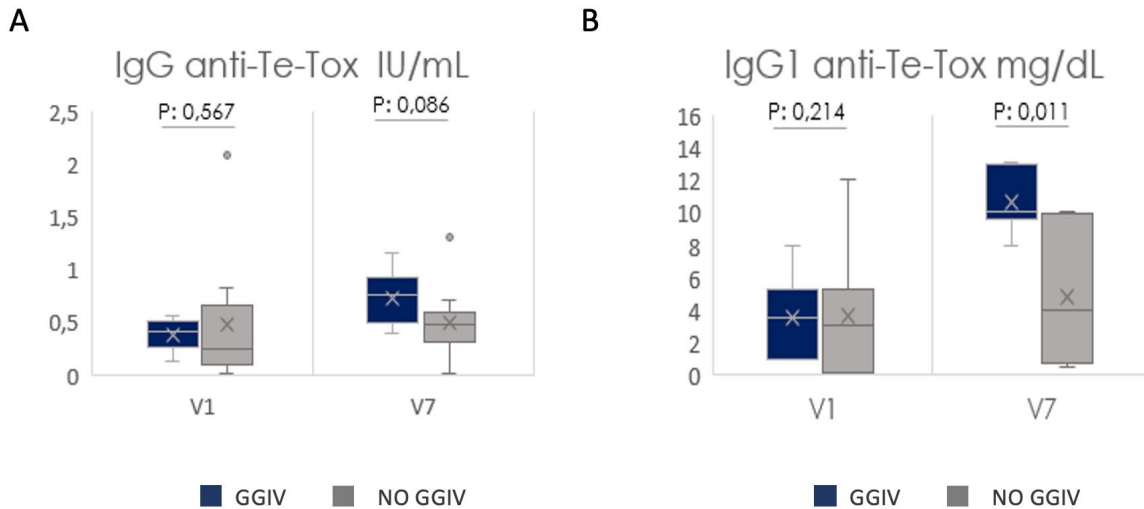
GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de aleatorización. V7= Visita 7 al día 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo No-GGIV. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 15. DINÁMICA DE LAS SUBCLASES IGG3 E IGG4



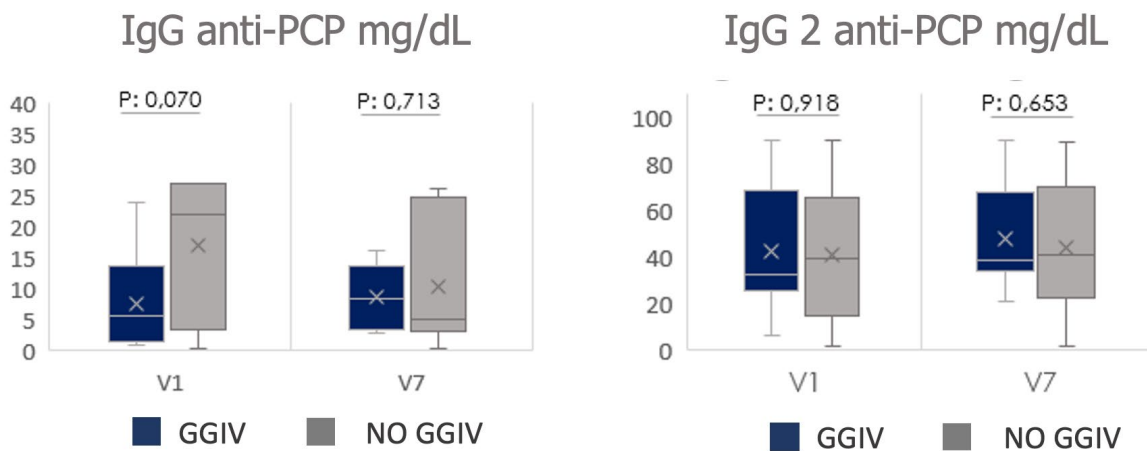
GGIV: Gamma inmunoglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de aleatorización. V7= Visita 7 al día 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo No-GGIV. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 16. DINÁMICA DE ANTICUERPOS IGG ESPECÍFICOS FRENTE A ANTÍGENOS TOXOIDE TETÁNICO



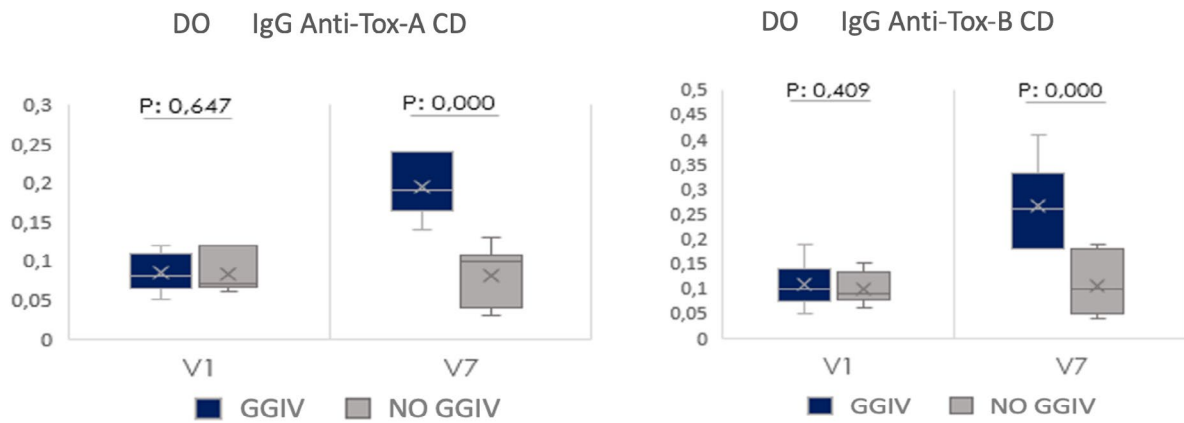
A. Anticuerpos IgG Anti-toxide tetánico y B. Anticuerpos IgG 1 Anti-toxide tetánico GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7= Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV. Anticuerpos IgG anti-Te-Tox: Anticuerpos IgG Anti-toxide tetánico. DO: Densidad óptica. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 17. DINÁMICA DE ANTICUERPOS IGG ESPECÍFICOS FRENTE A ANTÍGENOS POLISACÁRIDO NEUMOCÓCICO



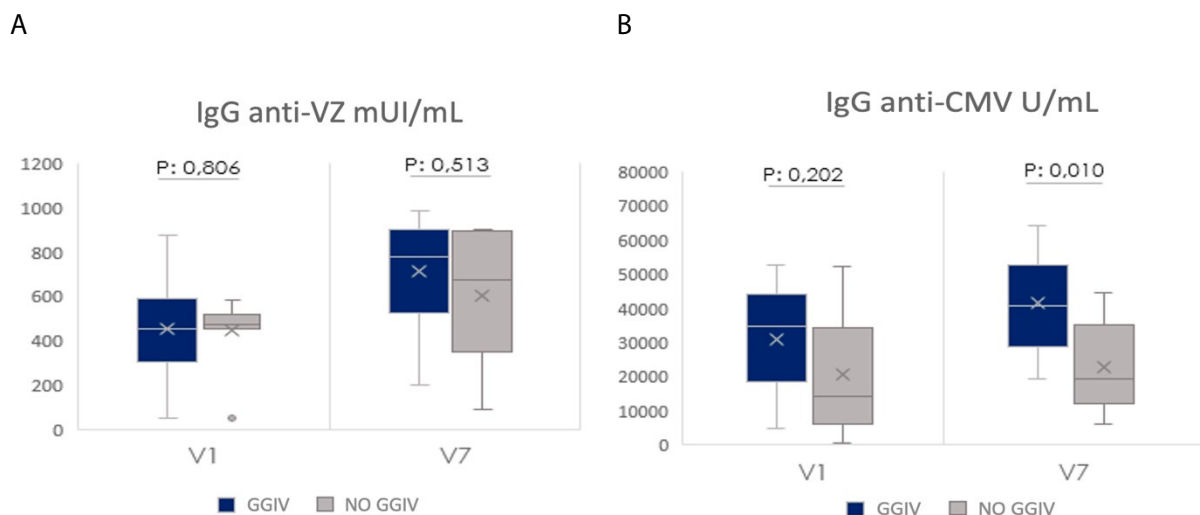
A. Anticuerpos IgG Anti-PCP y B. Anticuerpos IgG2 Anti-PCP. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7= Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV. Anticuerpos IgG anti-PCP: Anticuerpos IgG anti- polisacárido neumocócico. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 18. DINÁMICA DE ANTICUERPOS IGG ESPECÍFICOS FRENTE A ANTÍGENOS TOXINA A Y B DE *Clostridium difficile*



A. Anticuerpos IgG Anti-toxina A de *Clostridium difficile* y B. Anticuerpos IgG Anti-toxina B de *Clostridium difficile*. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7= Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV; IgG anti- Tox-A CD: Anticuerpos IgG Anti-toxina A de *Clostridium difficile*. DO: Densidad óptica. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 19. DINÁMICA DE ANTICUERPOS IGG ESPECÍFICOS FRENTE A ANTÍGENOS DE Citomegalovirus y el Virus de la Varicela-Zóster



A. Anticuerpos IgG anti-VZ y B. Anticuerpos IgG anti-CMV. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7= Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV. Anticuerpos IgG anti-CMV: Anticuerpos IgG anti-citomegalovirus. Anticuerpos IgG anti-VZ: Anticuerpos IgG anti-varicela zóster. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

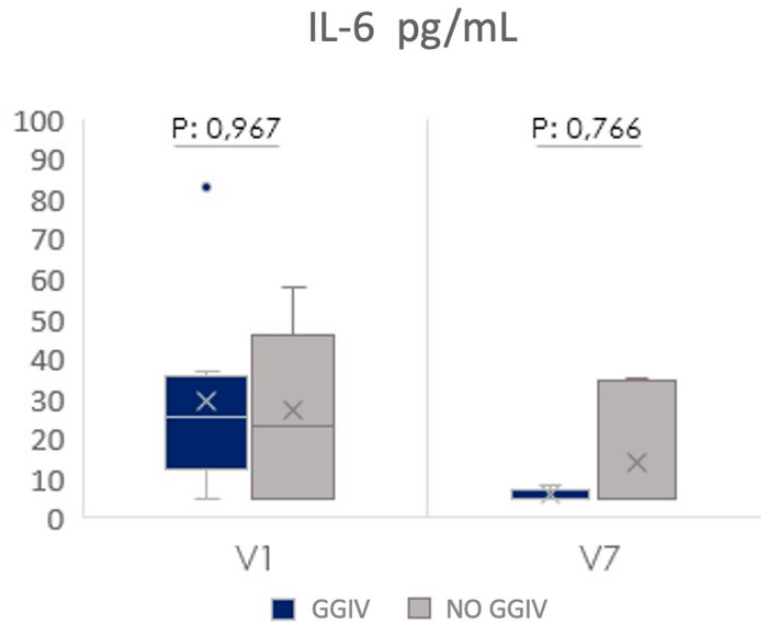
Comparamos las diferencias por grupo entre los niveles basales y de la visita 7 y encontramos una diferencia significativa en el nivel de anticuerpos IgG anti-citomegalovirus, anticuerpos IgG anti-toxinas A y B del *Clostridium difficile*, anticuerpos IgG e IgG1 anti-*clostridium tetani* y anticuerpos IgG anti-varicela zóster en pacientes tratados con GGIV, pero ninguno en el grupo de terapia antimicrobiana (Tabla 56). Se demuestra disminuciones significativas (V1 - V7) de IL-6 y BAFF en pacientes tratados con GGIV (Tabla 56 y Figura 20, Figura 21). También se observó una disminución significativa de IL-6 en pacientes sin GGIV. Los niveles de IgD se mantuvieron estables en el brazo de GGIV, pero aumentaron significativamente en los pacientes no tratados con GGIV (Tabla 56 y Figura 22).

TABLA 56. CINÉTICA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS Y OTROS BIOMARCADORES EN SUERO

Parámetro	GGIV + TAMC			TAMC		
	V1	V7	Valor p	V1	V7	Valor p
Anti-CMV U/mL	31009	91509	0.047	20835	22931	0.760
IgG Anti-VVZ	456.3	712.9	0.002	450.6	603.4	0.101
IgG Anti-PCP mg/dL	7.66	8.52	0.708	16.05	10.44	0.067
IgG2 Anti-PCP mg/dL	42.16	48.05	0.239	40.73	43.71	0.708
Anti-Toxina A- CD DO	0.084	0.195	<0.001	0.083	0.082	0.965
Anti-Toxina B- CD DO	0.108	0.265	0.001	0.098	0.105	0.763
IgG Anti-CT	0.360	6.025	<0.001	0.468	0.496	0.809
IgG1 Anti-CT	3.53	10.67	<0.001	3.63	4.78	0.488
IL-6	29.03	5.51	0.016	26.73	13.66	0.043
BAFF	1329.1	575.3	0.027	1487.07	799.13	0.115
IgD	227.9	214.7	0.906	108.26	187.91	0.031

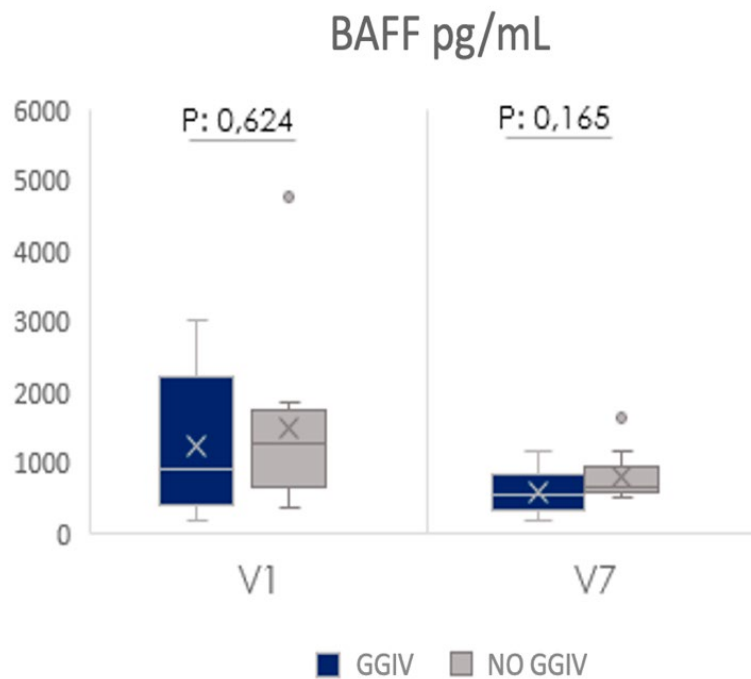
TAMC: Terapia antimicrobiana convencional. GGIV: Gammaglobulina intravenosa. CMV: Citomegalovirus. VZ: varicela zóster. PCP: Polisacárido neumocócico. CD: *Clostridium difficile*. CT: *clostridium tetani*. DO: Densidad óptica. DE: Desviación estándar. V1: Visita 1 del ensayo clínico (enrolamiento y aleatorización). V7: Visita 7 al día 30-45 días después de la última dosis de GGIV. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 20. DINÁMICA DE LA IL-6 ENTRE LA V1 Y V7



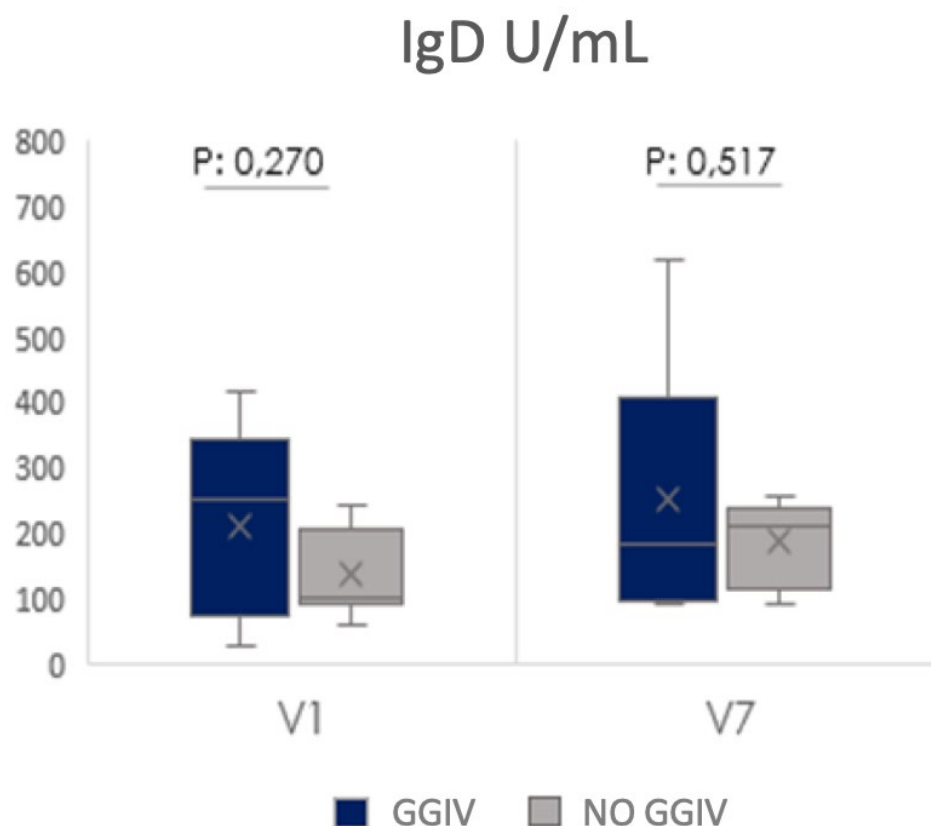
GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7: Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 21. DINÁMICA DE BAFF ENTRE LA V1 Y V7



GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7= Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV. BAFF: Factor activador de linfocitos B pertenecientes a la familia TNF. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 22. DINÁMICA DE LA IGD



GGIV: Gammaglobulina intravenosa. V1: Visita 1 en el momento de la aleatorización. V7= Visita 7 hasta 30-45 días después de la última dosis de GGIV o tiempo similar en el grupo sin GGIV. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

5.7 DISCUSIÓN

5.7.1 EFICACIA

En el ensayo clínico multicéntrico, prospectivo y aleatorizado, se demuestra que la adición de GGIV a la terapia antimicrobiana convencional se asocia a una menor tasa de reinfección tras esta intervención.

Existe poca experiencia previa en la administración de GGIV en el campo del trasplante de órganos sólidos en el momento de una infección grave cuando se demuestra una inmunodeficiencia de anticuerpos, pero se ha utilizado en deficiencias de anticuerpos primarias y secundarias con resultados alentadores y los autores creen que es el método más rápido y confiable para obtener mejores concentraciones de anticuerpos relevantes⁷.

En receptores de órganos sólidos con infecciones graves y deficiencia secundaria de anticuerpos, el potencial de la inmunoterapia con GGIV para reducir el número de reinfecciones se ha descrito previamente en estudios retrospectivos⁷. En el metanálisis, se ha descrito que el uso de GGIV reduce la mortalidad en los receptores de trasplante de corazón en comparación con aquellos con hipogammaglobulinemia que no reciben GGIV, o mejora la mortalidad al nivel equivalente con aquellos sin hipogammaglobulinemia en los receptores de trasplante de pulmón¹⁰. En el ensayo clínico, la mediana del número de reinfecciones fue menor en los pacientes tratados con GGIV, pero la diferencia no fue significativa.

El reemplazo de GGIV fue independiente como factor protector para el desarrollo de reinfecciones graves después del ajuste por factores de riesgo clínicos que resaltan el papel potencial de esta intervención.

En enero de 2019, la AEMPS actualizó la indicación de productos GGIV en inmunodeficiencias secundarias en pacientes que padecen infecciones graves o recurrentes, tratamiento antimicrobiano ineficaz y falla de anticuerpos específicos demostrada o nivel sérico de IgG <400 mg/dL¹².

La selección del punto de corte para la intervención de la hipogammaglobulinemia IgG (IgG <600 mg/dL) de este ensayo clínico se diseñó antes de la directriz actualizada de la AEMPS y está de acuerdo con el punto de corte de la hipogammaglobulinemia IgG que se ha evaluado en distintos estudios multicéntricos. como factor de riesgo de infección grave en receptores cardíacos y pulmonares⁴⁻⁶. Solo 10 pacientes (22,7%) en nuestro ensayo clínico revelaron hipogammaglobulinemia IgG grave en el momento de la aleatorización. Este hecho impidió a partir de realizar un análisis de subgrupos en estos pacientes con hipogammaglobulinemia severa.

El diseño de nuestro estudio (incluido el tiempo de administración temprano después del diagnóstico de la infección, número de dosis y horario) es único, por lo que será un desafío analizarlo en comparación con otros protocolos que puedan evaluarse en el futuro en este campo, es decir con dosis únicas, más cortas o prolongadas de GGIV. La directriz de la AEMPS no incluye ninguna directriz específica sobre el tiempo de la terapia de reemplazo en receptores de órganos sólidos.

En el estudio actual, la selección de un protocolo fijo de 5 dosis para el reemplazo de GGIV se basó en los resultados de un estudio de prueba de concepto previo del uso de GGIV para prevenir infecciones en receptores cardíacos en el que se demostró un menor riesgo de infección grave con una media de 3 dosis de GGIV⁸. Los estudios retrospectivos previos de un solo centro no lograron encontrar un impacto positivo en el uso de GGIV en pacientes con hipogammaglobulinemia.¹³ En uno de estos estudios, el primer reemplazo de IgG se produjo en una mediana de 323,5 días después del trasplante y los pacientes recibieron una mediana de 2 dosis de GGIV, mientras

que en nuestro estudio usamos 5 dosis (dosis total de 90 gramos)¹⁴. Se necesitan más ensayos clínicos en este campo para definir mejor el protocolo más adecuado.

El hecho de que los niveles basales de IgG fueron más bajos en el grupo de GGIV y de que el 70% de los pacientes con hipogammaglobulinemia grave de IgG se encontraran por casualidad en este grupo, destaca el posible papel protector de la administración de GGIV en este ensayo clínico.

5.7.2 SEGURIDAD

La mayoría de los eventos adversos informados durante el ensayo fueron leves y tolerables, incluso durante las primeras administraciones de GGIV. Se encontró que los receptores de GGIV tenían una concentración de urea significativamente más alta en distintas visitas después de V1 del ensayo clínico. Sin embargo, los niveles de creatinina fueron similares en ambos grupos durante todas las visitas de seguimiento. No recuperamos información sobre el aclaramiento de creatinina en nuestra base de datos. El efecto potencial de niveles más altos de urea en pacientes tratados con GGIV debe evaluarse más a fondo en ensayos clínicos futuros. Hasta la fecha no podemos descartar el efecto de nuestra intervención en el desarrollo de trombosis venosa profunda en un paciente que reveló factores de riesgo para el desarrollo de esta complicación. También se observó un evento trombotico en un paciente del grupo sin GGIV. El protocolo no pudo prevenir la recurrencia de una infección bacteriana grave que provocó la muerte en un caso en el brazo de GGIV.

5.7.3 INMUNIDAD HUMORAL

Realizamos un subestudio para evaluar la dinámica de la reconstitución de la inmunidad humoral específica para comprender mejor los posibles mecanismos de acción de la GGIV.

Nuestro estudio mostró un aumento muy modesto en las subclases de IgG en suero, incluida solo la subclase de IgG1. No encontramos un efecto significativo de la GGIV en la reconstitución de otras subclases de IgG que circulan a una concentración más baja que la IgG1, posiblemente relacionado con el tratamiento de corta duración en comparación con el tratamiento más prolongado en estudios previos realizados en otros entornos clínicos.

Sin embargo, por primera vez se demuestra que las infusiones de la GGIV se asociaron con un aumento en los niveles de anticuerpos antimicrobianos IgG específicos distintos que son importantes

para el control de complicaciones infecciosas específicas que se observan en el trasplante de órganos sólidos. No se observaron elevaciones significativas de anticuerpos específicos en el grupo de terapia antimicrobiana sola. Todos estos resultados sugieren que la GGIV se asocia con la reconstitución de la inmunidad humoral específica y probablemente pueda contribuir de forma adecuada para intentar obtener una respuesta inmunitaria eficaz frente a infecciones virales y bacterianas. El perfil inmunológico de la reconstitución de anticuerpos específicos fue más claro que la reconstitución adecuada de los niveles de IgG, lo que sugiere que es posible que la reconstitución de anticuerpos específicos sea más importante que la sustitución adecuada de la IgG total. Dado que el estudio de anticuerpos específicos solo se realizó como subestudios en el centro coordinador de Madrid, no hemos analizado el impacto de la sustitución de anticuerpos específicos con el desarrollo de reinfección.

Se debe considerar que el protocolo GGIV también podría tener un impacto en otros resultados clínicos más allá de los tres meses del protocolo del estudio. La GGIV podría conferir cierto grado de tolerancia inmunitaria. Se ha descrito que la GGIV modula las reacciones inflamatorias *in vivo*, ya sea directamente al disminuir la activación de las células inmunitarias o indirectamente mediante la modulación de los receptores.¹⁴ En este sentido, nuestros resultados mostraron influencia de GGIV en los niveles de BAFF e IL-6 que fueron significativamente más bajos en V7 en comparación con los niveles basales en el momento del diagnóstico de la infección grave. El papel de IL-6 y BAFF en la patogenia del rechazo se ha demostrado previamente en el trasplante de órgano sólido¹⁵⁻¹⁷. Ha sido informado previamente sobre alteraciones de subconjuntos de células B vírgenes y de memoria y su asociación con el riesgo de rechazo e infección en receptores cardíacos¹⁸. El seguimiento prolongado para observar el impacto potencial de la GGIV en otros resultados clínicos, como el rechazo agudo y crónico, podría ser esclarecedor. Se ha descrito un aumento de los niveles de IgD en pacientes con infecciones. En nuestro estudio, los niveles de IgD se mantuvieron estables en el brazo de GGIV, mientras que hubo un aumento significativo en pacientes sin GGIV, lo que podría sugerir otro mecanismo inmunomodulador potencial de la GGIV.

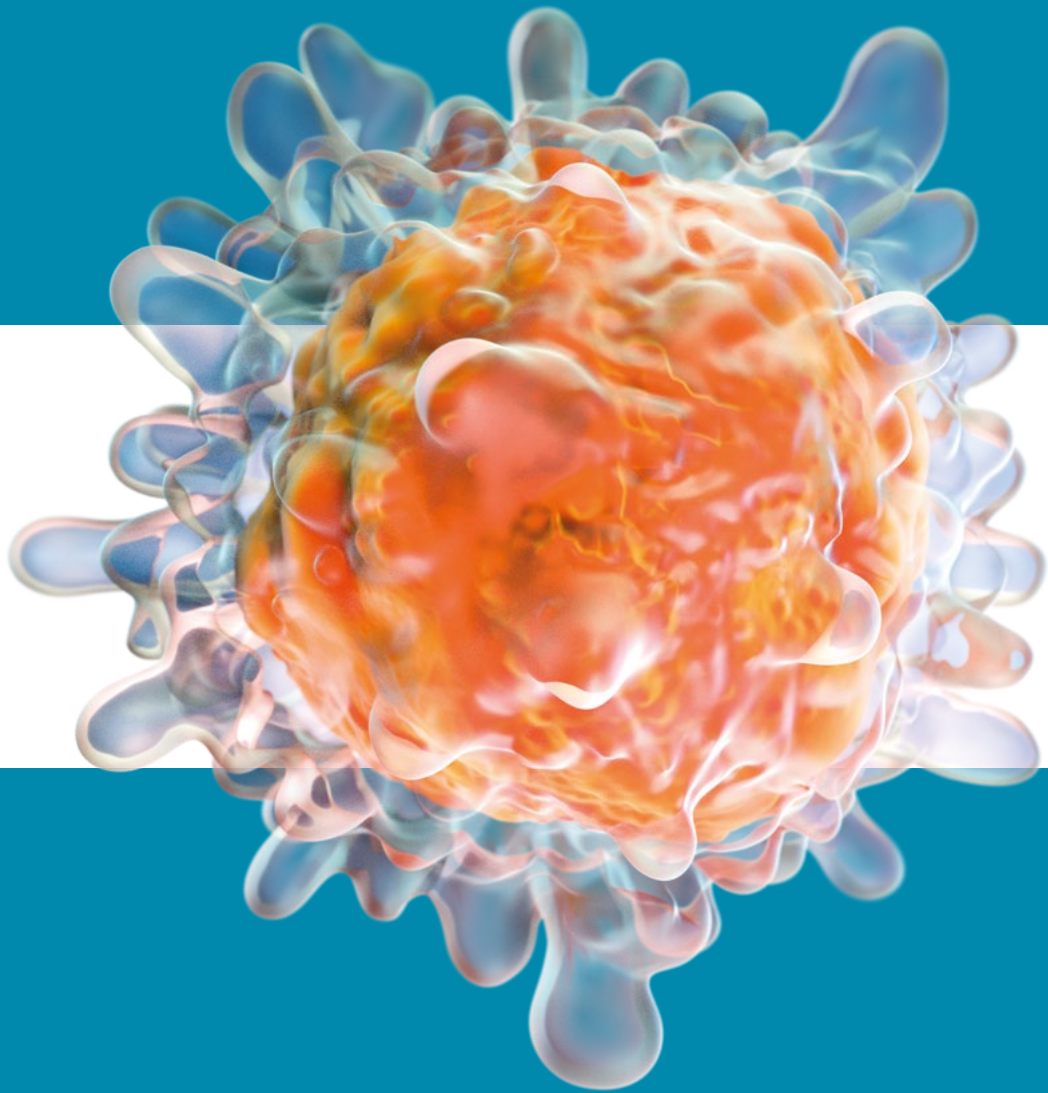
Teniendo en cuenta todos los hallazgos previos con respecto a las pruebas de IgG en trasplantados de órgano sólido para detectar el riesgo de infección, y los estudios retrospectivos que sugieren el papel potencial de la terapia de reemplazo de GGIV en este contexto, se recomienda evaluaciones adicionales para analizar la eficacia y seguridad en estudios futuros con un mayor número de pacientes.

5.8 LIMITACIONES

Nuestro estudio tuvo varias limitaciones. Un desafío para interpretar nuestros resultados es tener un tamaño de muestra pequeño, aunque existe la posibilidad, no está del todo claro que tener más participantes podría significar un resultado similar. Se incluyeron muy pocos pacientes receptores de hígado y riñón y el pequeño número nos impidió realizar análisis separados por tipo de trasplante de órgano sólido o por tipo de resultados infecciosos o por diferentes niveles de hipogammaglobulinemia. Incluso la mayoría de las características iniciales de los participantes fueron similares al grupo de GGIV revelado por casualidad niveles más bajos de IgG. Además, aunque la reconstitución de la respuesta de inmunidad humoral a la GGIV fue muy prometedora, el tamaño del efecto ha sido modesto y persisten oportunidades para mejorar la eficacia de esta estrategia. También es importante considerar si el protocolo de cinco dosis es suficientemente bueno. Varias subclases de IgG y anticuerpos específicos no aumentaron con las infusiones de GGIV. Queríamos determinar el efecto de este enfoque como una forma principal de introducción pasiva de la inmunidad humoral y asegurarnos de que los anticuerpos específicos ejerzan efectos en este entorno clínico de alto riesgo en los receptores de órgano sólido. Sin embargo, el efecto limitado sobre la dinámica de otros anticuerpos específicos y el hecho de que se tratara de un subestudio realizado solo en un centro no permitió sacar conclusiones contundentes al respecto.

