

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL PERFIL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK EN PACIENTES
CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2**

POR

M.C. KENIA YARETZY OSUNA ESPINOZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

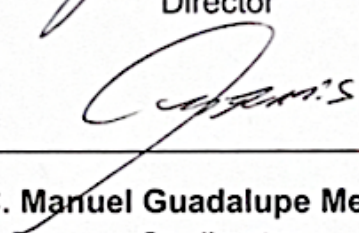
2025

ANÁLISIS DEL PERFIL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK EN PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2

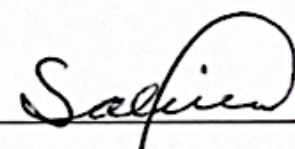
Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Director



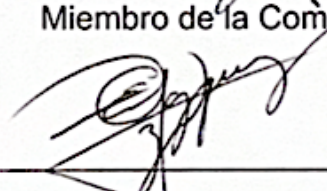
Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres
Co-director



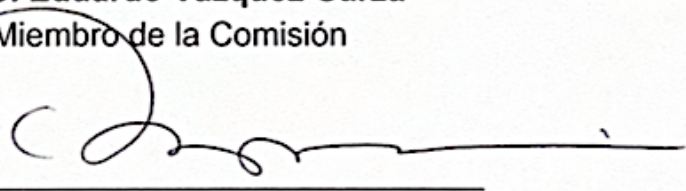
Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Miembro de la Comisión



Dr. C. Alma Yolanda Arce Mendoza
Miembro de la Comisión



Dr. C. Eduardo Vázquez Garza
Miembro de la Comisión



Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS DEL PERFIL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK EN PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE POR SARS-COV-2

Presentado por: M.C. Kenia Yaretzy Osuna Espinoza

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco y la co-dirección del Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres.