5.9 CONCLUSIONES

- La combinación de GGIV y terapia antimicrobiana administrada a receptores de órganos sólidos con infección severa e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos disminuye la tasa de episodios de reinfección.
- La terapia con GGIV en combinación con la terapia antimicrobiana convencional es bien tolerada y no se relaciona con eventos adversos graves.
- La terapia con GGIV se asocia a niveles más altos de anticuerpos IgG anti-citomegalovirus, anticuerpos IgG anti- toxinas A y B del *Clostridium difficile*, anticuerpos IgG e IgG1 anti-clostridium tetani y anticuerpos IgG anti-varicela zóster en pacientes tratados.
- La terapia con GGIV se asocia a disminuciones significativas de BAFF en pacientes tratados.
- La terapia con GGIV se asocia a niveles normales de IgD en los pacientes tratados.



PARTE II

PARTE II

6. ESTUDIO 1

Evaluación de la función inmunomoduladora *in-vitro* de las células mesenquimales de placenta humana frente a la respuesta celular T de los pacientes recuperados de COVID-19 severo y crítico

6. ESTUDIO 1

Evaluación de la función inmunomoduladora *in-vitro* de las células mesenquimales de placenta humana frente a la respuesta celular T de los pacientes recuperados de COVID-19 severo y crítico

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del Coronavirus (COVID-19) es causada por el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2).¹⁹ El virus se expandió sin control forzando a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar una emergencia de salud global el 30 de enero del 2020.²⁰ Hasta la fecha, los casos totalizan más de 314 millones y 5,5 millones de muertes desde que se reportó el primer caso en Wuhan, China en diciembre del 2019.²¹

Aunque la mayoría de los pacientes sólo experimentan síntomas leves o incluso son asintomáticos, los pacientes con más de 60 años y aquellos con comorbilidades como enfermedades pulmonares, hipertensión arterial, diabetes mellitus, enfermedades renales crónicas, enfermedades pulmonares crónicas, fumadores, cáncer o trasplantes de órganos sólidos o células madre hematopoyéticas requieren hospitalización casi seis veces más que aquellos sin esas condiciones médicas (45.4% vs 7.6%) y usualmente se deterioran hacia casos severos o críticos, presentando el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y fallos multiorgánicos que requieren tratamiento de cuidados intensivos (UCI) con una tasa de mortalidad alta (19.5% vs 1.6%).²² Además, los pacientes masculinos tienen un riesgo mayor de desarrollar una enfermedad severa y una mayor probabilidad de mortalidad por COVID-19 que las pacientes femeninas.²³

El SARS-CoV-2 es un virus con envoltura esférica que contiene RNA monocatenario positivo de aproximadamente 30Kb²⁴. Está rodeada por una membrana con diversas proteínas embebidas como la

espícula (S), nucleocápside (N) y membrana (M) entre otras²⁵. Durante la internalización del virus la proteína S se enlaza con los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) en la célula huésped y, entonces la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) activa la proteína S para la internalización mediante la fusión con la membrana huésped.^{26,27} El RNA viral monocatenario o bicatenario vinculado al patrón molecular asociado al patógeno (PAMPs) puede ser identificado por los receptores de reconocimiento de patrones (PPRs) incluyendo los receptores tipo Toll (TLRs) y receptores tipo RIG (RLRs) en las células huésped.²⁸

Los factores reguladores de interferón 3 (IRF3), 7 (IRF7) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) se activan después del reconocimiento de PAMPs para inducir la producción de IFN-I y citocinas pro-inflamatorias, respectivamente.²⁹ La linfopenia es un rasgo característico en los pacientes con COVID-19 y se correlaciona con la enfermedad grave.^{30,31} Otras condiciones relacionadas incluyen la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE)^{32,33}, neutrofilia,^{34,35} disregulación de monocitos y macrófagos^{36,37}, reducción o respuesta retardada al interferón tipo I (IFN-I),³⁸⁻⁴⁰ y tormenta de citoquinas (CS).^{41,42}

La respuesta de las células colaboradoras T CD4+ específicas del SARS-CoV-2 está dirigida contra las 3 proteínas.⁴³ Utilizando las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) derivadas de los casos convalecientes de COVID-19, Grifoni et al reportaron que las células T CD4+ específicas del SARS-CoV-2 eran funcionales, ya que las células produjeron IL-2 en respuesta a la asociación de péptidos de las proteínas S-, N-, M- y otras, y la polarización celular parecía ser un tipo clásico de Th1, ya que produjo interferón gamma (IFN- γ) en cantidades importantes, mientras que poca o ninguna de IL-4, IL-5, IL-13 o IL-17A fueron expresados. Del mismo modo, se detectaron respuestas de las células T CD8+ mediante marcadores inducidos por activación (CD69+CD137+) en el 70% de los casos de COVID-19 estudiados y, de forma independiente, se detectaron las células T CD8+ IFN- γ + específicas del SARS-CoV-2. Estas células IFN- γ + co-expresaron granzima B y, además, una fracción sustancial de las células IFN- γ + expresó el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Por lo tanto, la mayoría de los pacientes con COVID-19 recuperados generaron una respuesta sustancial de las células T CD4+ y las células T CD8+ frente al SARS-CoV-2.⁴³ Esta respuesta de células T puede ser la razón principal de la enfermedad crítica.⁴⁴

También, Adamo et al, encontraron una extensa disfunción y apoptosis de las células T estrechamente asociada con una respuesta inmune innata altamente inflamatoria en pacientes con COVID-19 grave que se asocia con signos de proliferación homeostática y de recuperación celular T.⁴⁵

La presencia de células T CD4 + y T CD8+, co-productoras de IFN- γ y TNF- α , sugiere un fenotipo efector /de memoria⁴⁶ y probablemente protección a largo plazo.⁴⁷⁻⁴⁹ La respuesta inmune T helper 1 tiene un papel decisivo durante la respuesta adaptativa, y en consecuencia activa el contraataque

inmune humoral,⁵⁰ que actúa como un escudo inmune junto con anticuerpos neutralizantes.⁵¹ Sin embargo, los correlatos de protección *in vivo* aún no son bien conocidos contra la infección por SARS-CoV-2 y se necesitan más estudios.

Las células madre mesenquimales (MSCs) pueden ejercer sus efectos inmunomoduladores sobre las células del sistema innato⁵² y adaptativo^{53,54} a través del contacto directo célula-célula⁵⁵, del efecto paracrino⁵⁶ y a través de la liberación de factores solubles como indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO)⁵⁷, prostaglandina E2, hemo-oxigenasa-1, factor de crecimiento hepático, galectina-3⁵⁸, el ligando de muerte programada (PD-1)⁵⁹, factor de crecimiento transformador- β e IL-6.^{53,60,61} Las MSCs adicionalmente, producen vesículas extracelulares (VE) que contienen una gran cantidad de proteínas moduladoras, RNA mensajeros y microRNAs (miRNA).^{62,63} Las VE derivadas de las MSCs pueden inhibir la función celular T, B y natural killer (NK), posiblemente a través del transporte de miRNA-155 y miRNA-146 a la célula diana.^{64,65} Por tanto, las MSCs puede disminuir la sobre-activación del sistema inmune⁶⁶⁻⁶⁸ a través de la unión del ligando-receptor o por internalización para modular la respuesta celular.⁶⁹⁻⁷¹

Las funciones efectoras de las células T específicas virales pueden ser afectadas por las MSCs. Por una lado, Karlsson et al. encontró que las MSCs tienen poco efecto inhibitorio en la respuesta antiviral de las células T y evidenció que las células T citotóxicas específicas del VEB (CTL) o CTL-CMV cultivadas con las MSCs retuvieron la capacidad de proliferar y producir IFN- γ en respuesta a antígenos virales y para eliminar células infectadas por el virus *in-vitro*.⁷² Sin embargo, se cree que el IFN- γ derivado de las MSCs es responsable de compensar el efecto inmunosupresor de las MSCs mediando las respuestas parciales de la CTL durante la infección viral.⁷³ Los efectos duales de las MSCs sobre la respuesta inmune fueron confirmados posteriormente por Li et al. en el que la IDO es responsable de cambiar un fenotipo inmunomodulador a potenciador inmune.⁷⁴ Las MSCs suelen ser resistentes a las infecciones virales en comparación con las células más diferenciadas por los genes inducidos por IFN (ISG) que pueden dirigirse en muchas etapas durante el ciclo viral, evitando así que los virus pasen por encima de la membrana celular, bloqueando la ruta endocítica, transcripción de ARNm, importación nuclear de ARNm, integración y amplificación del genoma, traducción de proteínas, ensamblaje y liberación del virus.⁷⁵⁻⁷⁷ Entre las ISGs expresadas en las MSCs destacan PMAIP1, ISG15, IFI6, IFITM, SAT1, p21/CDKN1A, SERPINE1 y CCL2.^{75,78} Limitando muchas infecciones virales *in vitro*, como el dengue, el ébola, el SARS y los virus de la influenza A.⁷⁶ Wu et al reportó que al silenciar la expresión de p21/CDKN1A, resultó en una mayor susceptibilidad de las MSCs a la infección por el virus chikungunya. Aunque, al silenciar el IFITM3, las MSCs se volvieron más susceptibles al virus de la fiebre amarilla y a la infección por el virus del zika.^{75,78} En presencia de IFN- γ , se inducen ISGs no constitutivas, incluyendo MT1G, CD74, SERPING1, IFNAR2 y MT1X.⁷⁵ Además de la alta expresión de ISGs constitutivas de las MSCs, la regulación por incremento de ISGs no constitutivas tras la activación de las MSCs, representa una “capacidad de ajuste” para mejorar

la capacidad antiviral. Esta característica de las MSCs puede ser beneficiosa en el contexto de infecciones del tracto respiratorio⁷⁵.

El "licenciamiento" (del inglés "licensing" definido como un proceso de maduración funcional de las MSCs mediante las citocinas inflamatorias como IFN- γ o TNF- α para aumentar sus propiedades inmunosupresoras) de las MSCs puede mejorar sus propiedades inmunomoduladoras. La activación con IFN- γ induce la expresión de IDO en las MSCs a través de la vía JAK-STAT1 aumentando la modulación de las células inmunitarias activadas, incluidas las células T.^{79–83}

Kane y cols. sugieren que el efecto de la IDO puede estar en relación al agotamiento del triptófano que limita la biosíntesis de proteínas virales, al observar la reducción de viriones VIH-1/2 tras la exposición de células activadas *in-vitro* con IFN- γ ⁸⁴. Así como la función inmunomoduladora de IDO, también parece ser una molécula antiviral fundamental secretada por las MSCs, otro mecanismo antiviral descrito de las MSCs es la liberación de miRNAs no codificantes. Qian et al describió que algunos miRNAs tenían una potente actividad antiviral al dirigirse a la replicación viral y mostró que la actividad antiviral de las MSCs contra el virus de la hepatitis C (VHC) es conferida principalmente por Let-7f, miR-145, miR-199a y miR-221 presentes en las VE.⁸⁵

También Sundin et al. que demostró que la proliferación de linfocitos inducida por el antígeno del CMV se suprimió en presencia de las MSCs⁸⁶, además, Malcherek et al. encontró que las MSCs suprimieron la proliferación y la liberación de IFN- γ de las células T específicas para el virus Influenza y de CMV⁸⁷. También se demostró que las MSCs del cordón umbilical inhiben la citotoxicidad de las células T V γ 9V δ 2 contra el virus de la gripe H1N1 *in-vitro*.⁸⁸

La enfermedad COVID-19 ha estimulado una investigación sin precedentes tanto de vacunas^{89,90} como de terapias avanzadas para reducir las muerte y la enfermedad grave^{91–94} y se han realizado varios estudios y ensayos clínicos sobre las MSCs⁹⁵

En el estudio START fase IIa, ensayo clínico randomizado, doble ciego de 60 pacientes enrolados, Matthay y sus colegas evaluaron el tratamiento con una sola dosis de las MSCs de médula ósea versus placebo en pacientes con ventilación mecánica con SDRA moderado y severo en 5 centros en USA y reportaron que no se observó algún evento respiratorio adverso o hemodinámico durante la administración de las MSCs y seis horas después, concluyendo que fue seguro en ambos grupos de SDRA moderado y severo. Sin embargo, no hubo diferencia estadística en relación a la mortalidad comparando con el placebo.⁹⁶ También, Zheng et al llevó a cabo un ensayo clínico, doble ciego de fase I y evaluó la seguridad de la administración endovenosa de una dosis de 1×10^6 células/kg de las MSCs de tejido adiposo en 12 pacientes con SDRA y reportó la ausencia de toxicidad durante la infusión o eventos adversos serios.⁹⁷

Simonson et al en el 2015, reportaron la recuperación de dos pacientes con falla orgánica múltiple por SDRA severa refractaria a las terapias de soporte tras la infusión de 2×10^6 células/kg.⁹⁸ Además, el estudio MUST-ARDS, un ensayo clínico exploratorio, randomizado, doble ciego controlado con placebo, fase 1/2 realizado por Athersys entre USA y UK concluyeron que la terapia con las MSCs de médula ósea, MultiStem®, fue segura y tolerable durante las 4 horas de la administración y no se observó reacciones adversas serias en las 24 horas posterior a la infusión en 6 pacientes inicialmente y en la fase 2a, 20 pacientes fueron tratados con 900 millones de células MultiStem® y 10 pacientes recibieron placebo. También redujo la tasa de la mortalidad, los días libre de ventilador y días libres de UCI en el primer mes posterior al diagnóstico comparado con el placebo.⁹⁹ Debido al número relativamente pequeño de pacientes que han recibido terapia con las MSCs para SDRA, aún se requieren más investigaciones para confirmar su eficacia y actualmente varios ensayos clínicos se encuentran en curso.

En abril de 2020, Leng y Zhao, publicaron los resultados de un estudio con siete pacientes con COVID-19, que incluyeron 1 paciente críticamente grave, 4 pacientes graves y 2 tipos moderados que desarrollaron neumonía y fueron enrolados para una infusión intravenosa de las MSCs, y tres pacientes graves se enrolaron como control para recibir placebo. Después de 2-4 días de infusión de las MSCs, los síntomas clínicos desaparecieron. En el paciente gravemente crítico, el nivel de proteína C reactiva disminuyó y la linfopenia mejoró significativamente después de la infusión. Las imágenes radiológicas se redujeron y los parámetros inmunológicos se restauraron a un nivel normal.¹⁰⁰ Además, Liang B et al informaron el caso de una mujer de 65 años, una paciente con COVID-19 críticamente enferma con posibles efectos secundarios del corticosteroide, que recibió las MSCs alogénicas de cordón umbilical humano (hUCMSC) por vía intravenosa 3 veces y después de la tercera dosis, la paciente abandonó la unidad de cuidados intensivos.¹⁰¹

Posteriormente, el estudio de fase II con PLacental eXpanded (PLX-PAD) de una placenta humana también fue utilizado en julio de 2020 para tratar a 20 pacientes con COVID-19 con un buen perfil de seguridad general y mejoría clínica.¹⁰² Feng et al y Feng G. publicaron dos estudios, un estudio piloto y un estudio de seguimiento de 3 meses que indicaron la seguridad relativa y la eficacia preliminar de las hUCMSC para pacientes con COVID-19 grave.^{103,104} Con respecto a las vesículas extracelulares, en un ensayo abierto no randomizado para evaluar la seguridad y eficacia de los exosomas derivados de la médula ósea como tratamiento para COVID-19 severo en 24 pacientes con fallo respiratorio moderado y severo, Sengupta et al reportaron que no se observaron eventos adversos 72 horas posterior a la administración de 15ml IV de ExoFlo™ además de una tasa de supervivencia de 84%. 17 (71%) de 24 pacientes se recuperaron y/o fueron dados de alta del hospital con una media de 5.6 días tras la infusión intravenosa de ExoFlo™, 3 de 24(13%) permanecieron en situación crítica aunque estables y 4(16%) de 24 fallecieron por motivos no relacionados con el tratamiento.¹⁰⁵

Debido al perfil de coagulación anormal que se observa en muchos pacientes de UCI críticamente enfermos, es necesario evaluar el tipo de tejido elegido considerando que los productos de las MSCs expresan niveles variables de factor tisular altamente pro-coagulante (TF / CD142).¹⁰⁶ Se observa algunos tópicos por resolver relacionados a la ampliación y expansión a gran escala de un futuro tratamiento sin perder la traslación clínica efectiva como por ejemplo, el grado de expansión celular a partir de un tipo de tejido o la viabilidad celular tras la descongelación. Se requieren mejorar el nivel de preparación de los productos y ensayos clínicos que los respalden.^{106,107}

Cuando comparamos la placenta humana con otras fuentes celulares en estudios preclínicos, además del buen perfil de seguridad y baja inmunogenicidad, observamos que la placenta tiene alta disponibilidad puesto que se puede obtener después del nacimiento sin procedimientos invasivos e incluso es considerado como un residuo biológico y de este modo se evita las tensiones éticas asociadas a otras fuentes celulares. Lo anterior, proporciona una sólida justificación para investigar las células perinatales como una terapia innovadora potencial en humanos.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

En la actualidad, no existe tratamiento protocolizado para los pacientes con COVID-19 grave y críticamente enfermos y hay numerosas evidencias experimentales que avalan los efectos beneficiosos y la aplicación de las pMSCs o de su secretoma. En este estudio, evaluamos la capacidad inmunomoduladora de las IpMSCs recolectadas del corion CD106+¹¹¹ para reducir la respuesta linfocitaria T frente a las proteínas S-, N- y M- en pacientes recuperados de COVID-19 severo y crítico.

6.1 DESCRIPCIÓN DE LOS MARCADORES DE ACTIVACIÓN

Los marcadores superficiales de activación utilizados fueron CD69, CD134 y CD137 que describo a continuación:

CD69: es una estructura dimérica con enlace disulfuro de 60 kDa, conocida como molécula inductora de activación. Esta estructura contiene dos formas glicosiladas diferencialmente (33 y 27 kDa) de una única proteína central, que están asociadas de forma covalente. Este marcador de activación es una de las glicoproteínas de superficie celular más tempranas (antes de otros marcadores de activación como IL2-R) después de la activación de los linfocitos T o B, pero está ausente en los linfocitos en reposo. También se expresa por macrófagos activados, linfocitos NK y otros tipos de células, incluidos neutrófilos, eosinófilos y plaquetas. Aunque el papel preciso de la expresión de CD69 en la función de las

células inmunitarias sigue investigándose, la evidencia experimental actual ha revelado que CD69 puede determinar los patrones de liberación de citoquinas, así como el homing y la migración de linfocitos activados.¹¹²

CD134: es una glicoproteína transmembrana de tipo 1 de 35 kDa miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRSF). En humanos, el CD134 se expresa en los linfocitos T CD4+ y en los linfocitos T CD8+ activados.^{113,114}

CD137: también conocido como 4-1BB o ILA (inducido por activación de linfocitos) es una proteína de membrana integral de tipo I de 39 kDa de la familia TNF/NGF cuya expresión es inducida en los linfocitos T CD4+, T CD8+ y NK tras la activación.^{114,115,116}

6.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CITOCINAS ANALIZADAS

IL-2: La IL-2 juega un papel clave en la proliferación de las células T y en la generación de células T efectoras y de memoria. Es producida principalmente por los linfocitos T activados, formando parte de la respuesta de tipo Th1. Efectúa su acción biológica a través de un receptor de membrana constituido por tres subunidades β . Tras la activación del linfocito se libera al suero, en forma de receptor soluble, la subunidad α p55. En el individuo sano existen ciertos niveles del receptor soluble de la IL-2, mientras que niveles superiores a los normales pueden ser observados en numerosas enfermedades, hecho que refleja una excesiva activación linfocitaria.¹¹⁷ Huang et al. se detectaron niveles elevados de IL-2 o su receptor IL-2R en pacientes con COVID-19, y se ha informado que estos aumentos son directamente proporcionales a la gravedad de la enfermedad.¹¹⁸

IFN- γ : La IFN- γ es un IFN tipo II producido por una amplia variedad de células linfocíticas, incluidas las células T CD4 + y T CD8+, las células Treg, las células T CD8+ FoxP3, las células B y las células NK. Los monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos de neutrófilos también pueden producir esta citocina. Aunque numerosas células pueden ser la fuente de IFN- γ , es producida principalmente por las células T y NK. La IFN- γ juega un papel crucial en el aclaramiento de las células infectadas viralmente a través de la promoción de respuestas citotóxicas de células T.¹¹⁹ Huang et al. encontró que los niveles séricos de IFN- γ eran más altos en pacientes con COVID-19 que en individuos sanos y propuso que la elevación de esta y otras citocinas podría resultar de la activación de las células Th1 y Th2.¹¹⁸ Además, se notificaron previamente niveles séricos elevados de IFN- γ en pacientes con SARS-CoV o MERS.¹²⁰ Liu et al. observaron que los niveles elevados de IFN- γ se asociaban con una mayor carga viral y daño pulmonar.¹²¹

- TNF- α :** El TNF- α es producido por varios tipos de células, como monocitos, macrófagos y células T, entre otros. Esta citocina se ha relacionado con respuestas pro-inflamatorias mediadas por IL-1 β e IL-6. Junto con otras citocinas, el TNF- α participa en la regulación de procesos inflamatorios, enfermedades infecciosas y tumores malignos. Se ha observado que los niveles séricos de TNF- α están elevados en pacientes con COVID-19 y son más altos con la enfermedad más grave. El TNF- α fue una de las citocinas cuya sobreproducción se relacionó con un mal pronóstico en pacientes con SARS-CoV y MERS.¹²²
- IL-4:** La IL-4 está involucrada en la inmunidad adaptativa, jugando un papel crucial en la regulación inmune gobernada por células T helper (Th) activadas. Actúa preferentemente a través de la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B y la promoción del isotipo de inmunoglobulina E. Por lo tanto, interviene decisivamente en la inducción de células Th2 reguladoras de la inmunidad humoral. Se ha propuesto que la IL-4 tiene una función antiinflamatoria específica del tejido en el que está presente, reflejando la plasticidad metabólica de diferentes tejidos.¹²³
- IL-17:** La IL-17 es sintetizada por los linfocitos Th17 y está elevada en procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes. También es producida por las células CD8+ y por varios conjuntos de linfocitos inmaduros, incluidas las células T gamma-delta, las células NK y las células linfoides innatas del grupo 3.¹²⁴ La IL-17 es una citocina pro-inflamatoria que desempeña un papel en el daño tisular, el estrés fisiológico y la infección. Se han notificado niveles elevados de IL-17 en pacientes con SARS-CoV-2 como parte de la tormenta de citoquinas, y se han relacionado con la carga viral y la gravedad de la enfermedad.¹²¹ En contraste, Wan et al. se encontró que los niveles de IL-17 eran normales en pacientes con COVID-19, sin diferencias significativas entre los pacientes con síntomas graves versus leves.¹²⁵
- IL-1 β :** La IL-1 β participa activamente en la respuesta inflamatoria a la infección, y sus principales fuentes son los monocitos y macrófagos activados. El SARS-CoV-2 parece actuar sobre la activación y maduración de la IL-1 β , que a su vez activa otras citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-6 y el TNF- α . Yang et al. detectaron niveles elevados del receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) en 14 casos graves de COVID-19, y este marcador se ha asociado con aumento de la carga viral, pérdida de la función pulmonar, daño pulmonar y riesgo de mortalidad. La mayoría de los pacientes con COVID-19 con síntomas graves tienen niveles elevados de IL-1 β , que se han asociado con SARS, hipercoagulación y coagulación intravascular diseminada.¹²⁷

6.3 DESCRIPCIÓN DE LAS QUIMIOCINAS INDUCIDAS POR IFN

CXCL10/IP-10: IP-10 fue identificado inicialmente como una quimiocina cuya secreción es inducida por IFN- γ . IP-10 es secretada por neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células dendríticas, astrocitos y hepatocitos. A través de su unión al receptor de quimiocina 3 (CXCR3), regula las respuestas del sistema inmunitario activando y reclutando leucocitos, incluyendo células T, monocitos y células NK.¹²⁸ Se han encontrado concentraciones elevadas de IP-10 en numerosas infecciones, principalmente infecciones virales.¹²⁹ Se encontró que los niveles séricos de IP-10 estaban elevados en pacientes con COVID-19 e incluso más altos en aquellos que requirieron ingreso en la UCI, lo que sugiere su relación con el daño pulmonar y la gravedad de la enfermedad.¹¹⁸ Liu et al. reportó que los niveles séricos elevados de IP-10 se relacionaron con una mayor carga viral y mayor daño pulmonar en pacientes con SARS-CoV-2.¹²¹ Yang et al. también encontraron niveles especialmente altos de esta quimiocina en los casos más graves de COVID-19.¹²⁶

CCL2/MCP-1: Esta proteína pertenece a la familia de las quimiocinas C-C y es un poderoso factor quimiotáctico monocito que es constitutivamente producido o inducido por estrés oxidativo, citoquinas o factores de crecimiento. Puede ser expresada por células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, células musculares lisas, células mesangiales, astrocitos, monocitos y células microgliales, que juegan un papel importante en la respuesta antiviral en la circulación periférica y los tejidos. Los monocitos y macrófagos son la principal fuente de MCP-1, que regula la migración e infiltración de monocitos, células T de memoria y células NK.¹³⁰ Huang et al. encontraron niveles elevados de MCP-1 en pacientes con COVID-19 e incluso más altos entre los ingresados en la UCI.¹¹⁸ Xiong et al. detectaron niveles elevados de MCP-1 y otras citocinas en el líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con COVID-19.¹³¹ También se han detectado niveles elevados de esta proteína en el tejido pulmonar de pacientes infectados con SARS-CoV-2.¹³²

CXCL9/MIG: Es una monocina inducida por interferón gamma, quimioatrayente para las células T activadas y está involucrada en varios procesos inflamatorios siendo quimioatrayente para las células del sistema inmune del fenotipo Th1.¹³³ Se encontró que esta quimiocina estaba involucrada en la enfermedad de la COVID-19 y se correlacionaba positivamente con la edad de los pacientes. Moratto et al. midieron un panel de quimiocinas en muestras de plasma de 14 niños y 9 adultos con COVID-19 y los pacientes adultos con COVID-19 mostraron niveles más altos de CXCL9 que los niños con COVID-19, mientras que se observaron concentraciones de CXCL9 superpuestas entre los sujetos de control adultos y niños.¹³⁴

CCL5/RANTES: Es una quimiocina de la familia de las quimiocinas C-C que se une a los receptores CCR1, CCR3 y principalmente CCR5. CCL5 juega un papel activo en el reclutamiento de una variedad de leucocitos incluyendo células T, macrófagos, eosinófilos, y basófilos en sitios inflamatorios.¹³⁵

Hue et al. observaron una correlación positiva entre los niveles más altos de CCL5 y la manifestación grave de COVID 19, destacando el importante papel de esta quimiocina en el SDRA inducido por la expresión de quimiocinas.¹³⁶ En contraste, Zhao et al. evaluaron 71 pacientes con COVID 19, notificando que los niveles circulantes de CCL5 se elevaron significativamente solo en los casos leves (en los que permanecieron elevados durante 3/4 semanas después de la recuperación) en comparación con los controles sanos. Cabe señalar que no se observó una elevación de los niveles circulantes de CCL5 en el grupo grave durante la progresión de la enfermedad.¹³⁷ Patterson et al. informaron que el tratamiento con Leronlimab condujo a una ocupación completa del receptor CCR5 en los macrófagos y células T, una rápida reducción de la IL-6 plasmática, la restauración de la relación CD4/CD8 y una disminución significativa de la viremia plasmática del SARS-CoV-2.¹³⁸

PARTE II

7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7.1 HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que las células mesenquimales derivadas del corion de la placenta humana previamente estimuladas con INF-gamma (IpMSCs) pueden inmunomodular “*in-vitro*” la respuesta celular T frente a los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.

7.2 OBJETIVOS

Para demostrar la hipótesis nos hemos trazado los siguientes objetivos:

7.2.1 OBJETIVO PRIMARIO

1. Evaluar la función inmunomoduladora *in-vitro* de las células mesenquimales derivadas del corion de placenta humana previamente estimuladas con INF-gamma (IpMSCs) en relación con la respuesta celular T frente a los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.

7.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Caracterizar las células mesenquimales derivadas del corion de la placenta humana.
2. Evaluar la respuesta celular T CD4+ y T CD8+ de los pacientes recuperados de COVID-19 severo y crítico tras la estimulación con los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.

3. Evaluar la capacidad inmunomoduladora de las células mesenquimales en la respuesta celular T frente a los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.
4. Evaluar la capacidad inmunomoduladora de las células mesenquimales sobre las citocinas derivadas de la respuesta celular T frente a los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.
5. Evaluar la capacidad inmunomoduladora de las células mesenquimales sobre las quimioquinas inducidas por IFN derivadas de la respuesta celular T frente a los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2.

PARTE II

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Es un estudio experimental *in-vitro*, de la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de las pMSCs pre-estimuladas con IFN- γ (IpMSCs) en un co-cultivo con las CMSPs previamente estimuladas por las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2.

El estudio fue realizado en el laboratorio del servicio de Inmunología del Complejo Asistencial Universitario Hospital de León.

8.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio participaron veinte pacientes recuperados de COVID-19 que estuvieron hospitalizados desde marzo al 30 de abril de 2020, con enfermedad severa (11 pacientes) y crítica (9 pacientes) según la OMS. Todos los pacientes fueron confirmados por el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) del SARS-CoV-2. Los pacientes fueron inscritos después del alta hospitalaria y todas las muestras de sangre fueron obtenidas en septiembre del 2020, aproximadamente entre 5-6 meses (mediana (RIQ) 162.5 días (143.25-169.5)) desde la última PCR-RT negativa.

La OMS define como enfermedad severa a pacientes con: signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) más alguno de los siguientes: frecuencia respiratoria > 30 inspiraciones/min, dificultad respiratoria grave o SpO₂ < 90% basal y que precisa tratamiento hospitalario con oxigenoterapia.¹⁴³

Y como enfermedad crítica a pacientes que desarrollan SDRA, sepsis, shock séptico u otras afecciones que normalmente requerirían el suministro de terapias de soporte vital, como ventilación mecánica (invasiva or non-invasiva) o terapia vasopresora. Los pacientes con SDRA, presentan en la radiología

torácica (radiografía, tomografía computarizada o ecografía pulmonar) opacidades bilaterales que no se explican totalmente por sobrecarga de volumen, colapso lobar o pulmonar ni nódulos. Para estos pacientes, se precisa el tratamiento en UCI. ¹⁴³

8.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS pMSCs

La membrana coriónica humana se obtuvo de una mujer sana de 34 años que tuvo un parto por cesárea (fue negativo el resultado de las pruebas para el virus de la hepatitis B, virus de inmunodeficiencia humana, virus CMV, Epstein Barr, sífilis y PCR-RT SARS-CoV-2).

Tras la colección de la placenta humana de la cesárea en condiciones quirúrgicas asépticas y transportado en un cubo estéril en el interior de una caja de poliestireno al laboratorio de Inmunología Clínica, se orientó la placenta con el cordón umbilical hacia arriba en una bandeja estéril dentro de la cabina de seguridad biológica. (Foto 1).

FOTO 1. PLACENTA HUMANA



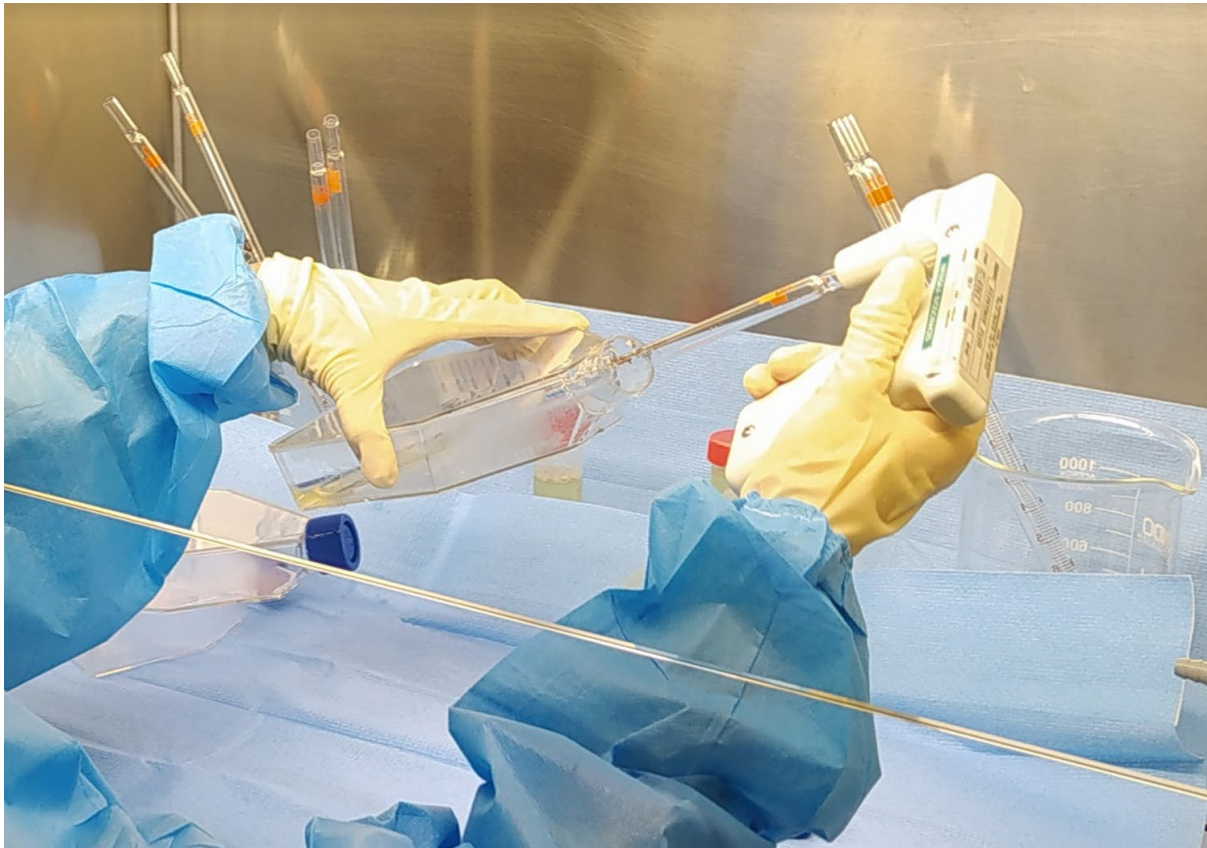
Después de retirar la membrana amniótica de la superficie fetal de la placenta, dejando intacto el *frondosum* coriónico. Se aisló la placa coriónica (Foto 2) y se lavó repetidamente en condiciones asépticas. Se cortó en trozos de ~1 cm de ancho por 0.5 cm de profundidad en la región más cercana del cordón umbilical y lejana del borde de la placenta.

FOTO 2. PROCESO DE OBTENCIÓN DEL CORION DE PLACENTA HUMANA



El tejido coriónico fue digerido con colagenasa tipo I (100 U/ μ L) y de tipo IV (ambas de Gibco by life technologies) a 37°C durante 2 horas. A continuación, la suspensión celular se transfirió a un tubo de ensayo de 50 cc y fue centrifugado a 1000 rpm por 5 min. El sedimento se re-suspendió en medio completo de cultivo libre de suero bovino con StemPro® MSC SFM, GlutaMAX™ -I CTS y gentamicina a una concentración final de 5 μ g/mL y se añadió en las botellas de cultivo (Nunc™ EasYFlask™ T75) a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturada. Después de 72 horas del aislamiento, se reemplazó el medio de cultivo por uno fresco (Foto 3). Todas las botellas de cultivo fueron tratados previamente con el sustrato CELLstart™ CTS™.

FOTO 3. MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES



Según la Sociedad Internacional de Terapia celular, para definir una célula madre mesenquimal se debería cumplir al menos los siguientes criterios: 1) Adhesión al plástico bajo condiciones estándar de cultivo; 2) Expresión de marcadores de superficie como CD105, CD73, CD90 y ausencia de marcadores como CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79 α or CD19 y HLA-DR y 3) Capacidad de diferenciación *in-vitro* hacia los otros linajes de origen mesodermal como las líneas osteogénica y adipogénica o condrogénica.¹⁴⁴

Las células adheridas se denominaron “fibroblasto formador de unidades de colonias” (Foto 4) y luego células madre mesenquimales. Cuando la densidad celular alcanzó el ~90% (Foto 5), las células fueron extraídas. Las células se disociaron con TrypLE Select CTS y se volvieron a sembrar a una densidad de 5 000 células/cm². El medio de cultivo completo libre de suero bovino se reemplazó por uno fresco cada 2 días.

En los experimentos, se utilizaron las células de la generación del pasaje 3 (P3) de las pMSCs.

FOTO 4. “FIBROBLASTO FORMADOR DE UNIDADES DE COLONIAS”

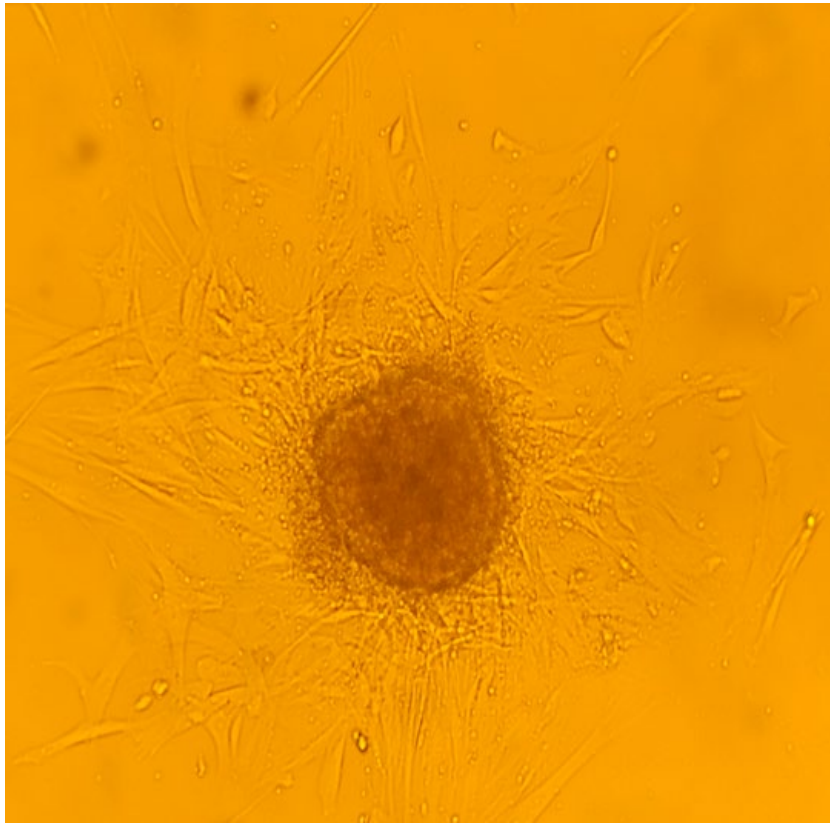
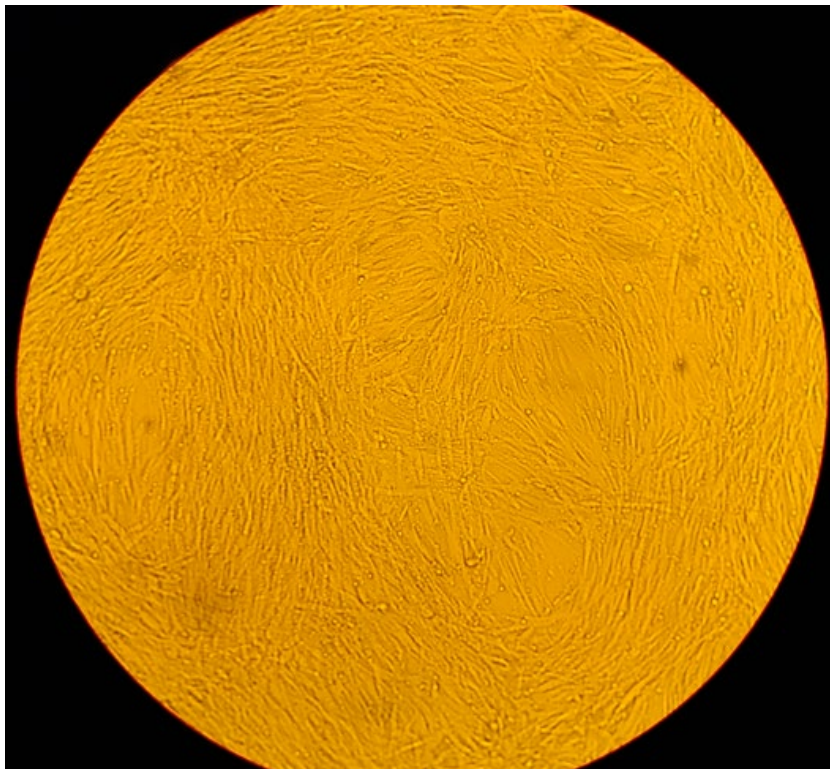


FOTO 5. DENSIDAD CELULAR (~ 90%)



8.4 IDENTIFICACIÓN CELULAR DE LAS pMSCs

Para la identificación celular las pMSCs se incubaron a 4°C durante 30 min con anticuerpos monoclonales anti-CD105, -CD73, -CD90, -CD44, -CD29, -CD45, -CD14,-CD34, antígeno leucocitario humano D relacionado (HLA-DR), CD19, CD166, CD146, CD54 y CD106 (BD Biosciences). Los anticuerpos del isotipo se utilizaron como control. Posteriormente, las pMSCs se detectaron mediante citometría de flujo (FACS Canto II) y los resultados se analizaron con FACS Diva y FlowJo v10.

8.5 IDENTIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS pMSCs

Para la identificación funcional se indujo la diferenciación de dos líneas celulares. Se cultivaron las pMSCs en una placa de 24 pocillos a una densidad de $1-2 \times 10^4$ células a 37°C durante 14 días en el medio de diferenciación de adipocitos (STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit) y 21 días en el medio de osteocitos (STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit). Posteriormente, se fijaron en una solución de formaldehído al 4% y se tiñeron con Oil Red O y una solución de rojo de alizarina S respectivamente a temperatura ambiente. Se contratiñeron con Hematoxilina para ver el contraste. Finalmente, las observaciones se realizaron utilizando un microscopio Olympus BX61 con cámara Leica EC3.

8.6 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS pMSCs

A partir de suspensiones del P3 de las pMSCs a 2×10^4 células/ml con medio completo sin suero bovino, se inocularon 100 µl en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 10 µl de solución Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma Aldrich) y las placas se incubaron durante 3-4 horas a 37°C para luego medir el valor de la densidad óptica (DO) a 450 nm en un lector de microplacas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizó el número de células viables cada 24 horas durante 72 horas consecutivas.

8.7 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de muestras de sangre entera anticoagulada extraída en tubos para recolección de sangre de veinte pacientes con COVID-19 posterior alta del hospital, entre 5-6 meses desde la última RT-PCR negativa aproximadamente.

La técnica de separación de las células mononucleares de sangre periférica realizada en la campana de flujo laminar se detalla a continuación:

1. Se identificó 4 tubos de propileno de 15 ml tanto para el control y cada proteína S-, N- y M- por paciente.
2. Se añadió 6 mL de Lymphoprep™ en cada tubo rotulado.
3. Se diluyó la sangre total en un tubo de 50 ml: 3 ml de PBS estéril + 3 ml de sangre total.
4. Con la ayuda de una pipeta de 10mL se homogenizó la dilución y se cogió todo el volumen de muestra.
5. Lentamente por las paredes del tubo del paso 2, se añadió la muestra de sangre diluida.
6. Se centrifugó a 1200 rpm sin freno 30min a Tº amb.
7. Del tubo centrifugado, se obtuvo la fracción de los linfocitos con una pipeta pasteur estéril (anillo blanco) y se depositó en otro tubo con 14 ml RPMI estéril. Se centrifugó a 2000 rpm con freno a 5 min.
8. Del tubo anterior, se decantó el sobrenadante y se re-suspendió en RPMI con antibiótico.
9. Del pellet anterior se pipetea 10 µl de células + 90 µl de PBS en un tubo eppendorf™.
10. Se realiza el conteo con la cámara de Neubauer.

8.8 INMUNIDAD DE CÉLULAS T REACTIVAS AL SARS-CoV-2

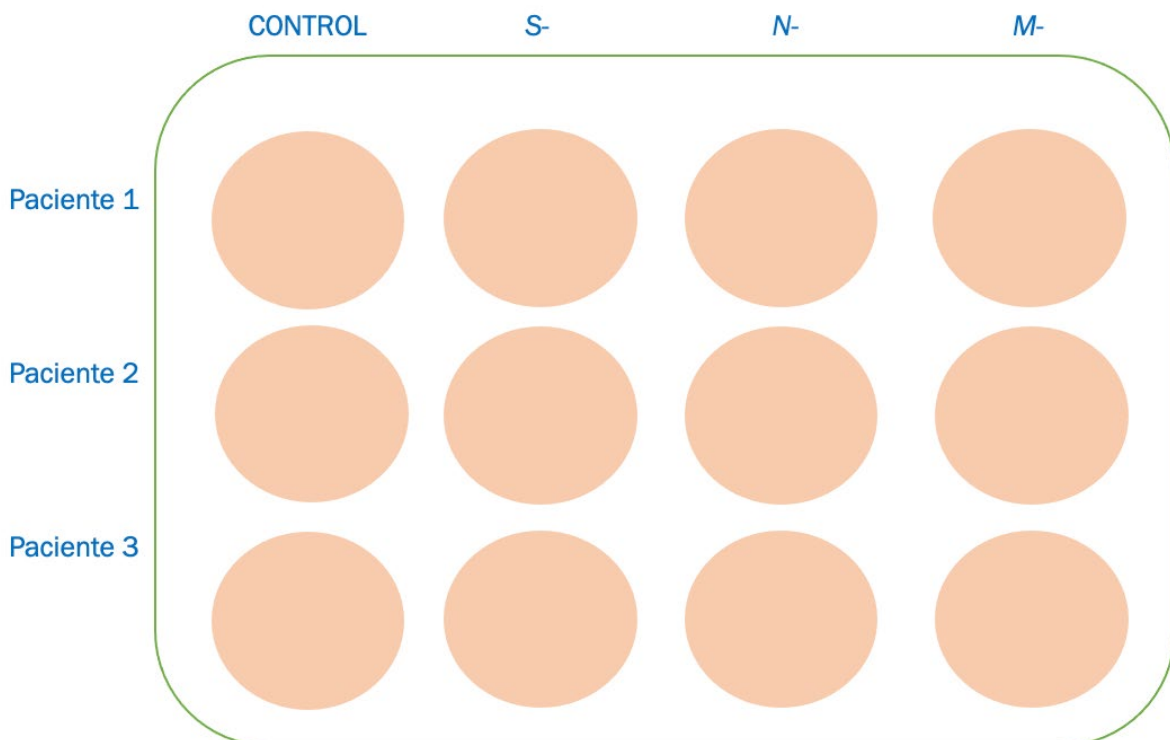
Los estudios de respuesta celular T tras la estimulación de los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2, antes y después del co-cultivo con las IpMSCs, se realizaron de dos formas:

- a) Valorando la regulación por incremento de las moléculas de activación de superficie de los linfocitos T CD4+ y T CD8+.
- b) Cuantificando los niveles de citocinas y quimiocinas secretadas por los linfocitos activados en el sobrenadante.

Las CMSPs aisladas de la capa leucocítica se estimularon con los antígenos S-, N- y M- del SARS-CoV-2 (PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S1; _N; _M/secuencia 15mer con 11 aminoácidos (aa), cubriendo el dominio N-terminal S1 de la glicoproteína de superficie, la secuencia completa de la fosfoproteína nucleocápside (N) y la secuencia completa de la glicoproteína de membrana (M) del SARS-CoV-2 Miltenyi Biotec). El control no tuvo estimulación con antígeno, solo agua según la indicación del fabricante.

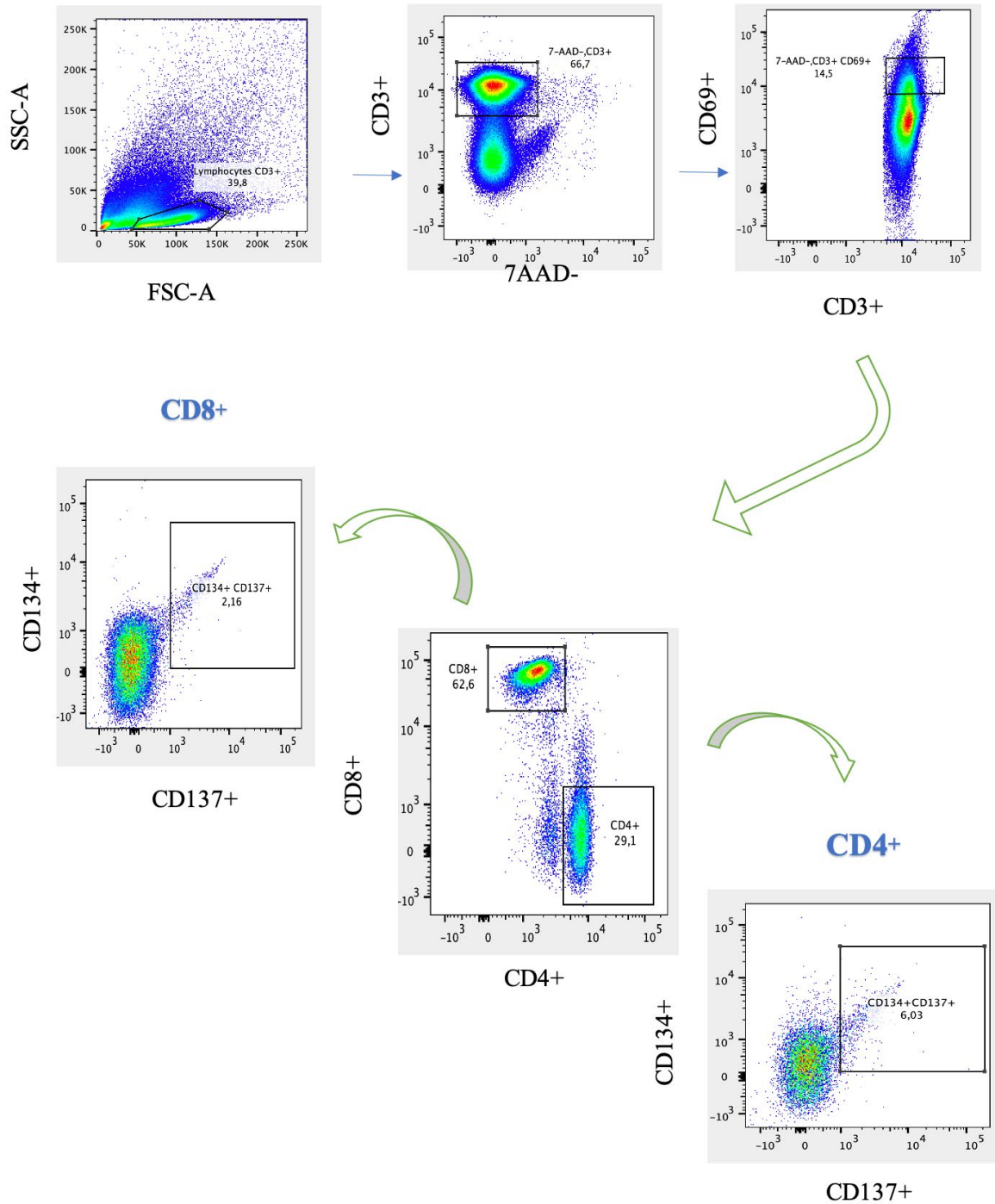
Se utilizaron placas de 48 pocillos y se distribuyeron un pocillo para el control y cada proteína S-, N-, M- por paciente (Figura 1) de modo que teníamos en total 20 pocillos de controles, 20 pocillos para S-, 20 pocillos para N- y 20 pocillos para M-. Un ejemplo (Figura 23)

FIGURA 23. ESTIMULACIÓN PEPTÍDICA DE LOS LINFOCITOS DE PACIENTES RECUPERADOS DE COVID-19



Tras 16 horas de estimulación, la respuesta celular antígeno-específica T se detectó mediante los marcadores de superficie usando citometría de flujo. La estrategia de “gating” de las subpoblaciones celulares se presenta en la Figura 24.

FIGURA 24. ESTRATEGIA DE “GATING” PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS T CD4+ Y CD8+ ANTÍGENO-ESPECÍFICAS FRENTE AL SARS-CoV-2



Los marcadores de activación CD134 y CD137 (BD Biosciences) en las células T CD4 + y T CD8+ y la medición de citocinas en los sobrenadantes (BD Cytometric Bead Array (CBA), Human Th1 / Th2 / Th17 kit) se utilizaron para definir a las células T reactivas frente al SARS-CoV-2. Para los marcadores de activación CD134 y CD137 tanto en las células T CD4 + como T CD8+, se consideró la respuesta cuando fue igual o excedió 2 veces el control no estimulado (índice de estimulación ≥ 2).

La medición de citocinas seleccionadas, incluidas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 se realizó utilizando BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para eso, se preparó una alícuota de perlas de captura mixtas que se incubó con el tampón en la oscuridad (30 min, a temperatura de ambiente). Los estándares recombinantes se diluyeron (en el rango de 0-1:256) para preparar las curvas estándar. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de cada dilución de estándar recombinante, el reactivo de detección, la muestra del sobrenadante y las perlas de captura mixtas a todos los tubos de ensayo y se incubaron 3 horas en la oscuridad (a temperatura de ambiente). Finalmente, las muestras se lavaron, se añadió el tampón de lavado fresco y las muestras se adquirieron mediante citometría de flujo utilizando FACS CANTO II con el software BD FACSDiva. Para cada muestra, control, S-, N-, M- de cada paciente se midió la señal de fluorescencia de eventos seleccionados para la población de perlas de captura. Los resultados se calcularon utilizando el software FCAP Array™ (ver. 3.0.1; Soft Flow Hungary Ltd., Pecs, Hungría).

Se utilizó el límite teórico de detección para cada citocina analizada que se define como la concentración correspondiente a dos desviaciones estándar por encima de la mediana de fluorescencia de 30 réplicas del control negativo (0 pg/mL) según el protocolo del fabricante (Tabla 1).

También, se midió IL-1 β utilizando BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

TABLA 57. LÍMITE TEÓRICO DE DETECCIÓN PARA CITOCINAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO

Citocina	Límite de detección (pg/mL)
IL-2	2.6
IL-4	4.9
IL-1 β	7.2
TNF- α	3.8
IFN- γ	3.7
IL-17A	18.9

Finalmente, se incluyeron la medición de quimiocinas inducidas por interferón, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES y CXCL10/IP-10, secretadas por las CMSPs en el sobrenadante mediante el instrumento BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

TABLA 58. LÍMITE TEÓRICO DE DETECCIÓN PARA QUIMIOCINAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO

Quimiocina	Límite de detección (pg/mL)
CXCL10/IP-10	2.8
CCL2/MCP-1	2.7
CXCL9/MIG	2.5
CCL5/RANTES	1

Parte de las CMSPs estimuladas fueron separadas para el siguiente ensayo y se volvieron a re-estimular con los péptidos S-, N- y M- del SARS-CoV-2 durante 16 horas antes del co-cultivo conjunto con las pMSCs pre-estimuladas con IFN- γ .

8.9 ACTIVACIÓN DE LAS pMSCs POR IFN- γ

Para generar pMSCs activadas con IFN- γ (IpMSCs), las células se sembraron a 5.000 células por cm² con medio completo sin suero bovino con 200 UI/mL de IFN- γ humano recombinante (Sigma-Aldrich) durante 24 horas a 37°C antes del co-cultivo con las CMSPs re-estimuladas (rCMSPs).

8.10 CO-CULTIVO IpMSCs/rCMSPs

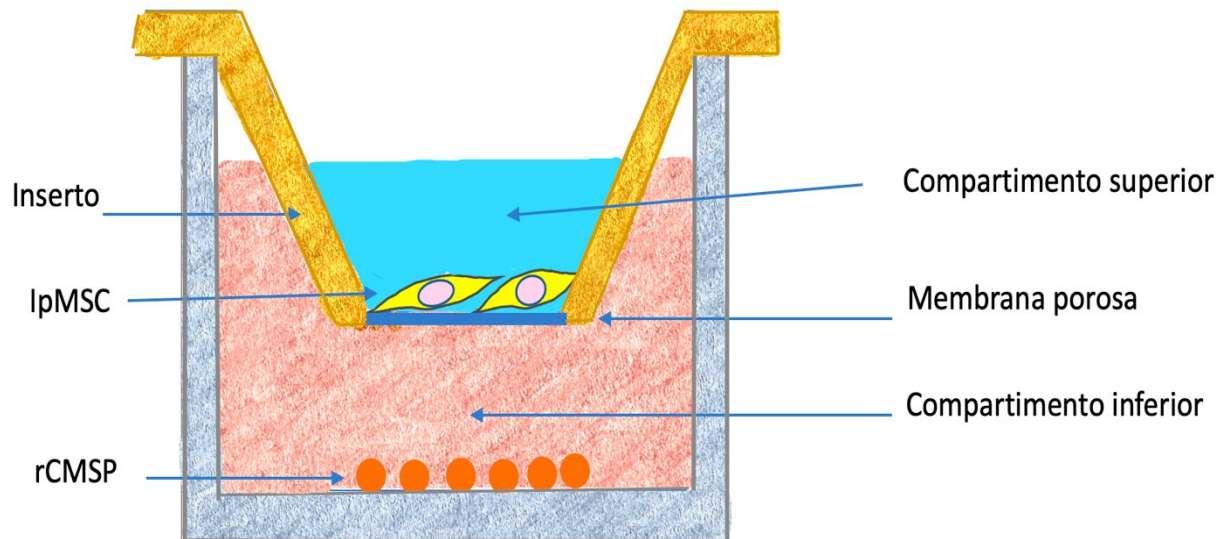
Las rCMSPs y las IpMSCs se co-cultivaron en un ensayo de transwell *in vitro* utilizando insertos de membrana de 0,4 μ m (Nunc™) (Foto 6) y la relación fue de 10:1 (rCMSPs: IpMSCs). Las placas de cultivo de transwell se re-suspendieron con medio completo sin suero bovino (Figura 25). Se utilizó un pocillo para el control, proteína S-, N-, M- por paciente. Después de 48 horas de incubación en una cámara humidificada a 37°C, se utilizaron las rCMSPs y el medio completo libre de suero en el compartimento inferior para la medición de la respuesta celular T, citocinas y quimiocinas. Las IpMSCs del compartimento superior del ensayo de co-cultivo se transfirieron a viales con solución

RNAlater® para experimentos adicionales.

FOTO 6. SISTEMA DE TRANSWELL



FIGURA 25. CO-CULTIVO DE rCMSPs (CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA RE-ESTIMULADAS CON LOS PÉPTIDOS S-, N- Y M- DEL SARS-COV-2) Y LAS IpMSCs (pMSCs ACTIVADAS CON IFN- γ) EN UN ENSAYO DE SISTEMA TRANSWELL



Las rCMSPs y el medio de cultivo completo libre de suero bovino se cultivaron en el compartimento inferior mientras que las IpMSCs en el compartimento superior.

8.11 ANÁLISIS DE DATOS

Las células fueron adquiridas mediante citometría de flujo FACS CANTO II con el software BD FACS-Diva. Los documentos FACS generados se analizaron con FlowJo v 10. La estrategia de “gating” para el análisis de las células T específicas de antígeno se muestra en la Figura 2. La respuesta celular T se consideró positiva cuando los cultivos estimulados por los péptidos S-, N- y M- del SARS-CoV-2 contenían el doble o más del % de las células T CD4+/CD8+ CD134 + CD137 del control no estimulado.

8.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y la composición gráfica se realizó con el paquete de SPSS versión 26.0 y el software GraphPad Prism LLC 9.2.0. Los diagramas de Venn se realizaron con Venny 2.1.0.

Para evaluar la distribución de normalidad de cada parámetro se utilizó la prueba de Shapiro- Wilk o Kolmogorov-Smirnov. Las características basales como los parámetros clínicos, radiográficos, inmunológicos, complicaciones, tratamientos, respuesta celular y medición de citocinas y quimiocinas se describieron mediante la mediana (con rango intercuartílico) o las frecuencias (porcentaje) según correspondiera. Las comparaciones entre grupos relacionados o no relacionados se realizaron con pruebas no paramétricas. La prueba de Chi-cuadrado para las variables categóricas. Se consideró el valor p de 2 colas exacta y $p < 0,05$ indica una diferencia estadísticamente significativa con un intervalo de confianza del 95%.

8.13 ASPECTOS ÉTICOS

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Complejo Asistencial Universitario Hospital de León (Nº 2068) y se realizó en el laboratorio del Servicio de Inmunología clínica del mismo hospital.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito del donante para el uso de la membrana de corion en este estudio y de todos los participantes. Para la obtención de datos epidemiológicos se realizaron encuestas y se revisaron las historias clínicas.

PARTE II

9. RESULTADOS

9. RESULTADOS

9.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Las características clínicas de los pacientes según la gravedad de la enfermedad durante la hospitalización se muestran en la Tabla 3.

La mediana de edad fue de 65 años (RIQ,54,8 - 72,0). El 85% eran hombres y el 15% mujeres. (Tabla 3)

Según los síntomas la fiebre y disnea estuvieron presentes en el 100% de los pacientes. El segundo síntoma más frecuente fueron tos y astenia (90%) en ambos grupos, severo y crítico. La diarrea (90.9%, $p=0.024$), ageusia (90.9%, $p=0.007$) y anosmia (72.7%, $p=0.006$) (tabla 3) fueron más frecuente en el grupo de severos. El dolor torácico (10%, $p=0.178$) y las lesiones cutáneas (5%, $p=0.353$) fueron poco frecuentes (tabla 3). En la población total, el 55% tenía al menos una enfermedad coexistente. Las principales comorbilidades al ingreso fueron hipertensión (40%) y Diabetes Mellitus tipo 2 (25%). (Tabla 59) Sólo el 5% de pacientes tuvieron el peso normal, mientras el 95% de los pacientes fueron catalogados con sobrepeso (55%) o algún tipo obesidad (40%) ($p=0.001$). Tabla 60.

TABLA 59. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN LA SEVERIDAD CLÍNICA

Característica	Severidad clínica			Valor p
	Total de Pacientes (n=20)	Severo n=11	Crítico n=9	
Edad				
mediana (RIQ) -yr	65.0 (54.8 - 72.0)	65.0 (57.0-77.0)	67 (48.0-71.0)	
Distribución- n/total n. (%)				
< 50 años	3/20 (15)	0/11 (0)	3/9 (33.3)	
50-64 años	6/20 (30)	5/11 (45.5)	1/9 (11.1)	
>= 65 años	11/20 (55)	6/11 (54.5)	5/9 (55.6)	
Sexo femenino n/total n. (%)	3/20 (15)	3/11(27.3)	0/9 (0)	0.089
Índice de Masa corporal				
Distribución - n/total n. (%)				
Debajo 18.5 (Bajo peso)	0/20 (0)	0/11 (0)	0/9 (0)	
18.5-24.9 (Peso normal)	1/20 (5)	1/11 (9.1)	0/9 (0)	
25.0-29.9 (Pre-obesidad)	11/20 (55)	7/11 (63.6)	4/9 (44.4)	
30.0-34.9 (Obesidad Clase I)	5/20 (25)	2/11 (18.2)	3/9 (33.3)	
35.0-39.9 (Obesidad - Clase II)	2/20 (10)	1/11 (9.1)	1/9 (11.1)	
Arriba de 40 (Obesidad Clase III)	1/20 (5)	0/11 (0)	1/9 (11.1)	
Síntomas & Signos_ n (%)				
Fiebre	20 (100)	11 (100)	9 (100)	
Disnea	20 (100)	11 (100)	9 (100)	
Astenia	18 (90)	11 (100)	7 (77.8)	0.099
Tos	18 (90)	10 (90.9)	8 (88.9)	0.881
Diarrea	14 (70)	10 (90.9)	4 (44.4)	0.024
Ageusia	13 (65)	10 (90.9)	3 (33.3)	0.007
Mialgias	11 (55)	7 (63.6)	4 (44.4)	0.391
Alopecia	10 (50)	6 (54.5)	4 (44.4)	0.653
Anosmia	9 (45)	8 (72.7)	1 (11.1)	0.006
Odinofagia	5 (25)	3 (27.3)	2 (22.2)	0.795
Cefalea	5 (25)	4 (36.4)	1 (11.1)	0.194
Descarga nasal	4 (20)	0 (0)	4 (44.4)	0.013
Edema periférico	3 (15)	1 (9.1)	2 (22.2)	0.413
Dolor torácico	2 (10)	2 (18.2)	0 (0)	0.178
Lesiones en piel	1 (5)	1 (9.1)	0 (0)	0.353

Característica	Severidad clínica			Valor p
	Severo	Crítico		
Co-morbilidad _n. (%)				
Hipertensión	8 (40)	5(45.5)	3(33.3)	0.582
Diabetes	5 (25)	4(36.4)	1(11.1)	0.194
Enfermedad cardiovascular	3 (15)	2(18.2)	1(11.1)	0.660
Enfermedad pulmonar	1 (5)	0(0)	1(11.1)	0.257
Infección de hepatitis B	0 (0)	0(0)	0(0)	
Infección de hepatitis C	0(0)	0(0)	0(0)	
VIH	0(0)	0(0)	0(0)	
Malignidad	1 (5)	0(0)	0(0)	0.257
Enfermedad renal	0 (0)	0(0)	0(0)	
Enfermedad hepática	0 (0)	0(0)	0(0)	
Inmunodeficiencia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Trasplante de órgano sólido	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

n: número de pacientes

TABLA 60. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN EDAD E IMC

Característica	Distribución_n /total n (%)			Valor p	
	Edad	< 50 años	50-64 años		>= 65 años
Total		3/20 (15)	6/20 (30)	11/20 (55)	0.001
Severo		0/11 (0)	5/11 (45.5)	6/11 (54.5)	1.00
Crítico		3/9 (33.3)	1/9 (11.1)	5/9 (55.6)	0.450

ÍNDICE DE MASA CORPORAL	Distribución_n /total n (%)					Valor p
	18.5-24.9 (Peso Normal)	25.0-29.9 (Pre-obesidad)	30.0-34.9 (Obesidad Clase I)	35.0-39.9 (Obesidad Clase II)	> 40 (Obesidad Clase III)	
Total	1/20 (5)	11/20 (55)	5/20 (25)	2/20 (10)	1/20 (5)	0.0001
Severo	1/11 (9.1)	7/11 (63.6)	2/11 (18.2)	1/11 (9.1)	0/11 (0)	0.100
Crítico	0/9 (0)	4/9 (44.4)	3/9 (33.3)	1/9 (11.1)	1/9 (11.1)	0.450

El principal hallazgo radiológico fue de opacidades pulmonares bilaterales (95%) con densidad en vidrio esmerilado principalmente (Tabla 61). Los biomarcadores de fase aguda durante la hospitalización más frecuentes fueron ferritina (>300mg/L) en el género masculino, LDH (>250 U/L,) y dímero D (≥500 ng/ml) (Tabla 62).

TABLA 61. HALLAZGOS RADIOLÓGICOS Y DE LABORATORIO

Característica	Total, de Pacientes (n=20)	Severidad clínica		Valor p
		Severo n=11	Crítico n=9	
Hallazgo radiológico _n%				
Anormalidades en la radiografía torácica	19/20(95)	10/11(90.9)	9/9 (100)	
Distribución—n/total n. (%)				
Opacidad local	0/20 (0)	0/11 (0)	0/9 (0)	
Opacidad bilateral con densidad en vidrio esmerilado	19/20 (95)	10/11(90.9)	9/9 (100)	
Hallazgo de laboratorio				
Conteo celular de serie blanca				
media (DE) – células por mm ³	7075 (± 3506)	7600 (± 4213)	6433 ± (2486)	0.300
Distribución _n /total n (%)				
>10,000 per mm ³	5/20 (25)	3/11(27.3)	2/9 (22.2)	
< 4000 per mm ³	4/20 (20)	2/11(18.2)	2/9 (22.2)	
Proteína C-reactiva _media (DE) mg/L	184 (±105)	155 (±81)	220 (±123)	0.170
> 10 mg/L	20/20(100)	11/11(100)	9/9 (100)	
Distribución de otros hallazgos _n /total n (%)				
Ferritina mg/L				
Femenino >200 mg/L	2/3(66.67)	2/2(100)	0/0(0)	
Masculino >300 mg/L	14/17(82.35)	7/8(87.5)	7/9(77.8)	
Lactato deshidrogenasa >250 U/L	17/20 (85)	8/11(72.7)	9/9 (100)	
Aspartato transaminasa >40 U/L	14/20 (70)	8/11(72.7)	6/9(66.7)	
Alanina transaminasa >40 U/L	10/20 (50)	6/11(54.5)	4/9(44.4)	
FRG (CKD-EPI-mL/min/1.73 m ²)				
>90 mL/min/1.73 m ²	7/20 (35)	4/11 (36.4)	3/9(33.3)	
60-89 mL/min/1.73 m ²	10/20 (50)	5/11(45.5)	5/9 (55.6)	
<60 mL/min/1.73 m ²	3/20 (15)	2/11 (18.2)	1/9 (11.1)	
Dímero-D ≥500 ng/ml	17/20 (85)	8/11 (72.7)	9/9 (100)	

TABLA 62. HALLAZGOS RADIOLÓGICOS Y DE LABORATORIO

Característica	Distribución_n /total n (%)			Valor p
Hallazgo radiológico _n%	Opacidad Local	Opacidad Bilateral con densidad en vidrio esmerilado		
Total	0/20 (0)	19/20 (95)		
Severo	0/11 (0)	10/11(90.9)		
Crítico	0/9 (0)	9/9 (100)		
Hallazgo de laboratorio				
Conteo celular de serie blanca	< 4000 per mm³	>10,000 per mm³		
Total	4/20 (20)	5/20 (25)		
Severo	2/11(18.2)	3/11(27.3)		
Crítico	2/9 (22.2)	2/9 (22.2)		
Ferritina mg/L	Masculino < 300 mg/L	Masculino >300 mg/L		
Total	2/17	14/17(82.35)		
Severo	0	7/7 (87.5)		
Crítico	2/9	7/9(77.8)		
Lactato deshidrogenasa	<250 U/L	>250 U/L		
Total	3/20 (15)	17/20 (85)		
Severo	3/11 (27.3)	8/11(72.7)		
Crítico	0	9/9 (100)		
Aspartato transaminasa	<40 U/L	>40 U/L		
Total	6/20 (30)	14/20 (70)		0.200
Severo	3/11 (27.3)	8/11(72.7)		0.100
Crítico	3/9(33.3)	6/9(66.7)		0.500
Alanina transaminasa	<40 U/L	>40 U/L		
Total	10/20 (50)	10/20 (50)		1.000
Severo	5/11(45.5)	6/11(54.5)		1.000
Crítico	5/9(55.6)	4/9(44.4)		1.000
FRG (CKD-EPI-mL/min/1.73 m²)	>90 mL/min/1.73 m²	60-89 mL/min/1.73 m²	<60 mL/min/1.73 m²	
Total	7/20 (35)	10/20 (50)	3/20 (15)	0.250
Severo	4/11 (36.4)	5/11(45.5)	2/11 (18.2)	0.550
Crítico	3/9(33.3)	5/9 (55.6)	1/9 (11.1)	0.150
Dímero-D ≥500 ng/ml	<500 ng/ml	≥500 ng/ml		
Total	3/20(15)	17/20 (85)		0.050
Severo	3/11(15)	8/11 (72.7)		0.100
Crítico		9/9 (100)		

FRG: función renal glomerular. n: número de pacientes.

TABLA 63. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS DURANTE LA HOSPITALIZACIÓN

Característica		Severidad clínica		
Fenotipo linfocitario TBNK	Total, de Pacientes (n=18)	Severo n=11	Crítica n=7	Valor p
Conteo absoluto LT CD3+				
mediana (RIQ) – por mm ³	428,50 (257.8-614.3)	428,00 (298-596)	430,00 (223-669)	0.751
Distribución _n /total n (%)				
1000-2200	1/18 (5.6)	0/11 (0)	1/7 (14.3)	
<1000	17/18 (94.4)	11/11 (100)	6/7 (85.7)	
Conteo absoluto LT CD4+				
mediana (RIQ) – por mm ³	293,00 (200.3-388.3)	314,00 (227-431)	272,00 (140-374)	0.497
Distribución _n /total n (%)				
530- 1300	2/18 (11.1)	1/11(9.1)	1/7(14.3)	
<530	16/18 (88.9)	10/11(90.9)	6/7(85.7)	
Conteo absoluto LT CD8+				
mediana (RIQ) – por mm ³	106,50 (58.8-168.3)	106,00 (59-149)	160 (58-283)	0.556
Distribución _n /total n (%)				
330- 920	2/18 (11.1)	1/11 (9.1)	1/7 (14.3)	
<330	16/18 (88.9)	10/11 (90.9)	6/7 (85.7)	
Conteo absoluto LB CD19+				
mediana (RIQ) – por mm ³	96,50 (79.3-164.8)	116,00 (71-173)	89,00 (85-160)	0.618
Distribución _n /total n (%)				
110- 570	8/18 (44.4)	6/11 (54.5)	2/7 (28.6)	
<110	10/18 (55.6)	5/11 (45.5)	5/7 (71.4)	
Conteo absoluto NK				
mediana (RIQ) – por mm ³	116,00 (86.3-148)	118 (87-147)	111,00 (60-168)	0.892
Distribución _n /total n (%)				
70- 480	15/18 (83.3)	10/11 (90.9)	5/7 (71.4)	
<70	3/18 (16.7)	1/11 (9.1)	2/7 (28.6)	

Característica	Severidad clínica			Valor p
	Citocina	Total, de Pacientes (n=18)	Severo n=11	
IL-6 en suero				
mediana (RIQ) – por mm ³	65	69	61,00	0.450
	(33 – 128.8)	(25-142)	(55-122)	
Distribución _n /total n (%)				
5-40 pg/mL	6/20 (30)	5/11 (45.5)	1/9 (11.1)	
>40 pg/mL	14/20 (70)	6/11 (54.5)	8/9 (88.9)	
IL-1β en suero				
mediana (RIQ) – por mm ³	0.56	0.06	1.09	0.400
Distribución _n /total n (%)	(0-4.3)	(0-3.5)	(0.34 – 8.9)	
0-12 pg/mL	12/15 (80)	5/6 (83.3)	7/9 (77.8)	
>12 pg/mL	3/15 (20)	1/6 (16.7)	2/9 (22.2)	
TNF-α en suero				
mediana (RIQ) – por mm ³	0.66	0.24	0.65	0.200
Distribución _n /total n (%)	(0-4.1)	(0-4.3)	(0-9.8)	
0-10 pg/mL	12/15 (80)	5/6 (83.3)	7/9 (77.8)	
>10 pg/mL	3/15 (20)	1/6 (16.7)	2/9 (22.2)	

RIQ: Rango intercuartílico. n: número de pacientes. LT: linfocito T. LB: Linfocito B.

Del total de pacientes, durante la hospitalización, la linfopenia tanto de la población total como de algunas de las subpoblaciones linfocitarias (conteo absoluto de CD3 <1000 células/mm³; conteo absoluto de CD4 <530 células/mm³; y conteo absoluto de CD8 <330 células/mm³ y el nivel de IL-6 incrementado (>40pg/mL,) fueron parámetros inmunológicos característicos. (Tabla 64)

TABLA 64. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS DURANTE LA HOSPITALIZACIÓN SEGÚN EL RANGO DE REFERENCIA DE LABORATORIO

Parámetros	Distribución_n /total n (%)		
Conteo absoluto LT CD3+		1000-2200	<1000
	Total	1/17(5)	17/18 (95)
	Severo	0/11 (0)	11/11 (100)
	Crítico	1/7 (14.3)	6/7 (85.7)
Conteo absoluto LT CD4+		530- 1300	<530
	Total	2/18 (11)	16/18(89)
	Severo	1/11(9.1)	10/11(90.9)
	Crítico	1/7(14.3)	6/7(85.7)
Conteo absoluto LT CD8+		330- 920	<330
	Total	2/11(11)	16/18(89)
	Severo	1/11 (9.1)	10/11 (90.9)
	Crítico	1/7 (14.3)	6/7 (85.7)
Conteo absoluto LT CD19+		110- 570	<110
	Total	8/18(44)	10/18(56)
	Severo	6/11 (54.5)	5/11 (45.5)
	Crítico	2/7 (28.6)	5/7 (71.4)
Conteo absoluto NK		70- 480	<70
	Total	15/18(83)	3/18 (17)
	Severo	10/11 (90.9)	1/11 (9.1)
	Crítico	5/7 (71.4)	2/7 (28.6)
IL-6 en suero		5-40 pg/mL	>40 pg/mL
	Total	6/20(30)	14/20(70)
	Severo	5/11 (45.5)	6/11 (54.5)
	Crítico	1/9 (11.1)	8/9 (88.9)
IL-1β en suero		0-12 pg/mL	>12 pg/mL
	Total	12/15(80)	3/15(20)
	Severo	5/6 (83.3)	1/6 (16.7)
	Crítico	7/9 (77.8)	2/9 (22.2)
TNF-α suero		0-10 pg/mL	>10 pg/mL
	Total	12/15(80)	3/15(20)
	Severo	5/6 (83.3)	1/6 (16.7)
	Crítico	7/9 (77.8)	2/9 (22.2)

RIQ: Rango intercuartilico. n: número de pacientes. LT: Linfocito T. LB: Linfocito B

El 100% de los pacientes tuvieron diagnóstico clínico de neumonía, 45% cumplieron el criterio de admisión a la Unidad de Cuidados Intensivos y 35% desarrollaron el síndrome de distrés respiratorio y fueron tratados con ventilación mecánica (Tabla 65).

Considerando el tiempo de hospitalización, la media de estancia hospitalaria en días fue mayor en el grupo de los críticos a comparación de los severos (mediana (RIQ): 42 (29.5-67.5) vs 14 (8-20), respectivamente, $p=0.001$). Además, el tiempo en días de negativización del PCR-RT fue mayor en el grupo de críticos (mediana (IQR): 31 (12.5-37.5)) que en los severos (mediana (IQR):11 (9-15)).

TABLA 65. COMPLICACIONES Y TRATAMIENTO

Característica	Total, de Pacientes (n=20)	Severidad clínica	
		Severo	Crítico
Complicaciones			
Diagnóstico clínico de neumonía — n. /total n. (%)	20/20(100)	11/11 (100)	9/9(100)
Síndrome de distrés respiratorio agudo — n. (%)	7/20 (35)	0/9 (0)	7/9(77.8)
Infarto agudo del miocardio _n (%)	1/20 (5)	1/11 (9.1)	0/9 (0)
Enfermedad tromboembólica venosa_n (%)	1/20 (5)	0/11 (0)	1/9(11.1)
Tratamiento			
Antibiótico intravenoso _n (%)	20(100)	11 (100)	9 (100)
Lopinavir/ritonavir_n(%)	19(95)	10(90.9)	9(100)
Hidroxicloroquina_n(%)	19(95)	10(90.9)	9(100)
Tocilizumab_n(%)	12(60)	3(27.3)	9(100)
Anakinra_n(%)	2(20)	0(0)	2(22.2)
Glucocorticoides sistémicos_n (%)	18(90)	10(90.9)	8(88.9)
Terapia de oxígeno_n (%)	20(100)	11(100)	9(100)
Ventilación mecánica_n (%)	7 (35)	0(0)	7(77.8)
Invasivo	6(30)	0(0)	6(66.7)
No invasivo	1(5)	0(0)	1(11.1)
Criterio para admisión a UCI_n (%)	9 (45)	0(0)	9(100)
Duración de la estancia hospitalaria_mediana (RIQ)_ días	20,00 (12.5-40.75)	14 (8-20)	42 (29.5-67.5)
Duración hasta la negativización del PCR_RT_ mediana (RIQ)_ días	12,50 (10.25-34.75)	11 (9-15)	31 (12.5-37.5)

UCI: Unidad de cuidados intensivos. RIQ: Rango intercuartílico. n: número de pacientes.

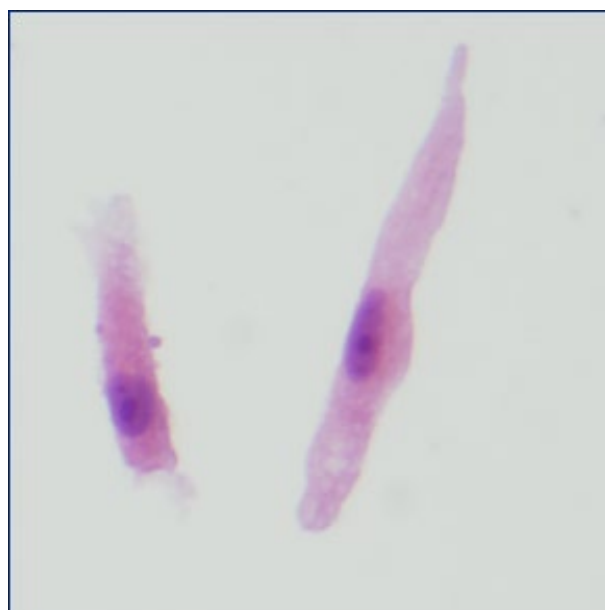
9.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS pMSCs

Tras el cultivo de las pMSCs, se observó que se adhieren al plástico (Foto 7) cumpliendo el primer criterio de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Tras la tinción con hematoxilina-eosina, las células presentan una morfología tipo fibroblástica o poligonales y homogénea (Foto 8).

FOTO 7. CARACTERIZACIÓN DE LAS pMSCs *IN-VITRO* – ADHESIÓN AL PLÁSTICO 1º CRITERIO SEGÚN LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR



FOTO 8. CARACTERIZACIÓN DE LAS pMSCs *IN-VITRO* –MORFOLOGÍA TIPO FIBROBLÁSTICA O POLIGONALES

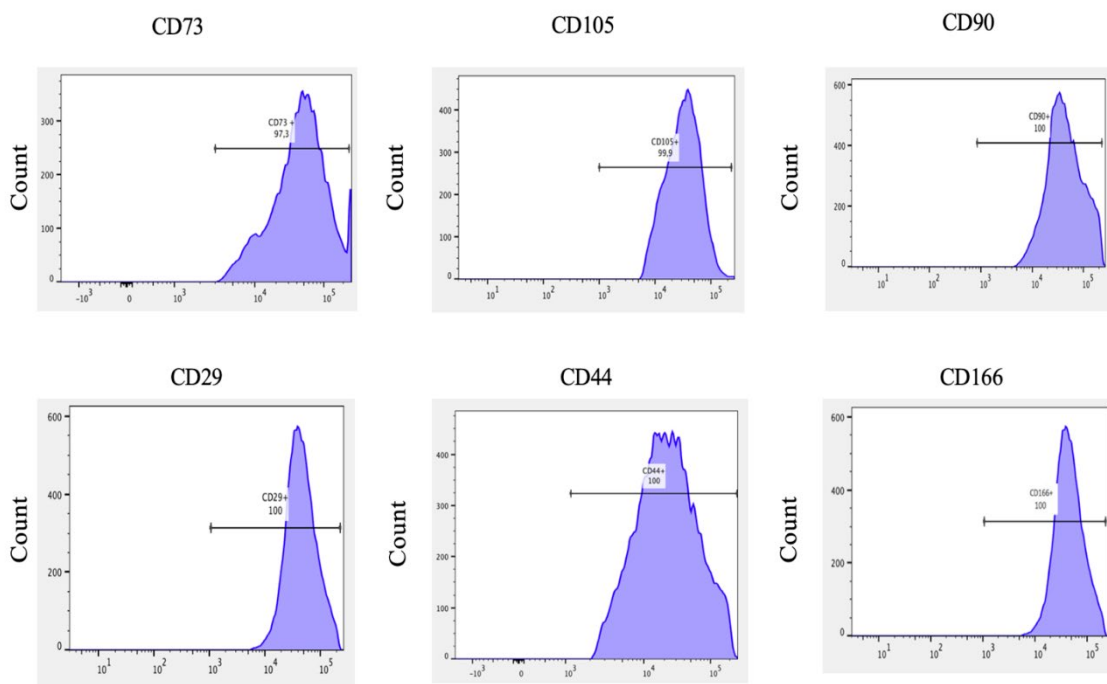


9.3 CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS pMSCs

Se evaluaron la expresión celular de los marcadores mesenquimales CD73, CD105, CD90, CD29 y CD44, la molécula de adhesión celular leucocitaria activada, CD166, los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34, los marcadores de linfocitos B y macrófagos CD19 y CD14 y HLA-DR por citometría de flujo (FACS Canto II) y los resultados se analizaron mediante FACS Diva y FlowJo v10.

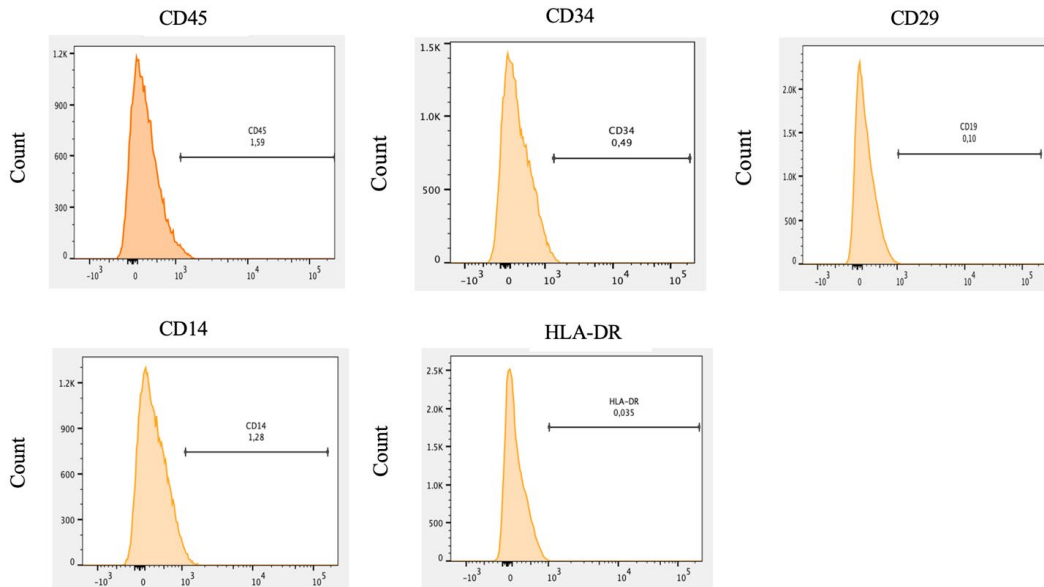
Las pMSCs fueron positivas (Figura 26) para los marcadores de superficie celular CD73, CD105, CD90, CD29, CD44, CD166.

FIGURA 26. MARCADORES POSITIVOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS CANTO II). INMUNOFENOTIPO DE LAS pMSCs. 2º CRITERIO SEGÚN LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR



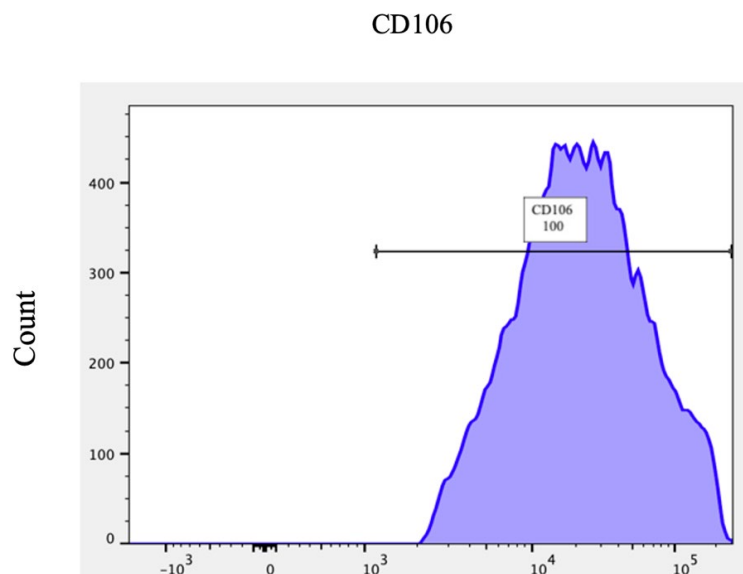
Las pMSCs fueron negativas (Figura 5) para los marcadores de superficie celular CD45, CD34, CD19, CD14 y HLA-DR.

FIGURA 27. MARCADORES NEGATIVOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS CANTO II). INMUNOFENOTIPO DE LAS pMSCs. 2º CRITERIO SEGÚN LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR



Además, las pMSCs fueron positivas para el marcador CD106 relacionado a propiedades inmunomoduladoras de la membrana coriónica (Figura 28).

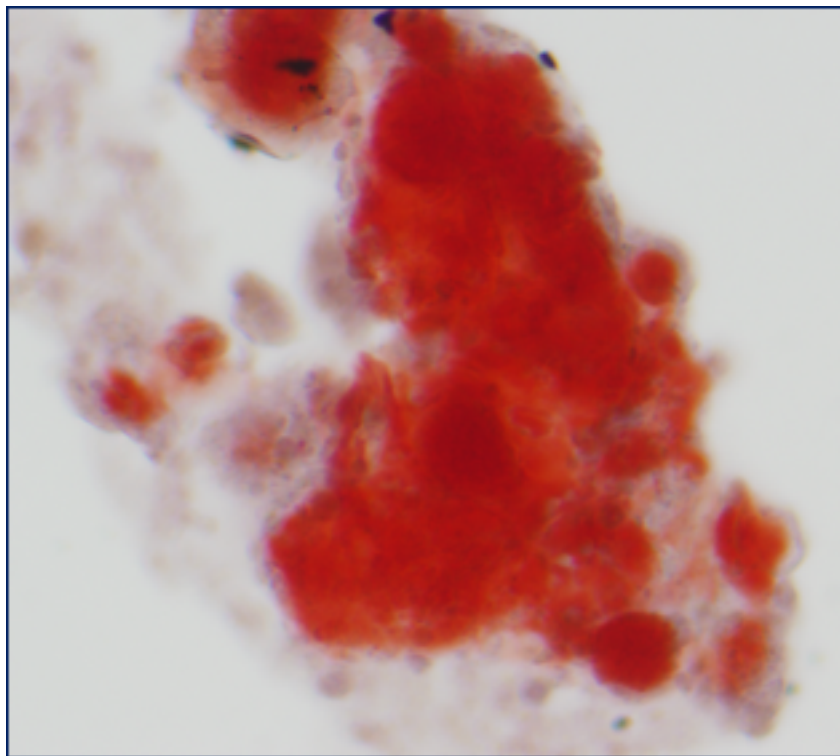
FIGURA 28. MARCADOR CD106+ ASOCIADO A PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS



9.4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS pMSCs

Tras el cultivo en el medio de diferenciación (STEMPRO® Differentiation Kit) y posterior tinción con la solución Alizarin Red S en la línea osteogénica se observó bajo un microscopio de luz los depósitos de calcio teñidos de rojo. (Foto 9)

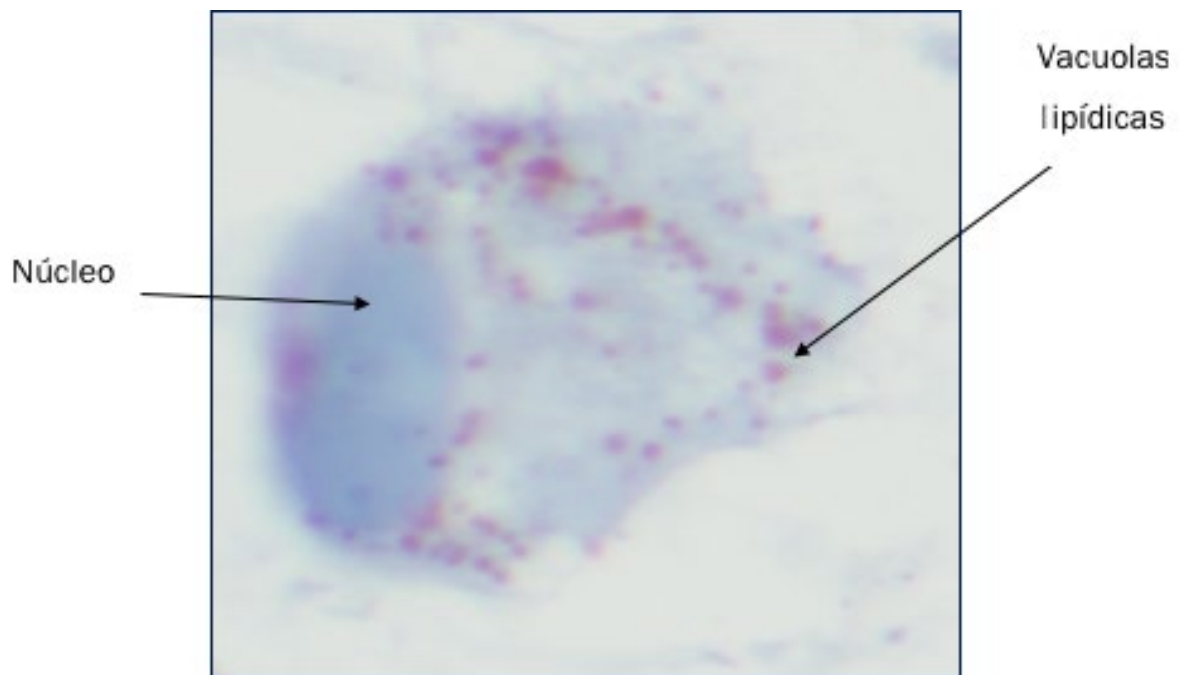
FOTO 9. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE LAS PMSC. 3º CRITERIO
SEGÚN LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR



40x

Posterior al cultivo celular con el medio de diferenciación (StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit), se observaron las vacuolas lipídicas tras la tinción con Oil Red O (Foto 10).

FOTO 10. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA DE LAS pMSCs. 3º CRITERIO
SEGÚN LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR

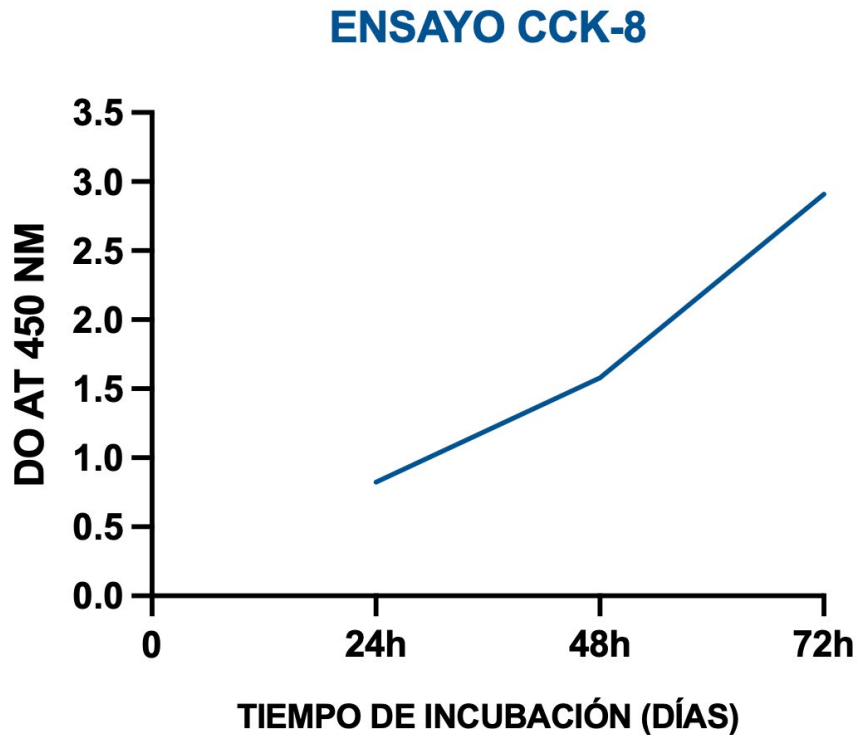


100X

9.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS pMSCs

Tras la adición de la solución de CCK-8 (SIGMA ALDRICH), incubación y medición de la absorbancia a 450 nm mediante el lector de microplacas se observó la proliferación de las pMSCs (Figura 29).

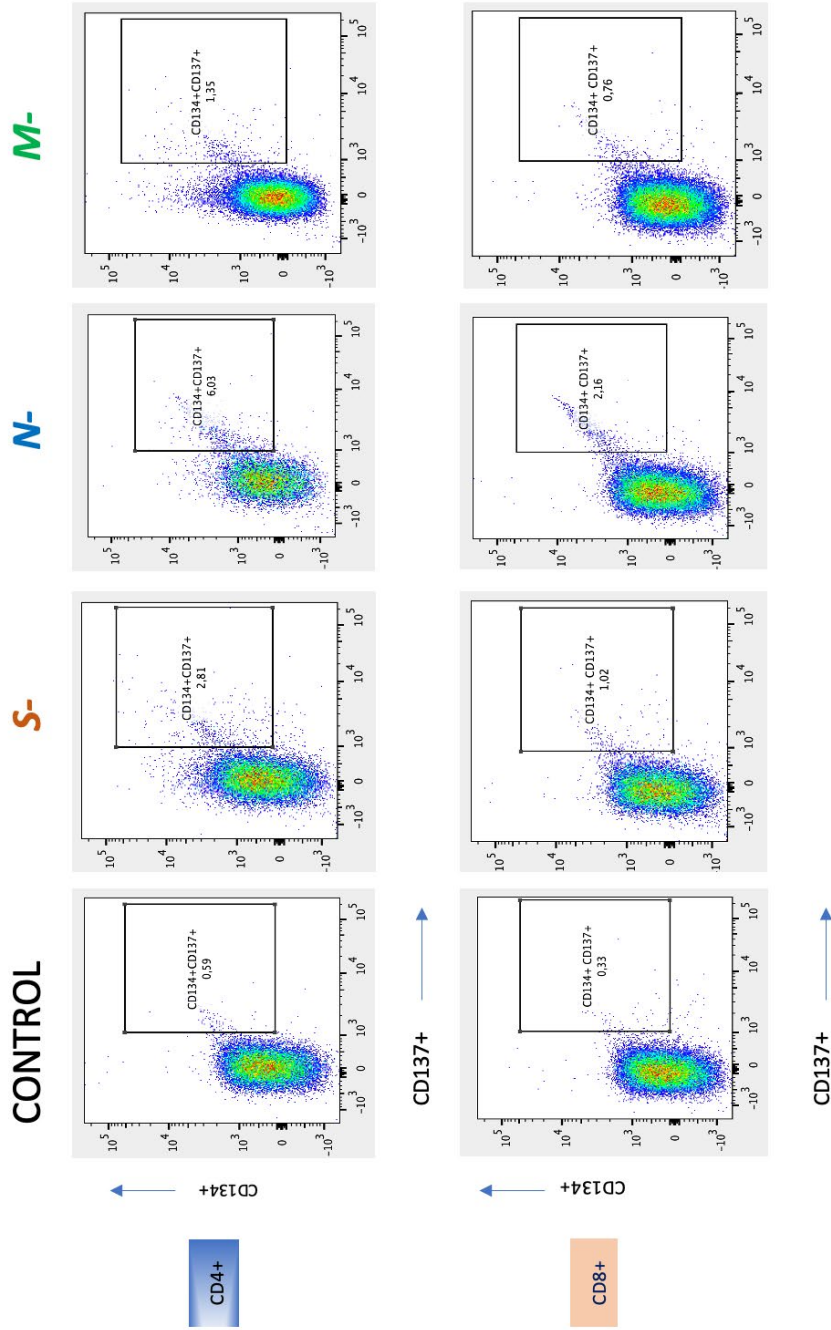
FIGURA 29. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE EL KIT DE CONTEO CELULAR-8



9.6 INMUNIDAD DE CÉLULAS T REACTIVAS AL SARS-CoV-2

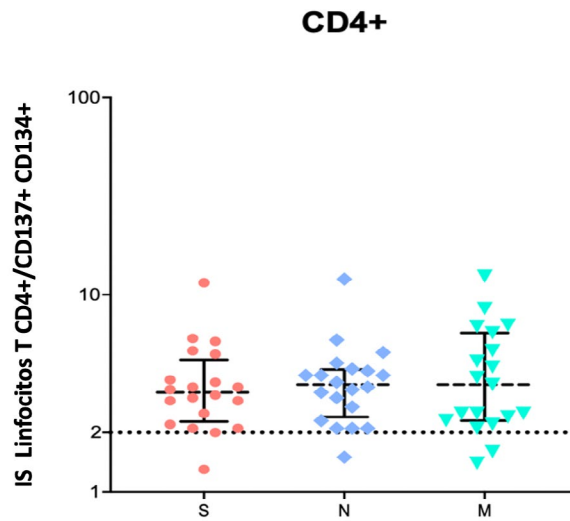
Analizamos las muestras de sangre extraídas después del alta hospitalaria (tiempo desde la última prueba negativa en días, mediana (RIQ) 162.5 días (143.25-169.5) (Tabla 66) de una cohorte de 20 pacientes con COVID-19 severo (11 pacientes) y crítico (9 pacientes). De esta manera, 11 pacientes con un total de 33 muestras fueron categorizados como severos y 9 pacientes con 27 muestras como críticos.

FIGURA 30. PLOTS REPRESENTATIVOS DE LAS CÉLULAS T CD4+ Y T CD8+ TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-COV-2.



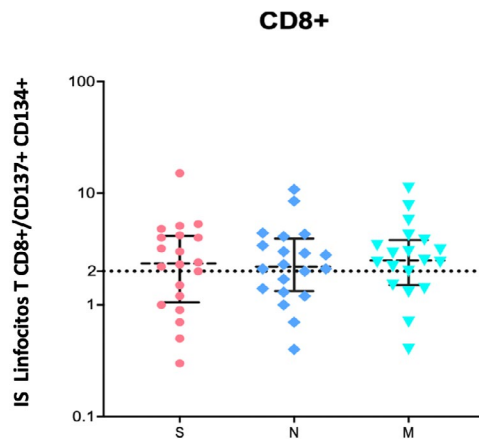
Las células T CD4+ y T CD8+ antígenos específicos reactivas al SARS-Cov-2 fueron identificadas con la expresión de marcadores CD134 y CD137

FIGURA 31. ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+ CD137+ CD134+ (LINFOCITOS T CD4+ESPECÍFICOS DEL SARS-COV-2)



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; las barras de error representan los rangos intercuartílicos (RIQ). $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

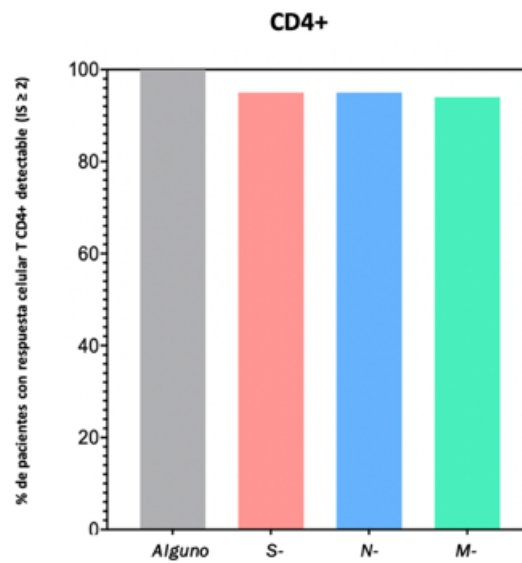
FIGURA 32. EL ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN (IS) DE LOS LINFOCITOS T CD8+ CD137+ CD134+ CD8+(LINFOCITOS T CD8+ESPECÍFICOS DEL SARS-COV-2)



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; las barras de error representan los rangos intercuartílicos (RIQ). $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

El porcentaje de los pacientes que tuvieron respuesta celular T CD4+ fueron detectables en al menos 1 muestra en 20 (100 %), para S- 95%, N- 96% y M- 95%.

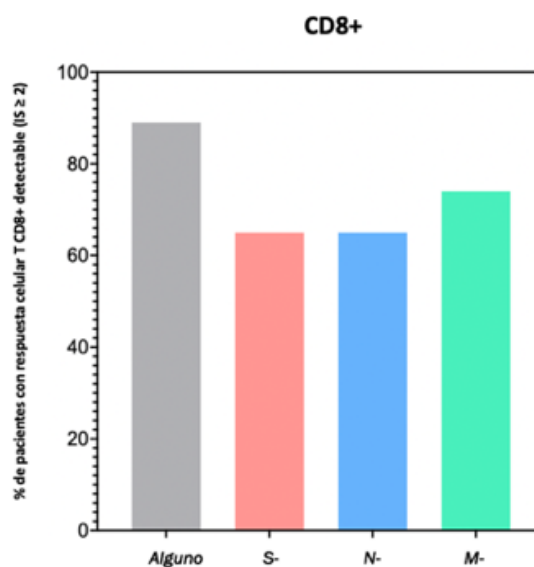
FIGURA 33. PORCENTAJE DE PACIENTES CON RESPUESTA CELULAR T CD4+ TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



n: 20 pacientes recuperados de COVID-19 tras 5-6 meses (mediana 162.5 días) de la prueba PCR-RT negativa.

El porcentaje de los pacientes que tuvieron respuesta celular T CD8+ fueron detectables en al menos 1 muestra en 17 (89%), para las proteínas S- y N- el 65% de pacientes y el 74% para la proteína M-.

FIGURA 34. PORCENTAJE DE PACIENTES CON RESPUESTA CELULAR T CD8+ TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-COV-2



n: 20 pacientes recuperados de COVID-19 tras 5-6 meses (mediana 162.5 días) de la prueba PCR-RT negativa.

Considerando la respuesta celular por muestra, detectamos respuesta celular T CD4+ en 55 y respuesta celular T CD8+ en 40 de 60 muestras de pacientes al menos frente a una de las proteínas del SARS-CoV-2. Sin embargo, ninguna de las proteínas S-, N- y M- indujo respuesta celular T CD4+ o CD8+, en forma independiente en todos los pacientes, pero sí de manera conjunta. Dentro de las 55 muestras que respondieron, los linfocitos T CD4+ antígeno-específicas mostraron respuesta detectable en S=19, N=19, M=17 muestras, mientras que de las 40 muestras que presentaron respuesta celular antígeno-específica T CD8+, la proteína M respondió en más muestras, M=14, S=13, N=13. (Figura 35 y Figura 36).

FIGURA 35. DIAGRAMAS DE VENN DE 20 PACIENTES CON COVID-19 CON RESPUESTA CELULAR ANTÍGENO-ESPECÍFICA T CD4+ DETECTABLES ($IS \geq 2$) DEL SARS-CoV-2 TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M-

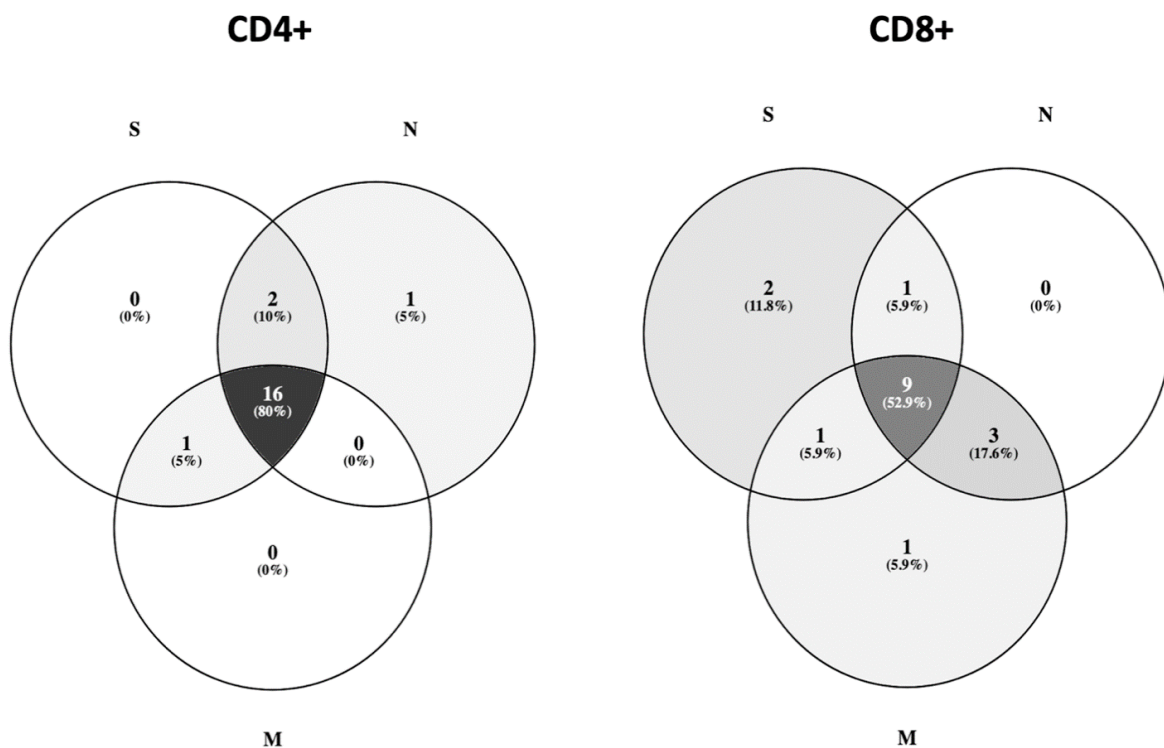
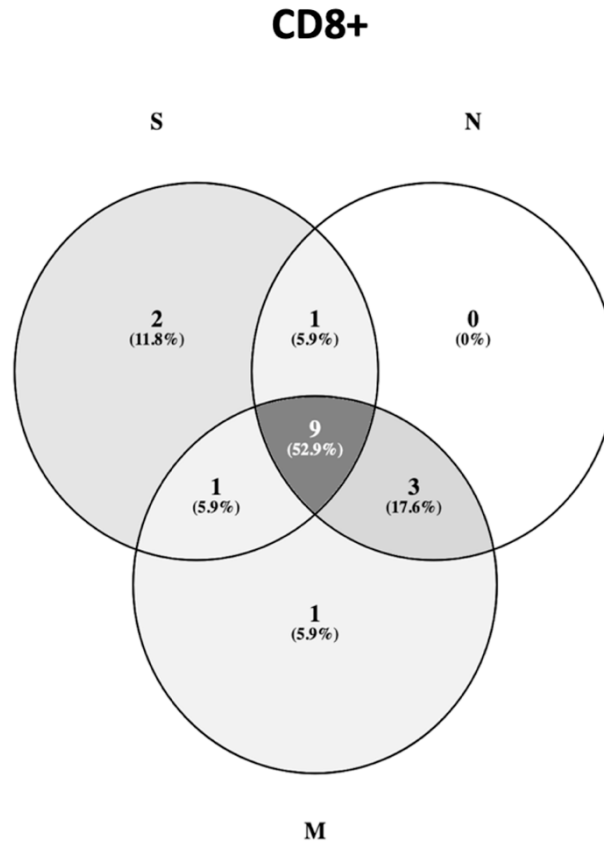
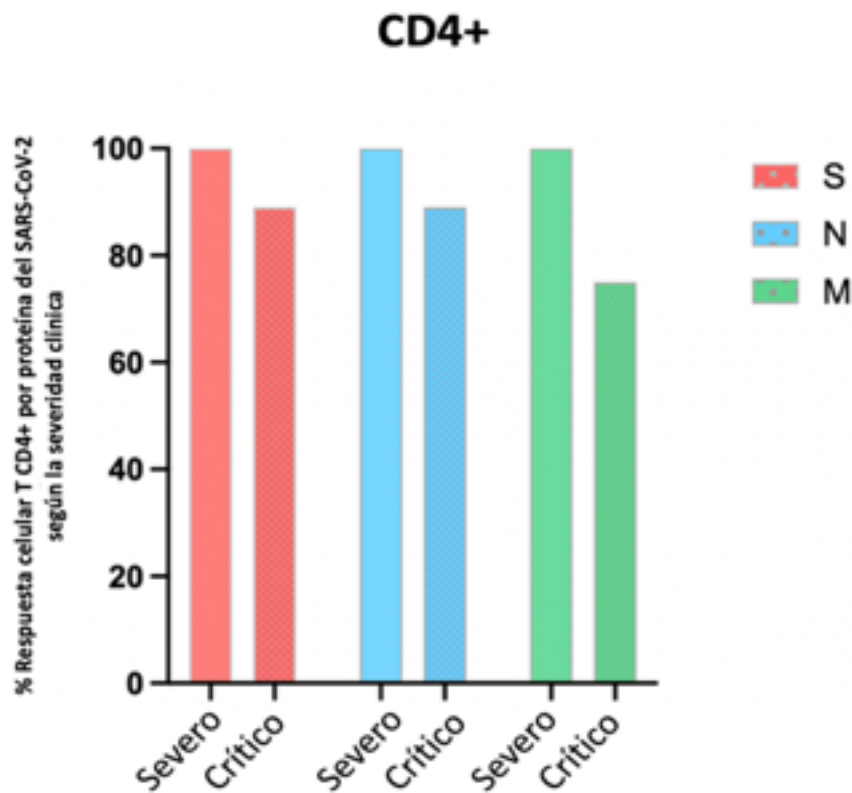


FIGURA 36. DIAGRAMAS DE VENN DE 20 PACIENTES CON COVID-19 CON RESPUESTA CELULAR ANTÍGENO ESPECÍFICA T CD8+ DETECTABLES ($IS \geq 2$) DEL SARS-CoV-2 TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M-



Analizando por grupo de severidad clínica, con la prueba Chi-cuadrado, se observa que la respuesta celular antígeno-específica T CD4+ es más frecuente en el grupo severo a comparación de los críticos, sin embargo, no es significativa estadísticamente. En la respuesta antígeno-específica T CD4+ frente a las proteínas S- y N- se observó en el 100% de los pacientes del grupo de severo mientras que en el grupo de críticos en el 88.9% ($p=0.648$). La respuesta celular T CD4+ frente a las proteínas M- se observa en el 66.7% de los pacientes en el grupo de críticos mientras que en el grupo de severos en el 100% ($p=0.332$). (Figura 37 y Figura 38).

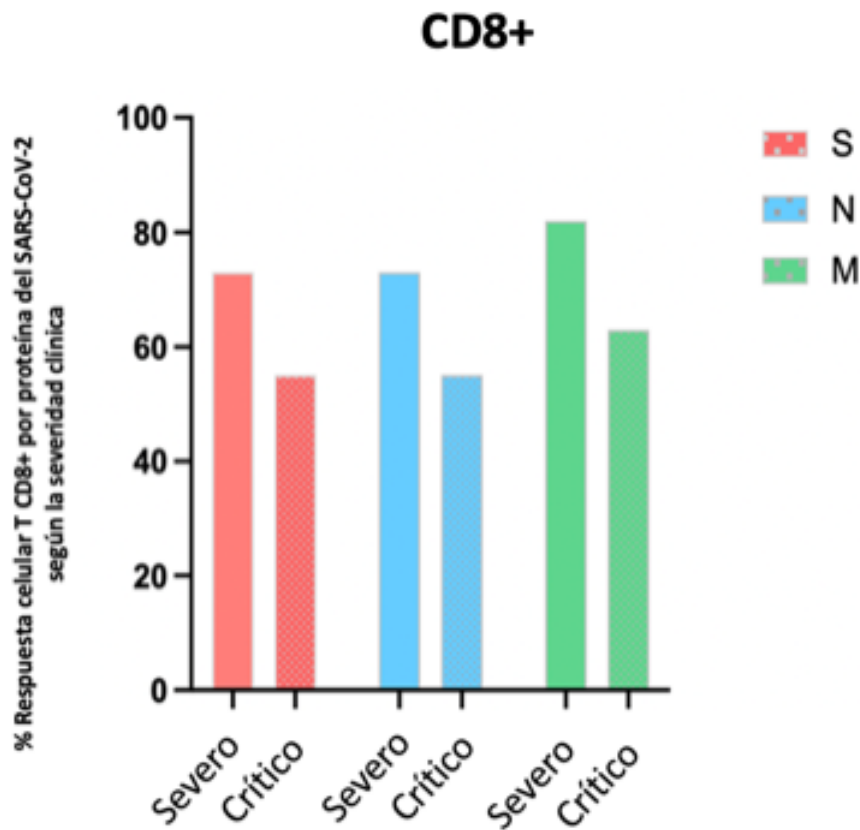
FIGURA 37. PORCENTAJE DE LA RESPUESTA CELULAR T CD4+ ($IS \geq 2$) FRENTE A LA ESTIMULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-COV-2 SEGÚN LA SEVERIDAD CLÍNICA



20 pacientes recuperados de COVID-19 tras 5-6 meses (mediana 162.5 días) de la prueba PCR-RT negativa.

Del mismo modo, la repuesta celular antígeno-específica T CD8+ por severidad clínica frente a las proteínas S- se observa en el 72.7%, de los pacientes del grupo de severo mientras que en el grupo de críticos en el 55.6% ($p=0.581$). Para la proteína N- la respuesta antígeno-específica T CD8+, se observa en el 72.7% de los pacientes en el grupo de severos mientras que en el grupo de críticos en el 44.4% ($p=0.388$). Además, para la proteína M- la respuesta antígeno-específica T CD8+, se observa en el 81.8% de los pacientes en el grupo de severos, mientras que en el grupo de críticos en el 55.6.% ($p=0.424$).

FIGURA 38. PORCENTAJE DE LA RESPUESTA CELULAR T CD8+ ($IS \geq 2$) FRENTE A LA ESTIMULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-COV-2 SEGÚN LA SEVERIDAD CLÍNICA



20 pacientes recuperados de COVID-19 tras 5-6 meses (mediana 162.5 días) de la prueba PCR-RT negativa.

Examinando las citocinas en el sobrenadante de cada pocillo para el control (sin estímulo antigénico) y para las proteínas S-, N- y M- de cada paciente analizamos, como se observa en la Tabla 67 a continuación y en las figuras de cada citocina, IL-2 (Figura 39), IFN- γ (Figura 40), TNF- α (Figura 41), IL-4 (Figura 42), IL-17 (Figura 43) e IL-1 β (Figura 44).

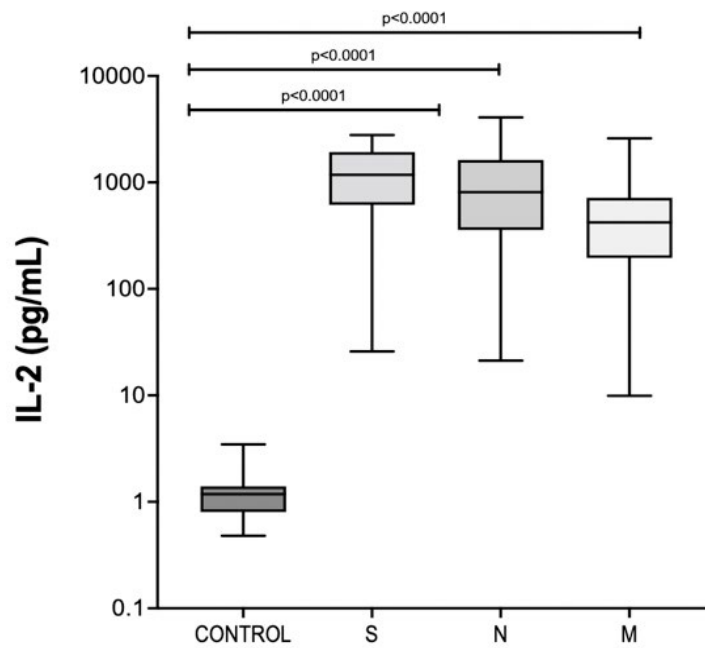
TABLA 67. CITOCINAS BASALES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON PÉPTIDOS S-, N-, M- DEL SARS-CoV-2

Citocina	Proteína S			Proteína N		Proteína M	
	Control	S	valor p	N	valor p	M	valor p
IL-2							
mediana	1.18	1179.7	<0,0001	811	<0,0001	420	<0,0001
(RIQ)	(0.8 – 1.4)	(615.3-1934)		(357.8 – 1624.7)		(194.9- 716.7)	
IFN-γ							
mediana	0.43	137.4	<0,0001	59.65	<0,0001	50.6	<0,0001
(RIQ)	(0- 1.6)	(57.9-334)		(21- 149.9)		(19.4- 109.4)	
TNF_α							
mediana	5	81.9	<0,0001	39.7	<0,0001	39.9	<0,0001
(RIQ)	(1.5 - 24)	(28.4-206.8)		(25.8 - 110.1)		(12- 90)	
IL-4							
mediana	0.82	0.97	0.249	0.79	0.462	0.91	0.854
(RIQ)	(0.4- 1.1)	(0.45-1.4)		(0.43 – 1.3)		(0.25-1.3)	
IL-17A							
mediana	1.79	5.3	<0,0001	2.5	0.575	5.9	0.007
(RIQ)	(0.9- 5)	(2.2-14)		(0.9 – 5.9)		(1.6-9.8)	
IL_1β							
mediana	1.2	11.86	0.001	13.23	0.009	6.1	0.001
(RIQ)	(0.75 -1.9)	(4-158.8)		(4.1-21.3)		(2.6-12.9)	

RIQ: Rango intercuartílico.

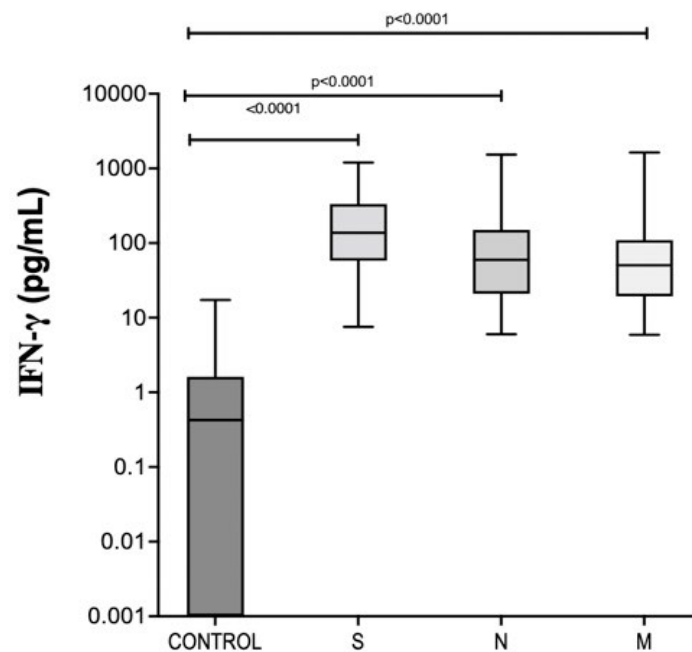
Observamos un aumento significativo y dominante de las citocinas IL-2, IFN-γ y TNF-α con respecto al control para las proteínas S-, N- y M-. ($p < 0,0001$).

FIGURA 39. NIVELES DE IL-2 EN EL SOBRENADANTE DEL CONTROL VS LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



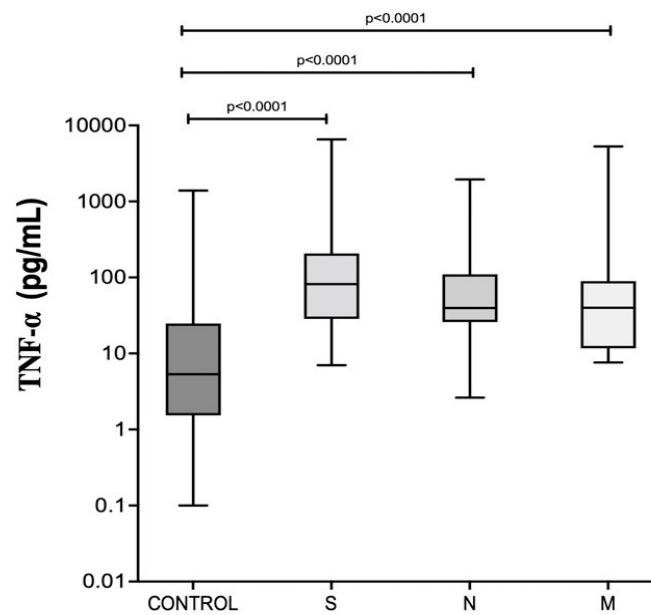
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon . $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

FIGURA 40. NIVELES DE IFN- γ EN EL SOBRENADANTE DEL CONTROL VS LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon . $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

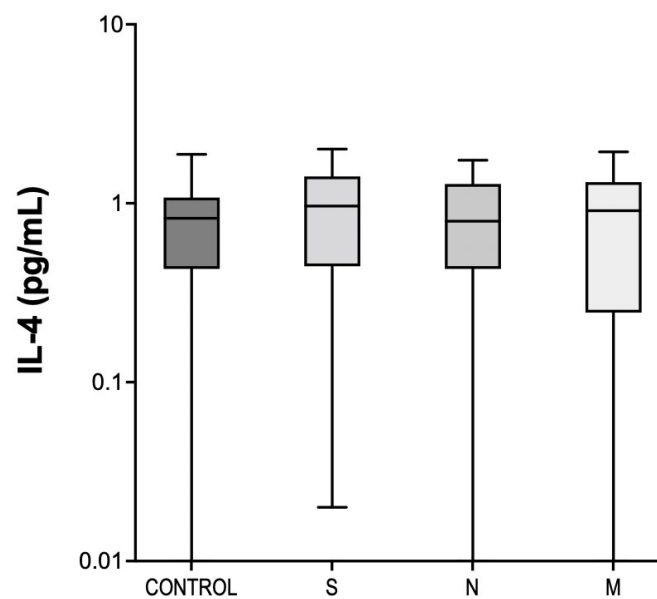
FIGURA 41. NIVELES DE TNF- α EN EL SOBRENADANTE DEL CONTROL VS LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

No observamos respuesta Th2. No se muestra diferencias de los niveles de IL-4 en todas las muestras con respecto al control.

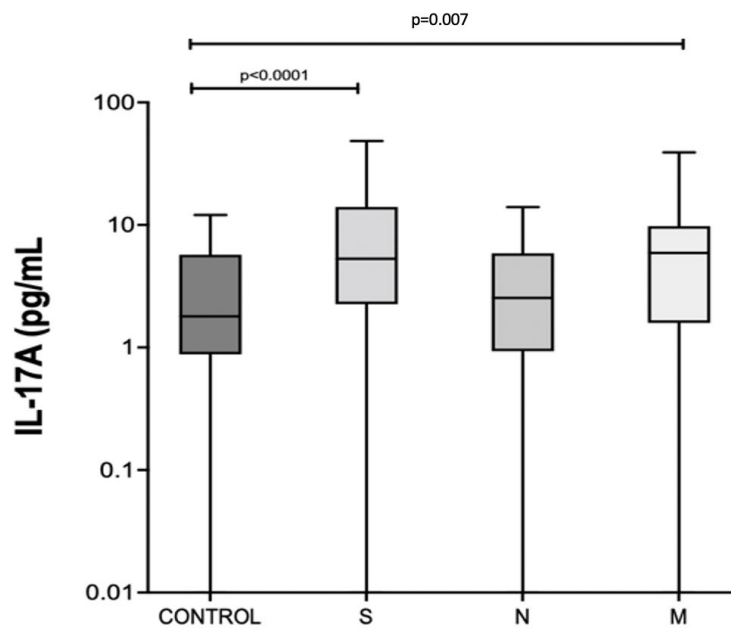
FIGURA 42. NIVELES DE IL-4 EN EL SOBRENADANTE DEL CONTROL VS LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Analizando la respuesta Th17, se observa aumento de IL-17-A con respecto al control frente a las proteínas S-, y M- sin embargo, para N- no es significativo. Aunque hay un aumento significativo, los valores están por debajo de límite de detección de la prueba según el fabricante que es de 18.9 pg/ml. De los 20 pacientes se observó 3 pacientes con niveles de 24,9; 31,2 y 48,5 pg/ml para la proteína S y para la proteína M sólo 1 paciente con 39.05 pg/ml.

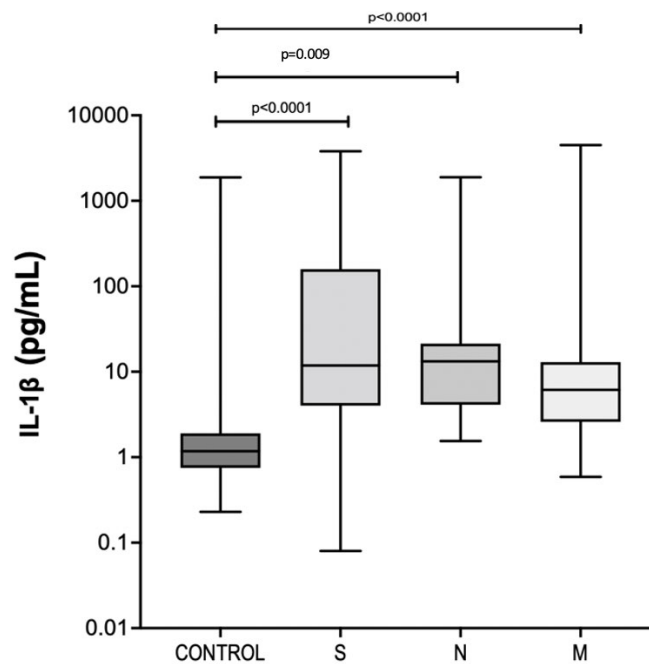
FIGURA 43. NIVELES DE IL-17-A EN EL SOBRENADANTE DEL CONTROL VS LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativos.

También, observamos el aumento significativo de IL-1 β con respecto a los controles.

FIGURA 44. NIVELES DE IL-1 β EN EL SOBRENADANTE DEL CONTROL VS LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

9.6.1 LA MAGNITUD Y FUNCIONALIDAD DE LA RESPUESTA CELULAR

En la Tabla 68 se observa el % de la magnitud de respuesta significativa de las células antígeno-específica T CD4+ frente a las proteínas S-, N-, y M- del SARS-CoV-2 con respecto al control. Al comparar la magnitud de respuesta celular T entre las proteínas S-, N- y M- no se observan diferencias, $p=0.987$.

TABLA 68. MAGNITUD DE RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T CD4+ ESPECÍFICAS DEL SARS-CoV-2 EN LOS PACIENTES RECUPERADOS DE COVID-19

Citocina	Proteína S		Proteína N		Proteína M	
	CONTROL	S- Valor p	N- Valor p	M- Valor p		
CD4+						
mediana	0.71	1.9	2.9	2.2		
(RIQ)	(0.3- 1.3)	(1-4.3)	(1-4.7)	(1-3.8)		

Rango Intercuartílico (RIQ). Se realiza el análisis antes y después con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas. Para comparar los valores de las 3 proteínas se utiliza la prueba no paramétrica de Friedman para muestras relacionadas. $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

En la Tabla 69 se observa el % de la magnitud de respuesta significativa de las células antígeno-específica T CD8+ frente a las proteínas S-, N-, y M- del SARS-CoV-2 con respecto al control. Al comparar la magnitud de respuesta celular T entre las proteínas S-, N- y M- no se observan diferencias, $p=0.362$.

TABLA 69. MAGNITUD DE RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T CD8+ ESPECÍFICAS DEL SARS-CoV-2 EN LOS PACIENTES RECUPERADOS DE COVID-19

Citocina	Proteína S		Proteína N		Proteína M	
	CONTROL	S- Valor p	N- Valor p	M- Valor p		
CD8+						
mediana	0.57	1.3	1.2	1.5		
(RIQ)	(0.3-0.76)	(0.6-2.4)	(0.7-1.9)	(0.7-2.4)		

Rango Intercuartílico (RIQ). Se realiza el análisis antes y después con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas. Para comparar los valores de las 3 proteínas se utiliza la prueba no paramétrica de Friedman para muestras relacionadas. $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

9.6.2 QUIMIOCINAS INDUCIDAS POR IFN- γ

Examinando las quimiocinas en el sobrenadante de cada pocillo para el control (sin estímulo antigénico) y para las proteínas S-, N- y M- de los 20 pacientes, analizamos como se observa en la Tabla 70 a continuación y en las figuras de cada quimiocina inducidas por IFN CXCL10/IP-10 (Figura 45), CCL2/MCP-1 (Figura 46), CXCL9/MIG (Figura 47), y CCL5/RANTES (Figura 48).

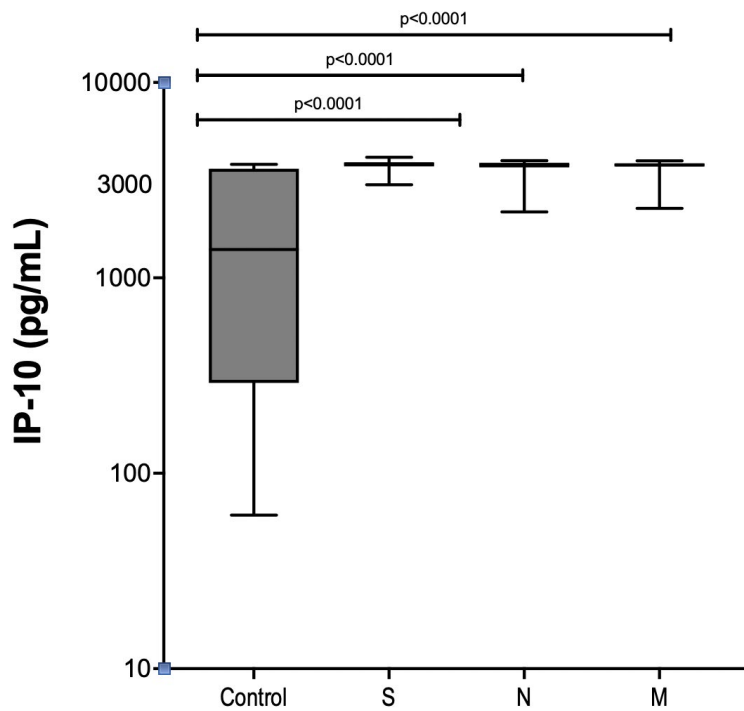
Las quimiocinas inducidas por IFN secretadas por las CMSPs tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2, fueron elevadas significativamente en el sobrenadante para las tres proteínas. ($p < 0,0001$).

TABLA 70. QUIMIOCINAS BASALES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LOS PÉPTIDOS S-, N-, M- DEL SARS-CoV-2

Quimiocina	Proteína S			Proteína N		Proteína M	
	CONTROL	S	Valor p	N	Valor p	M	Valor p
IP-10							
mediana	1398.1	3838.4	<0.0001	3791.8	0.001	3785.9	<0,0001
(RIQ)	(290.3 - 3620)	(3723.4-3901.6)		(3677.7 – 3876.3)		(3712.2- 3854)	
MCP-1							
mediana	510.9	12157.6	<0.0001	14922.3	<0,0001	14548.1	<0,0001
(RIQ)	(90 - 3854)	(10362-23474.6)		(5619.5- 16813)		(11965.3 - 26543)	
MIG							
mediana	108.5	3126.7	<0,0001	3037.3	<0,0001	3436.54	<0,0001
(RIQ)	(19.4 - 1606)	(2314-3964.2)		(1907.5 - 3917)		(2536 – 4238.5)	
RANTES							
mediana	2233.5	2911.1	<0,0001	2699.8	<0,0001	2623.9	<0.0001
(RIQ)	(1199 - 2722)	(1952.1-4751.2)		(1666 – 3984.18)		(1703- 3805.3)	

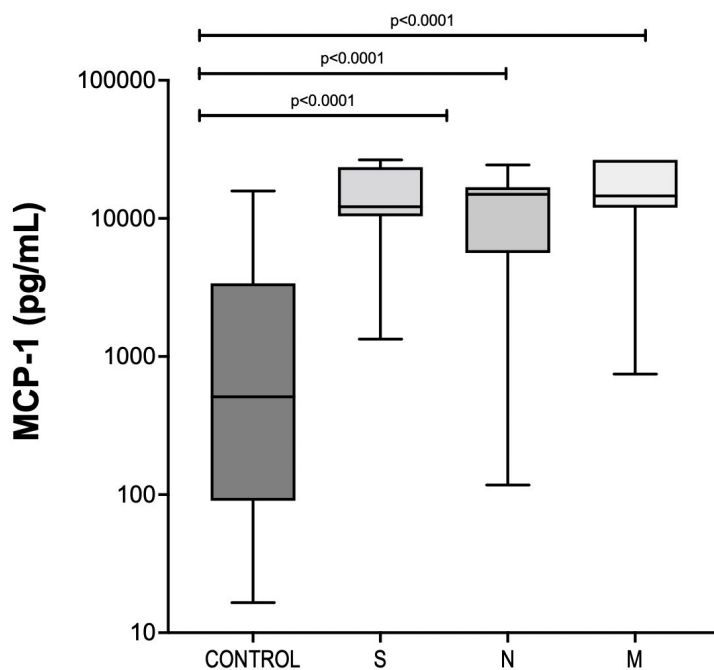
RIQ: Rango intercuartílico

FIGURA 45. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DE LA PRODUCCIÓN DE QUIMIOCINA CXCL10/IP-10 SECRETADAS POR LAS CMSPs EN LOS SOBRENADANTES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON S -, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



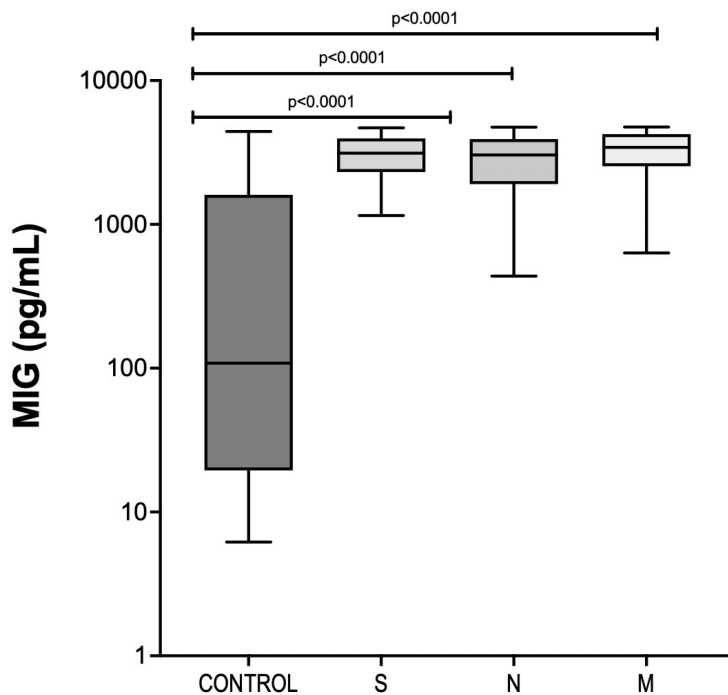
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 46. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DE LA PRODUCCIÓN DE LA QUIMIOCINA CCL2/MCP-1 SECRETADAS POR LAS CMSPs EN LOS SOBRENADANTES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON S -, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



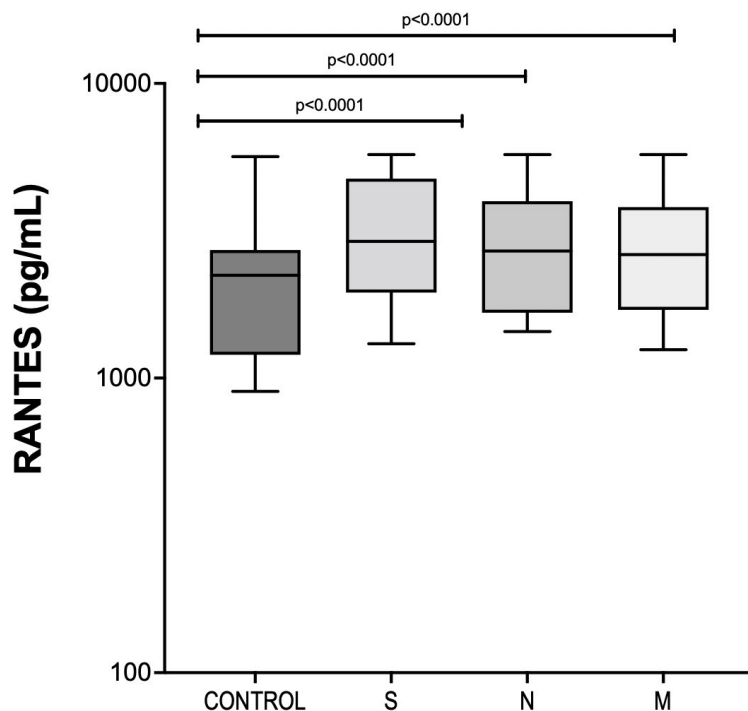
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 47. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DE LA PRODUCCIÓN DE QUIMIOCINA CXCL9/MIG SECRETADAS POR LAS CMSPs EN LOS SOBRENADANTES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON S -, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 48. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DE LA PRODUCCIÓN DE LA QUIMIOCINA CCL5/RANTES SECRETADAS POR LAS CMSPs EN LOS SOBRENADANTES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON S -, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

9.7 ENSAYO DE CO-CULTIVO IpMSCs / rCMSPs

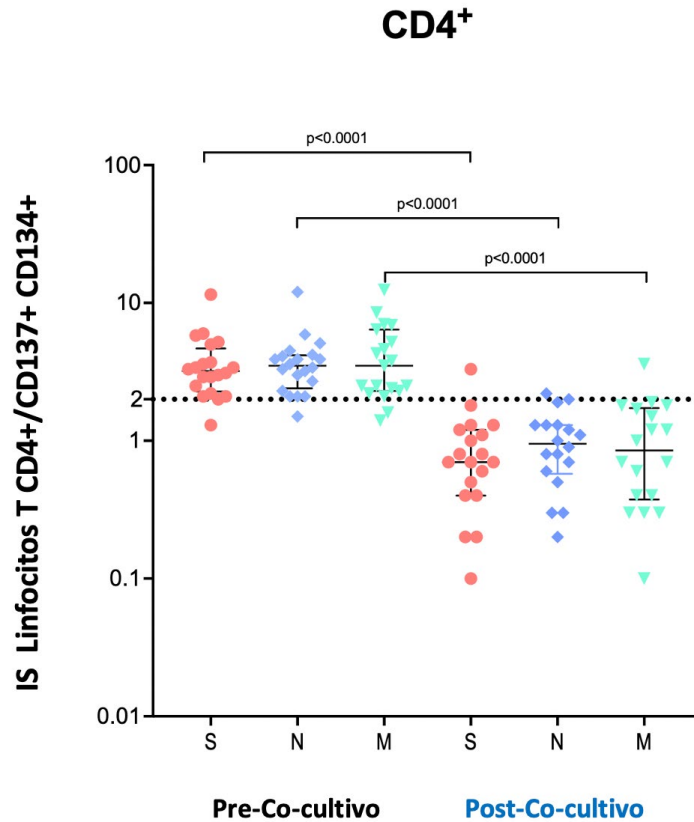
Tras el co-cultivo, analizamos las IpMSCs y las rCMSPs cultivados en los compartimentos, superior e inferior del sistema de transwell respectivamente.

La frecuencia de la respuesta celular antígenos- específicas T CD4+ con $IS \geq 2$ en la estimulación previa en comparación con el posterior co-cultivo para los antígenos S-, N- y M- se muestran en la tabla 71 y la figura 49. Las células antígenos- específicas T CD4+ con $IS \geq 2$ por proteína S-, N- y M- disminuyeron en frecuencia con diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.001$.

TABLA 71. FRECUENCIA DE RESPUESTA CELULAR ANTÍGENO-ESPECÍFICA DE CD4+ EN PACIENTES RECUPERADOS DE COVID-19

<i>Antígeno</i>	CD4+ Estimulación Pre $IS \geq 2$	Co-cultivo con IpMSCs $IS \geq 2$
<i>Alguno</i>	20	3
<i>S-</i>	19	1
<i>N-</i>	19	2
<i>M-</i>	17	1

FIGURA 49. PLOT REPRESENTATIVO DE LA COMPARACIÓN DE PRE Y POST DEL CO-CULTIVO DE LA FRECUENCIA DEL ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN (IS) DE LOS LINFOCITOS T CD4+ CD137+ CD134+ (LINFOCITOS T CD4+ESPECÍFICOS DEL SARS-COV-2) FRENTE A LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



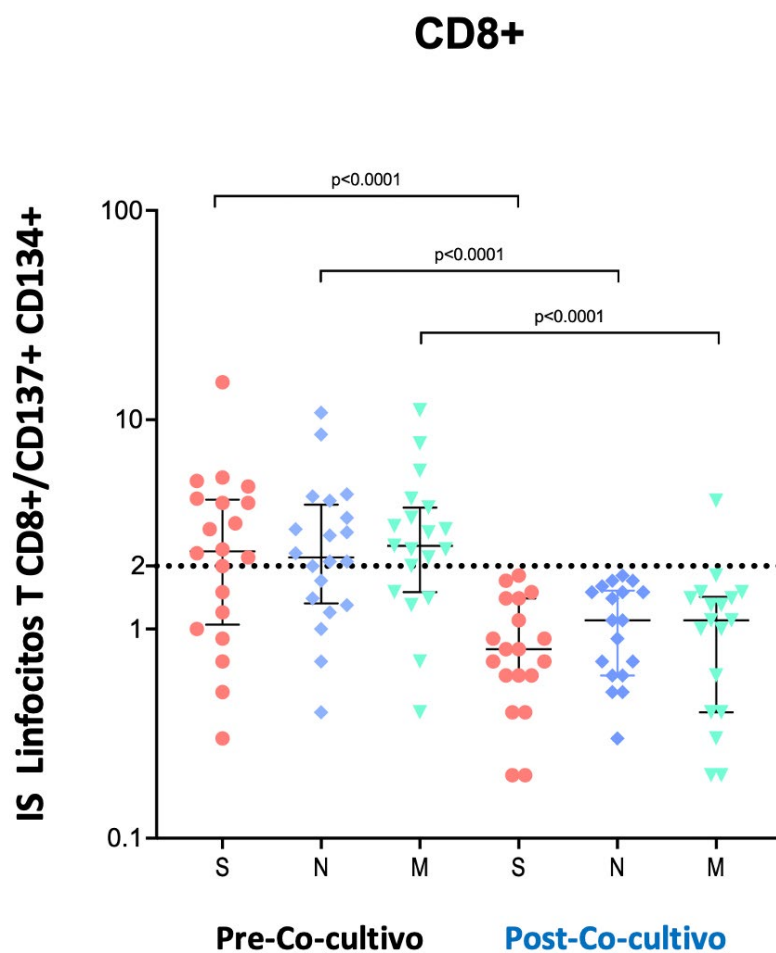
Los valores ≥ 2 se calcularon dividiendo la respuesta medida del subconjunto de linfocitos T por la respuesta respectiva en el control. Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; las barras de error representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

La frecuencia de la respuesta celular antígeno- específica T CD8+ con $IS \geq 2$ en la estimulación previa en comparación con el posterior co-cultivo para los antígenos S-, N- y M- se muestran en la tabla 72 y la figura 50. Las células antígenos-específicas T CD8+ con $IS \geq 2$ por proteína S-, N- y M- disminuyeron en frecuencia con diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$.

TABLA 72. FRECUENCIA DE RESPUESTA CELULAR ANTÍGENO-ESPECÍFICA DE CD8+ EN PACIENTES RECUPERADOS DE COVID-19

	CD8+	
	Estimulación Pre IS \geq 2	Co-cultivo con IpMSCs IS \geq 2
Any	17	1
S-	13	0
N-	12	1
M-	14	1

FIGURA 50. PLOT REPRESENTATIVO DE LA COMPARACIÓN DE PRE Y POST DEL CO-CULTIVO DE LA FRECUENCIA DEL ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN (IS) DE LOS LINFOCITOS T CD8+ CD137+ CD134+ (LINFOCITOS T CD8+ESPECÍFICOS DEL SARS-CoV-2) FRENTE A LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los valores ≥ 2 se calcularon dividiendo la respuesta medida del subconjunto de linfocitos T por la respuesta respectiva en el control. Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; las barras de error representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p<0.05$ se considera estadísticamente significativo.

En la tabla se observa la comparación entre el % de la magnitud de respuesta significativa de las células antígeno-específica T CD4+ frente a las proteínas S-, N-, y M- del SARS-CoV-2 del cultivo PRE, linfocitos estimulados, y POST, co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs. Para las tres proteínas se observa disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Al comparar la magnitud de respuesta celular T en el Post (co-cultivo) entre las proteínas S-, N- y M- no se observan diferencias estadísticamente significativas, $p = 0.424$.

TABLA 73. COMPARACIÓN DE ANTES Y DESPUÉS DEL CO-CULTIVO DE LA MAGNITUD DE LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T CD4+ CD137+ CD134+ (LINFOCITOS T CD4+ESPECÍFICOS DEL SARS-CoV-2) FRENTE A LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2

Citocina	Proteína S			Proteína N			Proteína M		
	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p
CD4+									
mediana	1.4	0	<0.001	1.9	0.16	<0.001	1.3	0.19	<0.001
(RIQ)	(0.6-2.9)	(0-4)		(0.6-3.2)	(0-0.69)		(0.6-2.9)	(0-0.43)	

Se muestra la mediana con los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

En la tabla se observa la comparación entre el % de la magnitud de respuesta significativa de las células antígeno-específica T CD8+ frente a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2 del cultivo PRE, linfocitos estimulados, y POST, co-cultivo con las rPBMCs y las IpMSCs. Para las tres proteínas se observa disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Al comparar la magnitud de respuesta celular T en el Post (co-cultivo) entre las proteínas S-, N- y M- no se observan diferencias estadísticamente significativas, $p = 0.424$.

TABLA 74. COMPARACIÓN DE ANTES Y DESPUÉS DEL CO-CULTIVO DE LA MAGNITUD DE LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T CD8+ CD137+ CD134+ (LINFOCITOS T CD4+ESPECÍFICOS DEL SARS-CoV-2) FRENTE A LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2

Citocina	Proteína S			Proteína N			Proteína M		
	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p
CD8+									
mediana	0.82	0	<0.001	0.78	0.03	0.003	0.67	0.05	0.018
(RIQ)	(0.03-1.5)	0-0.06		(0.2-1.3)	(0-0.2)		(0.3-1.3)	(0-0.32)	

Se muestra la mediana con los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

En coherencia con los datos anteriores, tras el co-cultivo se observa disminución del porcentaje de pacientes con células T CD4+ y T CD8+ antígeno-específicas del SARS-CoV-2 (Figura 51 y Figura 52).

FIGURA 51. PLOT COMPARATIVO DEL PRE Y POST DEL % DE PACIENTES CON RESPUESTA CELULAR T CD4+ ANTÍGENO-ESPECÍFICA (IS ≥ 2)

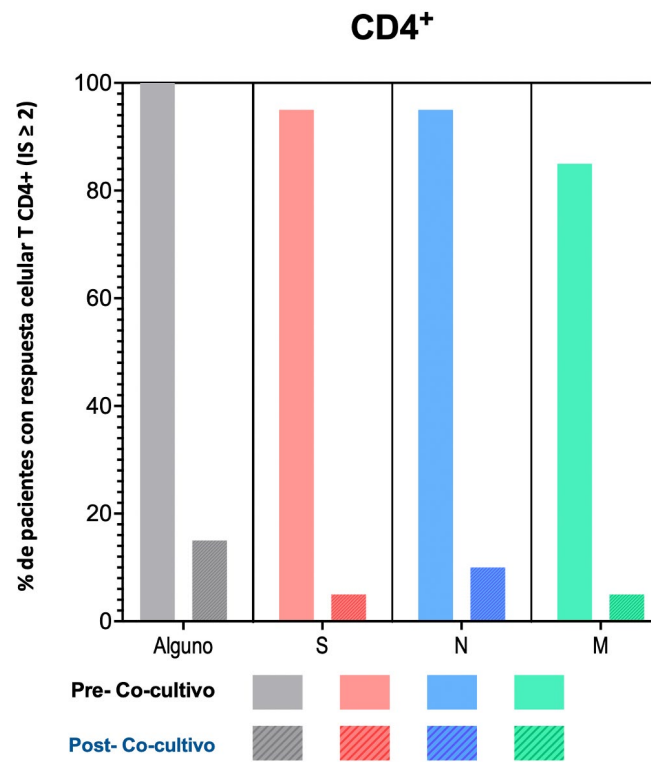
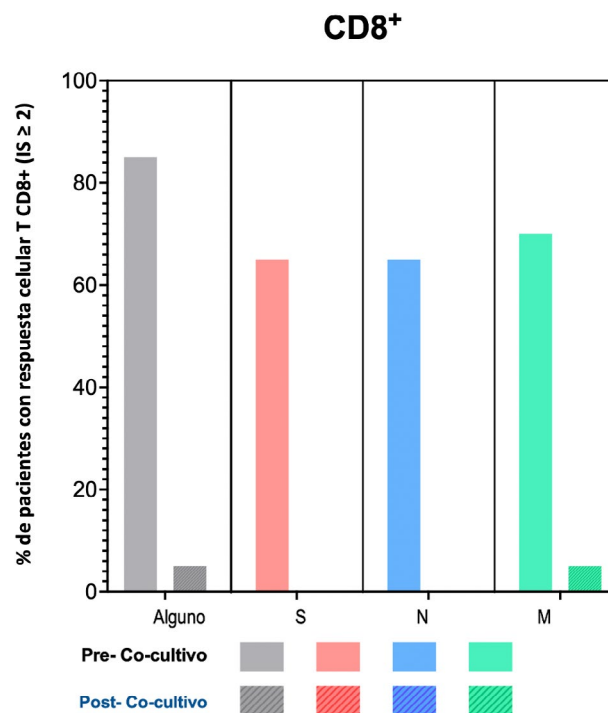


FIGURA 52. PLOT COMPARATIVO DEL PRE Y POST DEL % DE PACIENTES CON RESPUESTA CELULAR T CD8+ ANTÍGENO-ESPECÍFICA DETECTABLES (IS ≥ 2)



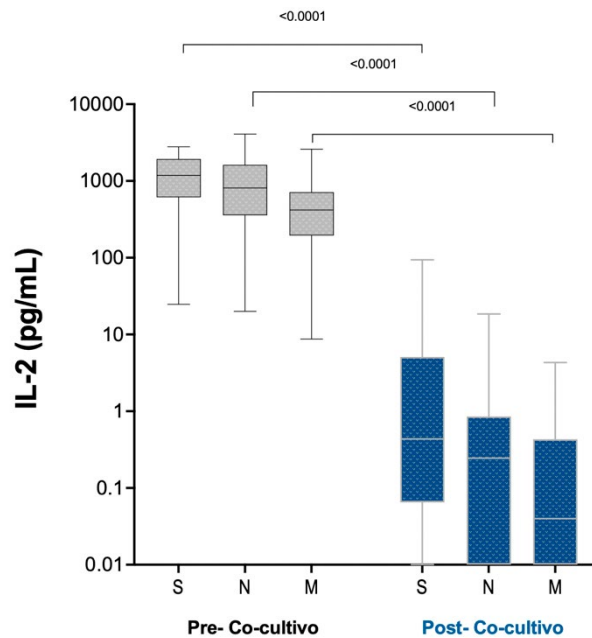
Tras el co-cultivo, se observó una disminución significativa de las citocinas en el sobrenadante relacionadas a la respuesta Th1 que se muestra en la Tabla 75 y figuras de cada citocina, IL-2 (Figura 53), IFN- γ (Figura 54), TNF- α (Figura 55) y en la IL-1 β (FIGURA 56).

TABLA 75. COMPARACIÓN DE LA MEDIANA (RIQ) DE LOS NIVELES DE CADA CITOCINA EN EL SOBRENADANTE PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNA-S-, N-Y-M- DEL SARS-CoV-2

Citocina	S-			N-			M-		
	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p
IL-2									
mediana	1178.7	0.4	<0,0001	810.2	0.2	<0,0001	419.2	0.04	<0,0001
(RIQ)	(614 - 1933.3)	(0.07-5.1)		(356.6 - 1623.8)	(0-0.9)		(194.2- 716)	(0-0.4)	
IFN-γ									
mediana	135.6	15.5	<0,0001	59.4	6.2	<0,0001	49.7	0.8	<0,0001
(RIQ)	(49 - 331.9)	(1.2-40.4)		(12.7 - 148.6)	(0.9-19.8)		(10.8 - 109.3)	(0-17.6)	
TNF-α									
mediana	79.4	0.17	0.002	35.1	0	0.002	29.29	0	<0,0001
(RIQ)	(7 - 171.6)	(0-7.7)		(5.5 - 108.7)	(0-10.0)		(6.3 - 70.3)	(0-2.3)	
IL-1β									
mediana	10.9	0	0.001	6.6	0	<0,0001	5.1	0	0.018
(RIQ)	(2.2 - 157.8)	(0-13.9)		(1.3-17.1)	(0-4.3)		(1.7-11.7)	(0-2.7)	

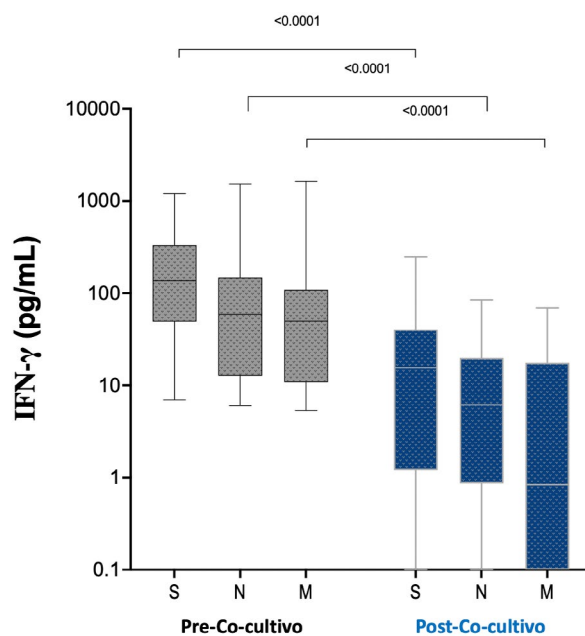
Se realizó con la prueba de Wilcoxon. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. RIQ: Rango intercuartílico.

FIGURA 53. PLOT COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE LA CITOCINA IL-2 EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



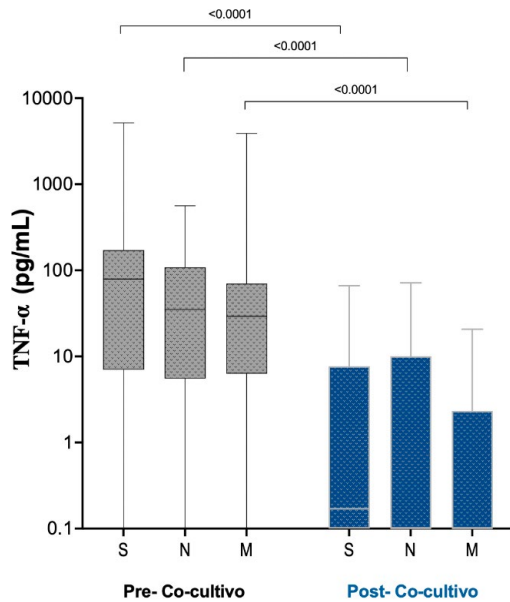
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 54. PLOT COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE LA CITOCINA IFN- γ EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



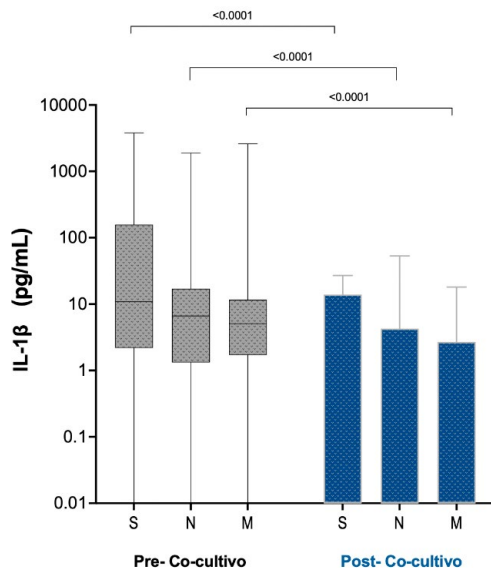
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 55. PLOT COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE LA CITOCINA TNF- α EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNAS-S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 56. PLOT COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE LA CITOCINA IL-1 β EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

Se analizaron el PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por severidad clínica y se observa disminución significativa en ambos grupos, severo y crítico, como se muestra en la Tabla 76.

TABLA 76. COMPARACIÓN DE LA MEDIANA (RIQ) DE LOS NIVELES DE CADA CITOCINA EN EL SOBRENADANTE PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNA S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2 DE MUESTRAS DE PACIENTES SEGÚN LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD

Citocina	Proteína S				Proteína M					
	Mediana (RIQ)	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p
IL-2										
Crítico	1459.2 (847.6-1766.3)	371.42 (108.6- 1836)	0.26 (0-3.1)	0.004	0.19 (0-0.7)	0.04 (0-0.29)	0.004	265.68 (141.9- 546.9)	0.04 (0-0.29)	0.004
Severo	1089.82 (556.4- 2330.9)	867.49 (385.4-1326.6)	0.56 (0.34-0.34)	0.001	0.29 (0.16-1.17)	0.04 (0-0.65)	0.001	479.74 (274.8-967.96)	0.04 (0-0.65)	0.001
IFN-γ										
Crítico	148.61 (70.7-316.2)	27.07 (8.97-137.3)	15.1 (5.2-21)	0.004	3.66 (0-12.4)	0 (0-12.9)	0.004	137.26 (8.1-63.7)	0 (0-12.9)	0.027
Severo	122.63 (30.4-575.9)	60.4 (31.7-202.9)	17.6 (0-96.9)	0.014	12.12 (4.8-31.6)	6.85 (0-19.9)	0.007	65.24 (34.1-123.7)	6.85 (0-19.9)	0.005
TNF-α										
Crítico	152.85 (29.4-222.6)	26.28 (3.2 121.5)	0 (0-2.22)	0.004	0 (0-4.97)	0 (0-2.16)	0.023	48.38 (7.7-100.4)	0 (0-2.16)	0.004
Severo	45.59 (2.95-152.5)	35.73 (9.6-104.2)	5.37 (0-34)	0.240	0 (0-28.7)	0 (0-8.53)	0.054	27.72 (6.2-57.42)	0 (0-8.53)	0.019
IL-1β										
Crítico	38.76 (7.9-461.95)	6.6 (0.4-16)	0 (0-9.5)	0.004	0 (0-3.4)	0 (0-2.6)	0.031	6.65 (2.2-79.4)	0 (0-2.6)	0.148
Severo	6.09 (1.06-86.6)	8.4 (1.6-20)	7.89 (0-14.15)	0.160	0 (0-10.7)	0 (0-3.4)	0.010	5.08 (0.74-11.)	0 (0-3.4)	0.105

Se realizó con la prueba de Wilcoxon. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. RIQ: Rango intercuartílico.

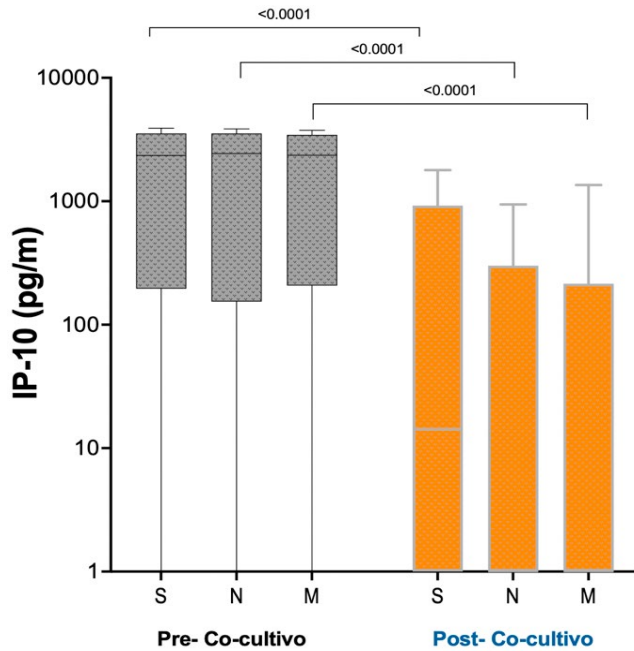
También tras el co-cultivo, se observó una disminución estadísticamente significativa de las quimiocinas inducidas por IFN en el sobrenadante como se muestra en la tabla 77 y figuras de cada quimiocina, CXCL10/IP-10 (Figura 57), CCL2/MCP-1 (Figura 58), CXCL9/MIG (Figura 59), y CCL5/RANTES (Figura 60).

TABLA 77. COMPARACIÓN DE LA MEDIANA (RIQ) DE LOS NIVELES DE CADA QUIMIOCINA EN EL SOBRENADANTE PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CO-CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNA S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2

Quimio- cina	Proteína S			Proteína N			Proteína M		
	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p
IP-10									
mediana	2350.7	14.22	<0.0001	2435.7	0	0.001	2359.6	0	<0,0001
(RIQ)	(196-3545)	(0-921)		(154 - 3539)	(0-300.5)		(207-3452)	(0-214.9)	
MCP-1									
mediana	10827.8	2349.0	0.005	11520.3	0	<0,0001	12859.6	2062.8	<0,0001
(RIQ)	(6240 -18157)	(0-4781)		(2337.4 -16548.8)	(0-2038)		(8493 -24154)	(47-3959)	
MIG									
mediana	2622.9	18.8	<0,0001	1940.97	11.6	<0,0001	2570.8	5.96	<0,0001
(RIQ)	(551 -3745)	(0.5- 52)		(583 -3402)	(0-34.9)		(786 - 3601)	(0-23.7)	
RANTES									
mediana	837.2	0	<0,0001	618.1	0	<0,0001	501.8	0	0.003
(RIQ)	(190 -1676)	(0-121)		(137.7 - 877)	(0-52.8)		(95.1- 813.5)	(0-0)	

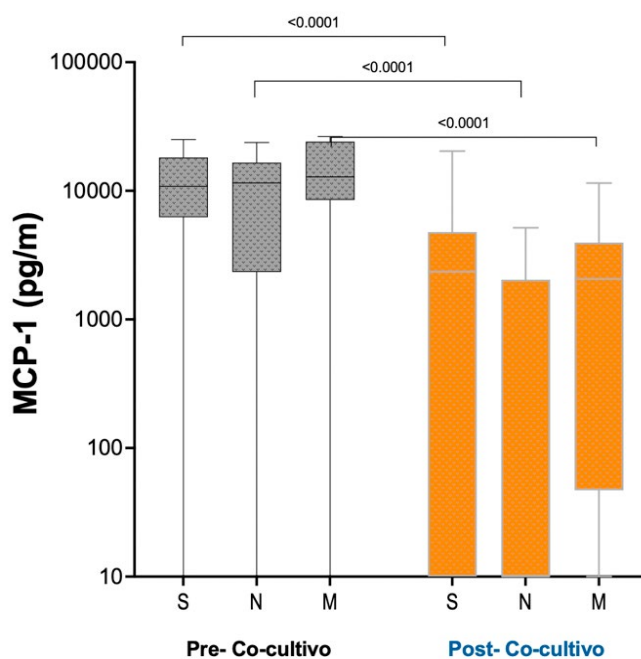
Se realizó con la prueba de Wilcoxon. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. RIQ: Rango intercuartílico.

FIGURA 57. PLOT COMPARATIVO PRE Y POST CO-CULTIVO DE LOS NIVELES DE LA QUIMIOCINA CXCL10/IP-10 INDUCIDA POR IFN SECRETADA POR LAS rCMSPs EN EL SOBRENADANTE TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



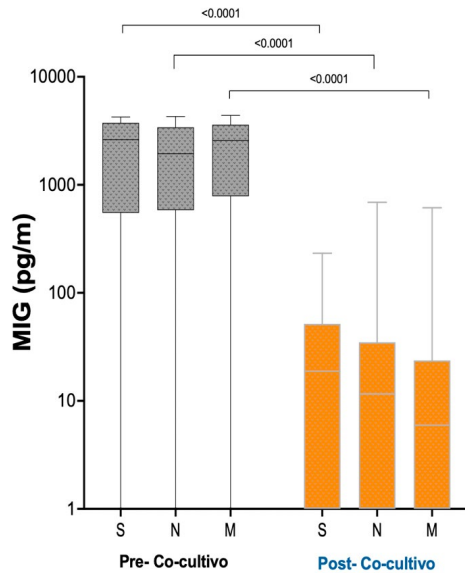
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 58. PLOT COMPARATIVO PRE Y POST CO-CULTIVO DE LOS NIVELES DE LA QUIMIOCINA CCL2/MCP-1 INDUCIDA POR IFN SECRETADA POR LAS rCMSPs EN EL SOBRENADANTE TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



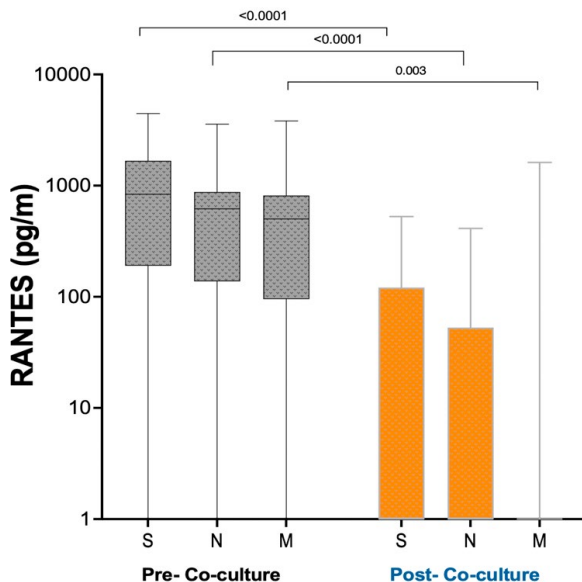
Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 59. PLOT COMPARATIVO PRE Y POST CO-CULTIVO DE LOS NIVELES DE LA QUIMIOCINA CXCL9/MIG INDUCIDA POR IFN, SECRETADA POR LAS rCMSPs EN EL SOBRENADANTE TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

FIGURA 60. PLOT COMPARATIVO PRE Y POST CO-CULTIVO DE LOS NIVELES DE LA QUIMIOCINA CCL5/RANTES INDUCIDA POR IFN, SECRETADA POR LAS rCMSPs EN EL SOBRENADANTE TRAS LA ESTIMULACIÓN CON LAS PROTEÍNAS S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2



Los gráficos de dispersión muestran la línea en la mediana; los box-plots representan los rangos intercuartílicos (RIQ). La comparación estadística de antes y después se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo

Se analizaron el sobrenadante del PRE (linfocitos estimulados) y POST (co-cultivo con las rCMSPs y las IpMSCs) por severidad clínica y se observa disminución significativa de las quimiocinas inducidas por IFN tanto en el grupo de severos como en críticos por cada proteína. (Tabla 78)

TABLA 78. COMPARACIÓN DE LA MEDIANA (RIQ) DE LOS NIVELES DE CADA QUIMIOCINA EN EL SOBRENADANTE PRE (LINFOCITOS ESTIMULADOS) Y POST (CULTIVO CON LAS rCMSPs Y LAS IpMSCs) POR PROTEÍNA S-, N- Y M- DEL SARS-CoV-2 DE MUESTRAS DE PACIENTES SEGÚN LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD

Quimiocina	Proteína S				Proteína N				Proteína M			
	Mediana (RIQ)	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST	Valor p	PRE	POST
IP-10	Crítico	1649.52 (65.2 – 3487.24)	0 (0- 826)	0.05	1311.89 (51.22 – 3413.6)	59.24 (0- 425.31)	0.07	1420.27 (21.6 – 3496.96)	0 (0- 36.7)	0.031		
	Severo	2706.86 (450.54 – 3610.7)	135.74 (0- 1117.1)	0.005	2805.22 (330.7 – 3612.4)	0 (0- 234.8)	0.01	2897.22 (445.97 – 3496.8)	3.05 (0- 367.3)	0.010		
MCP-1	Crítico	10941.4 (3495.4 – 17737.3)	2667.3 (0- 4272.2)	0.09	6850.8 (592.5- 13806.08)	0 (0- 1847)	0.008	12097.5 (1634.4 -17382.04)	637.6 (206 – 5104.1)	0.05		
	Severo	10714.3 (7919- 24814.4)	2030.6 (0- 5963)	0.042	14008.31 (5062 – 16758)	0 (0- 2241.02)	0.003	15440.14 (9499.8 – 25864.3)	2253.5 (0- 4101)	0.002		
MIG	Crítico	2403 (156.3 – 3000)	4.41 (0- 29.2)	0.008	1239.14 (256.3- 1940.97)	0 (0- 9.4)	0.008	1990.8 (262.4 – 3088.9)	0 (0- 4.4)	0.008		
	Severo	2844 (1226 – 3998)	48.35 (8.7 – 64.9)	0.001	3103.21 (1774.1 – 3887.7)	13.35 (10.95 70.96)	0.001	3221.53 (1913.4 – 4036.9)	21.37 (6.4 – 54)	0.001		
RANTES	Crítico	952.64 (275.7 – 2224.9)	0 (0- 18.2)	0.004	628.51 (277.1 – 1107.6)	0 (0- 51.2)	0.004	762.96 (96.8 – 1165.1)	0 (0-0)	0.008		
	Severo	487.42 (60.4 – 1101.6)	0 (0- 160.2)	0.020	607.62 (0- 888.33)	0 (0- 152.4)	0.020	470.7 (0- 717.9)	0 (0- 121.7)	0.129		

Se realizó con la prueba de Wilcoxon. $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. RIQ: Rango intercuartílico.

PARTE II

10. DISCUSIÓN

10. DISCUSIÓN

En este estudio, observamos que las pMSCs humanas pueden disminuir significativamente *in-vitro* la respuesta Th1 pro-inflamatoria frente a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 severo y crítico.

Si bien el efecto de los tratamientos basados en las MSCs sobre los linfocitos T no está suficientemente explorado para la COVID-19, hay evidencia que sugiere que las MSCs reducen la expresión de marcadores de activación de linfocitos y pueden modular el perfil de citocinas y quimiocinas secretadas por las células T activadas.

10.1 RESPUESTA CELULAR T

En los experimentos se utilizaron péptidos específicos de proteínas para determinar qué proteínas del SARS-CoV-2 son los targets predominantes de las células T CD4+ y T CD8+ específicas del SARS-CoV-2 generadas durante la enfermedad por COVID-19. Todos los pacientes estudiados presentan respuesta celular T de memoria después de 6 meses desde la última PCR-RT negativa realizada durante la hospitalización, similar a los datos de Dan et al.⁴⁷ indica un fenotipo efector/memoria y protección a largo plazo. Asimismo, los datos de Thieme¹³⁹ y Griffoni et al.,⁴³ muestran la dominancia de la respuesta celular T CD4+ en comparación con la respuesta celular T CD8+ como hemos encontrado en este estudio. No se observaron diferencias significativas en las frecuencias de células T CD4+ y T CD8+/CD134+ CD137+ entre los grupos de pacientes severos y críticos recuperados.

En relación a la respuesta celular de los linfocitos T CD4+ específicos del SARS-CoV-2, los estudios reportados refieren que la reactividad frente a la proteína S- es de casi dos tercios de la reactividad de linfocitos T CD4+ con muy poca reactividad frente a N y M.¹⁴⁰ Nuestros datos del SARS-CoV-2 de manera similar a Griffoni et al.⁴³ muestran que el patrón de inmunodominancia en la COVID-19 es prácticamente co-dominantes a las proteínas S-, N- y M- con 95%, 95% y 94% de respuesta celular T

CD4+ específicos del SARS-CoV-2 en los pacientes convalcientes posterior a 5-6 meses (mediana (RIQ) 162.5 días (143.25-169.5)) desde la última PCR-RT negativa durante la hospitalización. Considerando la respuesta celular de los linfocitos T CD8+ específica del SARS-CoV-2, la proteína M- del SARS-CoV-2 se reconoció en el 74% de los pacientes con reactividad y el 65% en N- y S-.

Tras la estimulación con las proteínas S-, N- y M-, la secreción de citocinas, IL-2, IFN- γ , TNF- α producidos por los linfocitos T CD4+/ T CD8+ en el sobrenadante fueron elevados estadísticamente significativo a comparación del control. En nuestro estudio observamos respuestas Th1 predominantes en pacientes COVID-19 convalcientes, con pocas citocinas Th2 o ninguna. Es evidente que se requieren más estudios, pero los datos en este estudio parecen representar predominantemente una respuesta Th1 clásica al SARS-CoV-2 similar a las de Griffoni et al.⁴³

También se observaron las quimiocinas inducidas por interferón CXCL9/MIG, and CXCL10/IP10, MCP-1/CCL2 elevadas, en correlación con la severidad de la COVID-19, similar al experimento de Tincati et al¹⁴¹

Las discrepancias en relación con la respuesta celular en pacientes severos y críticos recuperados posterior a 5-6 meses (mediana (RIQ) 162.5 días (143.25-169.5)) desde la última PCR-RT negativa con los resultados de otros estudios pueden explicarse por diferentes protocolos metodológicos y diferentes poblaciones analizadas. Además, utilizamos los marcadores de activación CD69, CD137 y CD134 para la definición de células T CD4+ y T CD8+ antígeno-específicas y la detección de citocinas en los sobrenadantes del cultivo celular relacionados con la respuesta Th1.

10.2 EFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS IpMSCs

Por las propiedades inmunomoduladoras del tejido coriónico CD106+¹¹¹ y el “licenciamiento” con IFN- γ que induce la expresión IDO en las MSCs a través de la vía JAK-STAT1, las IpMSCs pueden contribuir a la inhibición de las células inmunes activadas, incluidas las células T y otras células del sistema inmune innato^{57,142}

Con el co-cultivo de las IpMSCs y las rCMSPs *in-vitro*, en un ensayo transwell, evaluamos la modulación de las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y las quimiocinas inducidas por IFN por CBA mediante citometría de flujo en los sobrenadantes. Las pMSCs pre-tratadas con IFN- γ disminuyeron la respuesta celular T consistentemente en los pacientes respondedores a las proteínas S-, N- y M- del SARS-CoV-2 ($p < 0.0001$).

Las MSCs expandidas *ex-vivo* se han infundido en varios estudios de fase I y compasivos y la incidencia general es que la administración de las MSCs parece mejorar el resultado de diferentes cuadros como por ejemplo la enfermedad aguda del injerto contra el huésped e incluso como hemos podido observar en algunos reportes de pacientes críticos COVID-19 que fueron dados de alta de UCI tras algunas dosis de las MSCs.¹⁰⁷ Un interesante pregunta es si quizá los pacientes recuperados que presentan el síndrome post COVID-19 podrían beneficiarse.

El desarrollo de tratamientos seguros y eficaces representa una prioridad para disminuir la tasa de mortalidad en pacientes con COVID-19 severo y crítico debido a la respuesta inflamatoria no controlada. Sin embargo, debemos ser cautos con el escenario pro-coagulante de la enfermedad¹⁰⁶ verificando el tipo de fuente celular que se utiliza y lo medios de cultivos apto para humanos en un laboratorio con sala blanca certificado de buenas prácticas de manufactura.

10.3 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En base al número limitado de células por linfopenia de los pacientes participantes o la disponibilidad inmediata de reactivos en el pico de la pandemia, no se realizaron todos los análisis previstos para todos los pacientes.

En el momento del inicio del estudio solo estaban disponibles 3 antígenos del SARS-CoV-2 (proteínas S-, N- y M-), mientras que otras 26 proteínas no se consideraron, pero teóricamente podrían provocar respuestas inmunitarias.

Según algunos estudios el contacto directo entre las pMSCs y las CMSPs pueden ser necesarios para la inmunomodulación, sin embargo, nosotros no realizamos la comparación con el sistema transwell. Nuestros resultados podrían estar limitados por el uso solo de las CMSPs y no de las células dendríticas y macrófagos para una mejor evaluación de la capacidad inmunomoduladora.

10.4 CONCLUSIONES

En conclusión, en nuestro estudio, las IpMSCs parecen capaces de inhibir la activación de linfocitos T específicas del SARS-CoV-2 al disminuir las citocinas de la respuesta Th1, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y la producción de quimiocinas inducidas por IFN relacionadas a la severidad de la COVID-19. Estos datos obtenidos de un modelo *in vitro* practicable en un hospital general, que permite valorar en

un contexto clínico determinado, la función celular de los pacientes con diferentes grados de enfermedad permite evaluar de manera pre-clínica la viabilidad y función de la terapia celular con las MSCs previa a su administración.

Los datos obtenidos aportan información favorable para el desarrollo de una metodología de inmunomodulación mediante el uso de las lpMSCs.

Los ensayos clínicos son necesarios y fundamentales para determinar la seguridad y eficacia de terapias basadas en el secretoma de las MSCs derivadas del corion de la placenta humana y estimuladas con IFN- γ contra la COVID-19 especialmente en pacientes críticos, graves y posiblemente en el cuadro post-COVID-19.

11. CONCLUSIONES FINALES

11. CONCLUSIONES FINALES

PARTE 1 Terapia Gammaglobulina IV

Estudio 1 Cohortes: ¿Disminuye la mortalidad?

- La terapia de GGIV en pacientes post-trasplantados cardíacos con infección severa e HGG se asocia a menores tasas de muerte durante el seguimiento a largo plazo en comparación con trasplantados no tratados con GGIV en un estudio de centro único.

Estudio 2 Cohortes: ¿Disminuye la tasa de reinfección?

- La terapia GGIV es un factor protector significativo ante una reinfección grave en pacientes post-trasplantados de órgano sólido con infección severa e HGG durante el seguimiento posterior a la infusión.

Estudio 3 Ensayo clínico: ¿Disminuye la tasa de reinfección? ¿Es seguro y eficaz?

- La combinación de GGIV y terapia antimicrobiana administrada a receptores de órganos sólidos con infección severa e inmunodeficiencia secundaria de anticuerpos disminuye la tasa de episodios de reinfección.
- La terapia con GGIV en combinación con la terapia antimicrobiana convencional es bien tolerada y no se relaciona con eventos adversos graves.

PARTE 2. Células mesenquimales de placenta humana

Estudio 1 Evaluación *in-vitro* ¿Modifica la activación celular? ¿Disminuye el ambiente pro- inflamatorio?

- Las IpMSCs son capaces de inhibir la activación de los linfocitos T específicos del SARS-CoV-2 al disminuir las citocinas de la respuesta Th1, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1B y la producción de quimiocinas inducidas por IFN.
- Las IpMSCs puede ser una opción terapéutica para los casos severos y críticos de COVID-19 tras la realización de ensayos clínicos.

12. REFERENCIAS

12. REFERENCIAS

1. Schwarz A, Schäfer F, Framke T, Linnenweber-Held S, Richter N, Haller H. Risk factors influencing the outcomes of kidney re-transplantation. *Ann Transplant*. 2021;26:1-23. doi:10.12659/AOT.928922
2. González-Vílchez F, Gómez-Bueno M, Almenar L, et al. Registro Español de Trasplante Cardíaco. XXV Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2013). *Rev Española Cardiol*. 2014;67(12):1039-1051. doi:10.1016/j.recesp.2014.09.004
3. Elizabeth Sarmiento, Maricela Jimenez, Marisa di Natale, Marisa Rodriguez-Ferrero, Fernando Anaya, Marcos Lopez-Hoyos, Emilio Rodrigo, Manuel Arias, Manel Perello, Daniel Seron, Boris Karanovic, Ikram Ezzahouri, Sergio Mezzano, Maria Jaramillo, Leticia Ca JC. Secondary antibody deficiency is associated with development of infection in kidney transplantation: Results of a multicenter study. *Transpl Infect Dis*. Published online 2021. doi:10.1111/tid.13494
4. Sarmiento, Elizabeth; Cifrián Jose, Calahorra, Leticia; Navarro, Joaquín; López-Hoyos, Marcos; Carbone J. Monitoring of early humoral immunity to identify lung recipients at risk for development of serious infections: A multicenter prospective study. *J Hear Lung Transplant*. 2018;37(8):1001-1012. doi:https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.04.001
5. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Schmidt CM, Sandkovsky U. What is the impact of hypogammaglobulinemia on the rate of infections and survival in solid organ transplantation? A meta-analysis. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2601-2610. doi:10.1111/ajt.12401
6. Sarmiento, Elizabeth; Jaramillo, María, Calahorra, Leticia; Rodríguez-Molina, Juan José; Fernández-Cruz, Eduardo; Carbone J. Evaluation of humoral immunity profiles to identify heart recipients at risk for development of severe infections: A multicenter prospective study. *J Hear Lung Transplant*. 2017;36(5):529-539. doi:https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.10.004
7. Carbone, Javier; Sarmiento, Elizabeth; Del Pozo, N; Rodríguez-Molina, J; Navarro, Joaquín; Fernández-Yañez, J; Palomo, J; Villa, A; Muñoz, P; Fernández-Cruz E. Restoration of humoral immunity after intravenous immunoglobulin replacement therapy in heart recipients with post-transplant antibody deficiency and severe infections. *Clin Transplant*. 2012;26(3):E277-E283.

8. Sarmiento, E; Diez, P; Arraya, M; Jaramillo, M; Calahorra, Leticia; Fernandez-yañez, J; Palomo, J; Sousa, I; Hortal, J; Barrio, J; Alonso, R; Muñoz, P; Navarro, J; Vicario J, Fernandez-cruz, E; Carbone J. Early intravenous immunoglobulin replacement in hypogammaglobulinemic heart transplant recipients: results of a clinical trial. *Transpl Infect Dis.* 2016;18:832-843. doi:10.1111/tid.12610
9. Fujino T, Kumai Y, Nitta D, et al. Hypogammaglobulinemia following heart transplantation: Prevalence, predictors, and clinical importance. *Clin Transplant.* 2020;34(12):0-2. doi:10.1111/ctr.14087
10. Bourassa-Blanchette S, Patel V, Knoll GA, et al. Clinical outcomes of polyvalent immunoglobulin use in solid organ transplant recipients: A systematic review and meta-analysis – Part II: Non-kidney transplant. *Clin Transplant.* 2019;33(7). doi:10.1111/ctr.13625
11. Chambers, Daniel; Cherikh, Wida; Harhay, Michael; Hayes, Don Jr; Hsich, Eileen; Khush, Kiran; Meiser, Bruno; Potena, Luciano; Rossano, Joseph; , Toll, Alice; Singh, Tajinder; Sadavarte, Aparna; Zuckermann, Andreas; Stehlik J. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart–lung transplantation Report—2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J Hear Lung Transplant.* 2019;38(10):1042-1055. doi:10.1016/j.healun.2019.08.001.The
12. EMEA. Core SPC for Human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg). *SPC (Summary Prod Charact.* 2004;(June 2018). http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000388.jsp&mid=WC0b01a-c0580032ec8
13. Lichvar AB, Ensor CR, Zeevi A, et al. Detrimental Association of Hypogammaglobulinemia With Chronic Lung Allograft Dysfunction and Death Is Not Mitigated by On-Demand Immunoglobulin G Replacement After Lung Transplantation. *Prog Transplant.* 2019;29(1):18-25. doi:10.1177/1526924818817028
14. Shock A, Humphreys D, Nimmerjahn F. Dissecting the mechanism of action of intravenous immunoglobulin in human autoimmune disease: Lessons from therapeutic modalities targeting Fcγ receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(3):492-500. doi:10.1016/j.jaci.2020.06.036
15. Poppelaars F, Gaya da Costa M, Eskandari SK, Damman J, Seelen MA. Donor genetic variants in interleukin-6 and interleukin-6 receptor associate with biopsy-proven rejection following kidney transplantation. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-14. doi:10.1038/s41598-021-95714-z
16. Miller CL, Madsen JC. IL-6 Directed Therapy in Transplantation. *Curr Transplant Reports.* 2021;8(3):191-204. doi:10.1007/s40472-021-00331-4
17. Schuster AM, Miesgang N, Steines L, Bach C, Banas B, Bergler T. B-cell activating factor BAFF as a novel alert marker for the immunological risk stratification after kidney transplantation. *Immunol Res.* 2021;69(6):487-495. doi:10.1007/s12026-021-09205-4

18. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, et al. Alterations of naïve and memory B-cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients. *Transpl Int*. 2013;26(8):800-812. doi:10.1111/tri.12131
19. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
20. WHO. Organization, W.H.Rolling Updates on Coronavirus Disease (COVID-19). doi:https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen
21. Johns Hopkins University. University,J.H.Coronavirus COVID-19 Global Cases by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. Published 2021. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
22. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(24):759-765. doi:10.15585/mmwr.mm6924e2
23. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC DNR. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) - PubMed. Published online 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150360/>
24. Cao C, Cai Z, Xiao X, et al. The architecture of the SARS-CoV-2 RNA genome inside virion. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-14. doi:10.1038/s41467-021-22785-x
25. Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2006;65(January):193-292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
26. Bian J, Li Z. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(1):1-12. doi:10.1016/j.apsb.2020.10.006
27. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
28. Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(3):539-555. doi:10.1038/s41423-020-00602-7
29. Yang L, Xie X, Tu Z, Fu J. The signal pathways and treatment of cytokine storm in. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;(March):1-20. doi:10.1038/s41392-021-00679-0
30. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
31. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):269-270. doi:10.1038/s41577-020-0308-3

32. Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat Microbiol.* 2020;5(10):1185-1191. doi:10.1038/s41564-020-00789-5
33. Scheel. DP. Human B Cell Clonal Expansion and Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2. *Ann Oncol.* 2020;(January):19-20.
34. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell.* 2020;182(6):1419-1440.e23. doi:10.1016/j.cell.2020.08.001
35. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1070-1076. doi:10.1038/s41591-020-0944-y
36. Chua RL, Lukassen S, Trump S, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol.* 2020;38(8):970-979. doi:10.1038/s41587-020-0602-4
37. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):355-362. doi:10.1038/s41577-020-0331-4
38. Kim YM, Shin EC. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med.* 2021;53(5):750-760. doi:10.1038/s12276-021-00592-0
39. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. 2020;724(August):718-724.
40. Zhang J, Zhao C, Zhao W. Virus Caused Imbalance of Type I IFN Responses and Inflammation in COVID-19. *Front Immunol.* 2021;12(April):1-9. doi:10.3389/fimmu.2021.633769
41. Tang L, Yin Z, Hu Y, Mei H. Controlling Cytokine Storm Is Vital in COVID-19. *Front Immunol.* 2020;11(November):1-14. doi:10.3389/fimmu.2020.570993
42. Buszko M, Nita-Lazar A, Park JH, et al. Lessons learned: new insights on the role of cytokines in COVID-19. *Nat Immunol.* 2021;22(4):404-411. doi:10.1038/s41590-021-00901-9
43. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell.* 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015
44. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest.* 2020;130(12):6477-6489. doi:10.1172/JCI140965
45. Adamo S, Chevrier S, Cervia C, et al. Profound dysregulation of T cell homeostasis and function in patients with severe COVID-19. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2021;76(9):2866-2881. doi:10.1111/all.14866

46. Thieme CJ, Anft M, Paniskaki K, et al. Robust T Cell Response Toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients. *Cell Reports Med.* 2020;1(6). doi:10.1016/j.xcrm.2020.100092
47. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (80-).* 2021;371(6529). doi:10.1126/science.abf4063
48. Kim DS, Rowland-Jones S, Gea-Mallorquí E. Will SARS-CoV-2 Infection Elicit Long-Lasting Protective or Sterilising Immunity? Implications for Vaccine Strategies (2020). *Front Immunol.* 2020;11(December):1-16. doi:10.3389/fimmu.2020.571481
49. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020;584(7821):457-462. doi:10.1038/s41586-020-2550-z
50. Alessandro Sette and Shane Crotty. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;(February 18):19-21.
51. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* Published online 2021. doi:10.1038/s41591-021-01377-8
52. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett.* 2015;168(2):140-146. doi:10.1016/j.imlet.2015.05.004
53. Nicola M Di, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-3843. doi:10.1182/blood.V99.10.3838
54. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica.* 2008;93(9):1301-1309. doi:10.3324/haematol.12857
55. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(1):149-160. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x
56. Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med.* 2019;8(7):1025. doi:10.3390/jcm8071025
57. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111(3):1327-1333. doi:10.1182/blood-2007-02-074997
58. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood.* 2010;116(19):3770-3779. doi:10.1182/blood-2010-02-270777

59. Davies, Heldring K et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*. 2017;35:766–776.
60. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499-3506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716
61. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7(1). doi:10.1038/cddis.2015.327
62. Börger V, Bremer M, Ferrer-Tur R, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7). doi:10.3390/ijms18071450
63. Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, et al. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep*. 2016;6(March):1-13. doi:10.1038/srep24120
64. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regen Med*. 2019;4(1). doi:10.1038/s41536-019-0083-6
65. Carreras-Planella L, Monguió-Tortajada M, Enric Borràs F, Franquesa M. Immunomodulatory effect of MSC on B cells is independent of secreted extracellular vesicles. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1-8. doi:10.3389/fimmu.2019.01288
66. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105(5):2214-2219. doi:10.1182/blood-2004-07-2921
67. Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2020;53(1):1-16. doi:10.1111/cpr.12712
68. Laing AG, Fanelli G, Ramirez-Valdez A, Lechler RI, Lombardi G, Sharpe PT. Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress. *PLoS One*. 2019;14(3):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0213170
69. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1-10. doi:10.3389/fimmu.2019.01191
70. Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., & Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*. 2012;33(3):8. doi:doi:10.1016/j.it.2011.11.004.
71. Müller L, Tunger A, Wobus M, et al. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(February):1-9. doi:10.3389/fcell.2021.637725
72. Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood*. 2008;112(3):532-541. doi:10.1182/blood-2007-10-119370

73. Kang HS et al. A paradoxical role for IFN- γ in the immune properties of mesenchymal stem cells during viral challenge. *Exp Hematol*. 2005;33(7):796-803. doi:https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.03.012
74. Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: A double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*. 2012;19(9):1505-1513. doi:10.1038/cdd.2012.26
75. Khoury M, Cuenca J, Cruz FF, Figueroa FE, Rocco PRM, Weiss DJ. Current status of cell-based therapies for respiratory virus infections: Applicability to COVID-19. *Eur Respir J*. 2020;55(6). doi:10.1183/13993003.00858-2020
76. Bailey, Charles; Zhong, Guocai;Huang, I-Chueh; and Farzan M. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol*. 2014;23(1):261-283. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085537.IFITM-Family
77. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol*. 2019;6:567-584. doi:10.1146/annurev-virology-092818-015756
78. Wu X, Dao Thi VL, Huang Y, et al. Intrinsic Immunity Shapes Viral Resistance of Stem Cells. *Cell*. 2018;172(3):423-438.e25. doi:10.1016/j.cell.2017.11.018
79. Bulati M, Miceli V, Gallo A, et al. The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. *Front Immunol*. 2020;11(February):1-20. doi:10.3389/fimmu.2020.00054
80. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M² macrophage differentiation. *Mol Ther*. 2012;20(1):187-195. doi:10.1038/mt.2011.189
81. Lim JY, Kim BS, Ryu D Bin, Kim TW, Park G, Min CK. The therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells on experimental colitis was improved by the IFN- γ and poly(I:C) priming through promoting the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):1-13. doi:10.1186/s13287-020-02087-7
82. Kim DS, Jang IK, Lee MW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine*. 2018;28:261-273. doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.002
83. Noronha NDC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):1-21. doi:10.1186/s13287-019-1259-0
84. Kane, Melissa;Zang, Trinity;Rihn Suzannah, Zhang, Fengwen... Bieniasz P. Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell Host Microbe*. 2016;20(3):392-405. doi:10.1016/j.chom.2016.08.005
85. Qian X, Xu C, Fang S, et al. Exosomal MicroRNAs Derived From Umbilical Mesenchymal Stem Cells Inhibit Hepatitis C Virus Infection. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(9):1190-1203. doi:10.5966/sctm.2015-0348

86. Sundin M, Örvell C, Rasmusson I, Sundberg B, Ringdén O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(11):1051-1059. doi:10.1038/sj.bmt.1705368
87. Malcherek G, Jin N, Hückelhoven AG, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of virus-specific CD8+ T cells. *Leukemia*. 2014;28(12):2388-2394. doi:10.1038/leu.2014.273
88. Liu X, Feng T, Gong T, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the function of allogeneic activated V γ 9V δ 2 T lymphocytes in vitro. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/317801
89. Forni G, Mantovani A, Forni G, et al. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death Differ*. 2021;28(2):626-639. doi:10.1038/s41418-020-00720-9
90. Matrajt L, Eaton J, Leung T, et al. Optimizing vaccine allocation for COVID-19 vaccines shows the potential role of single-dose vaccination. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-18. doi:10.1038/s41467-021-23761-1
91. Group*† TC-19 C. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *Lancet Respir*. 2020;(March).
92. Hermine O, Mariette X, Tharaux PL, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P. Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized with COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2021;181(1):32-40. doi:10.1001/jamainternmed.2020.6820
93. Vecchié A, Batticciotto A, Tangianu F, et al. High-dose dexamethasone treatment for COVID-19 severe acute respiratory distress syndrome: a retrospective study. *Intern Emerg Med*. Published online 2021. doi:10.1007/s11739-021-02800-1
94. Attaway AH, Scheraga RG, Bhimraj A, Biehl M, Hatipoğ Lu U. Severe covid-19 pneumonia: Pathogenesis and clinical management. *BMJ*. 2021;372. doi:10.1136/bmj.n436
95. Shu L, Niu C, Li R, et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1-11. doi:10.1186/s13287-020-01875-5
96. Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *Lancet Respir Med*. 2020;7(2):154-162. doi:10.1016/S2213-2600(18)30418-1.Treatment
97. Zheng G, Huang L, Tong H, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: A randomized, placebo-controlled pilot study. *Respir Res*. 2014;15(1):1-10. doi:10.1186/1465-9921-15-39
98. Simonson O et al. *In Vivo* Effects of Mesenchymal Stromal Cells in Two Patients With Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *STEMCELLS Transl*. 2015;4:1199-1213.

99. Bellingan G et al. Primary Analysis of a Phase 1/2 Study to Assess MultiStem® Cell Therapy, a Regenerative Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP), in Acute Respiratory Distress Syndrome (MUST-ARDS). *Am Thorac Soc 2019 Int Conf*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02611609?term=Multistem&draw=2&rank=6>
100. Leng Z, Zhu R, Hou W, et al. Transplantation of ACE2- Mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with covid-19 pneumonia. *Aging Dis*. 2020;11(2):216-228. doi:10.14336/AD.2020.0228
101. Liang B, Chen J, Li T, et al. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(31):e21429. doi:10.1097/MD.00000000000021429
102. Barkama R, Mayo A, Paz A, et al. Placenta-Derived Cell Therapy to Treat Patients With Respiratory Failure Due to Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Explor*. 2020;2(9):e0207. doi:10.1097/cce.0000000000000207
103. Feng G, Shi L, Huang T, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell Treatment of Severe COVID-19 Patients: A 3-Month Follow-Up Study Following Hospital Discharge. *Stem Cells Dev*. 2021;00(00):1-9. doi:10.1089/scd.2021.0015
104. Feng Y, Huang J, Wu J, et al. Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with COVID-19 pneumonia: A pilot study. *Cell Prolif*. 2020;53(12):1-8. doi:10.1111/cpr.12947
105. Sengupta V, Sengupta S, Lazo A, Woods P, Nolan A, Bremer N. Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19. *Stem Cells Dev*. 2020;29(12):747-754. doi:10.1089/scd.2020.0080
106. Moll G, Drzeniek N, Kamhieh-Milz J, Geissler S, Volk HD, Reinke P. MSC Therapies for COVID-19: Importance of Patient Coagulopathy, Thromboprophylaxis, Cell Product Quality and Mode of Delivery for Treatment Safety and Efficacy. *Front Immunol*. 2020;11(May):1-10. doi:10.3389/fimmu.2020.01091
107. Sharma D, Zhao F. Updates on clinical trials evaluating the regenerative potential of allogeneic mesenchymal stem cells in COVID-19. *npj Regen Med*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41536-021-00147-x
108. Papait A, Cargnoni A, Sheleg M, et al. Perinatal Cells: A Promising COVID-19 Therapy? *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;8(January):1-15. doi:10.3389/fbioe.2020.619980
109. Chang C-J, Yen M-L, Chen Y-C, et al. Placenta-Derived Multipotent Cells Exhibit Immunosuppressive Properties That Are Enhanced in the Presence of Interferon- γ . *Stem Cells*. 2006;24(11):2466-2477. doi:10.1634/stemcells.2006-0071
110. Siddesh SE, Gowda DM, Jain R, et al. Placenta-derived mesenchymal stem cells (P-MSCs) for COVID-19 pneumonia - A regenerative dogma. *Stem Cell Investig*. 2021;8:0-3. doi:10.21037/sci-2020-034

111. Yang ZX, Han ZB, Ji YR, et al. CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. *PLoS One*. 2013;8(3):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0059354
112. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47(6):946-953. doi:10.1002/eji.201646837
113. Huddleston CA, Weinberg AD, Parker DC. OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+ T cells to effector cells. *Eur J Immunol*. 2006;36(5):1093-1103. doi:10.1002/eji.200535637
114. Redmond WL, Gough MJ, Charbonneau B, Ratliff TL, Weinberg AD. Defects in the Acquisition of CD8 T Cell Effector Function after Priming with Tumor or Soluble Antigen Can Be Overcome by the Addition of an OX40 Agonist. *J Immunol*. 2007;179(11):7244-7253. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7244
115. Zapata JM, Perez-Chacon G, Carr-Baena P, et al. CD137 (4-1BB) signalosome: Complexity is a matter of TRAFs. *Front Immunol*. 2018;9(NOV):1-12. doi:10.3389/fimmu.2018.02618
116. Duttagupta PA, Boesteanu AC, Katsikis PD. Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(6):469-486. doi:10.1615/critrevimmunol.v29.i6.20
117. X. Filella RM y AB. Estructura y función de las citocinas. *Med Integr*. 2003;41(3):151-161. file:///C:/Users/user1/Downloads/Dialnet-Citoquinas-4247205.pdf
118. Chaolin Huang*, Yeming Wang*, Xingwang Li*, Lili Ren*, Jianping Zhao*, Yi Hu*, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, Ting Yu, Jiaan Xia, Yuan Wei, Wenjuan Wu, Xuelei Xie, Wen Yin, Hui Li, Min Liu, Yan Xiao, Hong Gao, Li Guo, Junga BC. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(January):497-506.
119. Tang M, Tian L, Luo G, Yu X. Interferon-gamma-mediated osteoimmunology. *Front Immunol*. 2018;9(JUN). doi:10.3389/fimmu.2018.01508
120. Waleed H. Mahallawia, Omar F. Khaboura, d, Qibo Zhangb, Hatim M. Makhdouma, Bandar A. Sulimana C. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information. 2020;(January).
121. Liu Y, Zhang C, Huang F, et al. 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) infections trigger an exaggerated cytokine response aggravating lung injury. *ChinaXiv*. Published online 2020.
122. Mortaz E, Tabarsi P, Jamaati H, et al. Increased Serum Levels of Soluble TNF- α Receptor Is Associated With ICU Mortality in COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 2021;12(April):1-8. doi:10.3389/fimmu.2021.592727
123. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(11):2563-2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014

124. Cua, Daniel;Tato C. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:479-489.
125. Wan, Suxin;Qingjie, Yi;Fan Shibing, Fan;Jinglong, Lv...Chen Y. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *medRxiv*. 2020;6(165):1-13.
126. Yang Yang, MD, a* Chenguang Shen, PhD, a* Jinxiu Li, MD, a* Jing Yuan, MD, a Jinli Wei, MM, a Fengmin Huang, MD, b Fuxiang Wang, MD, a Guobao Li, MD, a Yanjie Li, MM, a Li Xing, MM, a Ling Peng, MM, a Minghui Yang, PhD A, Mengli Cao, MM, a Haixia Zheng, MM, a Weibo Wu, MM, a Rongrong Zou, MD, a Delin Li, PhD, a Zhixiang Xu, MM, a Haiyan Wang, PhD, a Mingxia Zhang, MM, a Zheng Zhang, MD, a George F. Gao, DPhil, c Chengyu Jiang, PhD B, Lei Liu, MD a" and YL. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *Am Acad Allergy, Asthma Immunol*. Published online 2020.
127. Zhang W, Zhao Y, Zhang F, et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The experience of clinical immunologists from China. *Clin Immunol*. 2020;214(March). doi:10.1016/j.clim.2020.108393
128. Ruffilli, I;Ferrari, S; Colaci, M; Ferri, C; Fallahi, P; Antonelli A. IP-10 in autoimmune thyroiditis. *Horm Metab Res*. 2014;46(9):597-602.
129. Van der Does Y et al. TRAIL and IP-10 as biomarkers of viral infections in the emergency department. *J Infect*. Published online 2016.
130. Deshmane, Satish;Kremlev, Sergey;Amini Shohreh;Sawaya B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res*. 2010;29.
131. Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):761-770. doi:10.1080/22221751.2020.1747363
132. Hin, Chu; Jasper, Fuk-Woo Chan;Yixin, Wang; Terrence Tsz-Tai Y. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020;(April).
133. Xu ZS, Shu T, Kang L, et al. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):6-8. doi:10.1038/s41392-020-0211-1
134. Moratto D, Giacomelli M, Chiarini M, et al. Immune response in children with COVID-19 is characterized by lower levels of T-cell activation than infected adults. *Eur J Immunol*. 2020;50(9):1412-1414. doi:10.1002/eji.202048724
135. Mikolajczyk, Tomasz P.;Nosalski, Ryszard , [...], and Guzik T. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *J Fed Am Soc Exp Biol*. Published online 2016.

136. Hue S, Beldi-Ferchiou A, Bendib I, et al. Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(11):1509-1519. doi:10.1164/rccm.202005-1885OC
137. Zhao Y, Qin L, Zhang P, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight*. 2020;5(13). doi:10.1172/jci.insight.139834
138. Patterson BK, Seethamraju H, Dhody K, et al. Disruption of the CCL5/RANTES-CCR5 pathway restores immune homeostasis and reduces plasma viral load in critical COVID-19. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci*. Published online 2020. doi:10.1101/2020.05.02.20084673
139. Thieme CJ, Anft M, Paniskaki K, et al. Robust T Cell Response Toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients. *Cell Reports Med*. 2020;1(6):100092. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100092
140. Li CK, Wu H, Yan H, et al. T Cell Responses to Whole SARS Coronavirus in Humans. *J Immunol*. 2008;181(8):5490-5500. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5490
141. Tincati C, Cannizzo ES, Giacomelli M, Badolato R, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Heightened Circulating Interferon-Inducible Chemokines, and Activated Pro-Cytolytic Th1-Cell Phenotype Features Covid-19 Aggravation in the Second Week of Illness. *Front Immunol*. 2020;11(October):1-12. doi:10.3389/fimmu.2020.580987
142. Varkouhi, Amir K; Jerkic, Mirjana; Ormesher, Lindsay; Gagnon, Stéphane; Goyal, Sakshi; Rabani, Razieh; Masterson, Claire; Spring, Chris; Chen, Paul Z; Gu, Frank X; dos Santos, Claudia C; Curley, Gerard F; Laffey JG. Extracellular Vesicles Human Umbilical Cord colli – induced Acute Lung Injury in Rats. *Anesthesiology*. 2019;(5):778-790.
143. WHO Headquarters. Clinical Management of COVID-19: Living Guidance. *World Heal Organ*. 2021;(January). <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>
144. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.
145. Cowan J, Hutton B, Fergusson N, et al. Clinical outcomes of immunoglobulin use in solid organ transplant recipients: Protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 2015;4(1):1-5. doi:10.1186/s13643-015-0156-6
146. Vandermeulen M, Erpicum P, Weekers L, et al. Mesenchymal Stromal Cells in Solid Organ Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(5):923-936. doi:10.1097/TP.0000000000003077

13. ANEXOS

13. ANEXO 1

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES RELACIONADOS A ESTA TESIS

Se ha realizado comunicaciones orales y presentaciones de póster a los siguientes congresos:

2017

- J. Carbone, **J. Montánchez**, I. Sousa, P. Muñoz, J. Navarro, E. Fernandez-Cruz, E. Sarmiento. Intervention with intravenous immunoglobulin to modify IgG Hypogammaglobulinemia in heart recipients with severe is associated with lower rates of death. Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Edinburgh, Scotland
- E. Sarmiento, I Ezzahouri, **J. Montánchez**, L. Calahorra, J S.Garcia-Jimenez, I. Sousa Casasnovas. Rodriguez-Ferrero. I M. Salceda, M. Valerio, Eduardo Fernández Cruz-Pérez, J. Carbone. Potential Intravenous Immunoglobulin Mediated Protection against Severe Infections in a Randomized Clinical Trial in Solid Organ Transplantation. The Journal of Heart and Lung Transplantation. San Diego, California, USA.
- Ezzahouri, E Sarmiento, **J. Montánchez**, L Calahorra, S Garcia, I Sousa-Casasnovas, ML, Rodriguez-Ferrero, M Valerio, M Salcedo, J Navarro, E Fernandez-Cruz, J Carbone. Intravenous Immunoglobulin Therapy increases serum Anti-Clostridium Difficile Toxin specific antibodies in heart-transplant patients. European Society for Solid Organ Transplantation (ESOT). Barcelona, Spain

2018

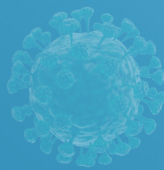
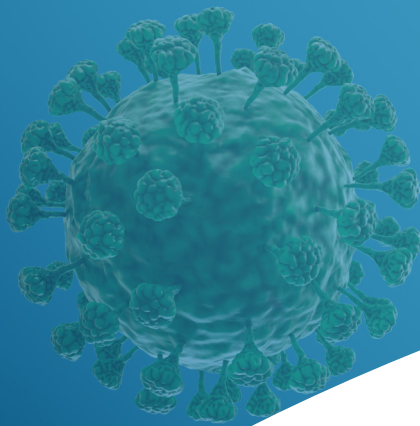
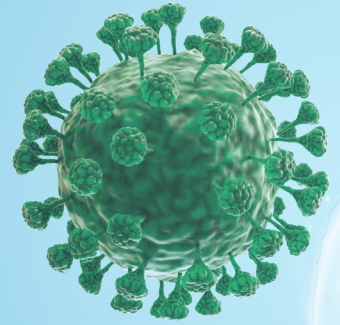
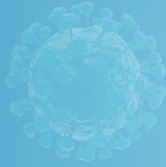
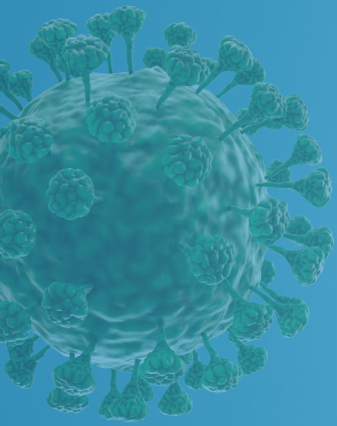
- Javier Carbone, Juan Fernandez-Yañez, **Judith Montánchez**, Iago Sousa, Eduardo Zatarain, Joaquin Navarro, Patricia Muñoz, Javier Hortal, J Barrio, Elizabeth Sarmiento. Lower Rates of Death in Heart Recipients with Secondary Antibody Deficiency and Severe Infection After Therapy with Intravenous Immunoglobulin. 27th International Congress of the Transplantation Society. Madrid, Spain.

2019

- **Montánchez Mateo Judith.** Preliminary Results of a Randomized Clinical Trial of Intravenous Immunoglobulin in Solid Organ Recipients with severe infection and Secondary Antibody Deficiency (Oral presentation). 3rd edition PhDay Complutense. Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

2021

- **Montánchez Mateo, Judith;** Sarmiento Marchese, Elizabeth; García Ruiz de Morales, José M.; Calleja Antolín, Sara; Carbone Campoverde, Javier A. A propósito de un ensayo clínico multicéntrico de pacientes trasplantados de órgano sólido con hipogammaglobulinemia e infección severa con y sin terapia GGIV: Evaluación de la Cinética de IgD (Poster presentation). Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain. University Hospital of León, Spain March 24th to 26th – 42nd Annual Meeting of the Spanish Immunology Society (SEI).
- **Montánchez, Judith;** Dios, Paula; Honrado, Emiliano; Molero, José L.; Honrado Franco, Emiliano; Calleja Antolín, Sara; García Ruiz de Morales, José M. Evaluación de la función inmunomoduladora *in-vitro* de las células mesenquimales de placenta humana en los pacientes COVID-19 (Poster presentation). University Hospital of León, Spain .March 24th to 26th – 42nd Annual Meeting of the Spanish Immunology Society (SEI).
- **Montánchez, Judith;** Dios, Paula; Honrado, Emiliano; Molero, José L.; García, José M. Immunomodulatory capacity of human placental mesenchymal stem cells on Covid-19 infected patients. (Lightning Talk and Poster presentation accepted). June 8th to 11th - 21st Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS).
- **Montánchez, Judith;** Dios, Paula; Honrado, Emiliano; Molero, José L.; García, José M. Human placental mesenchymal stem cells modulate T-cell responses from severe and critical COVID-19 patients. October 6th to 8th - 9th German Stem Cell Network (GSCN) Conference 2021.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID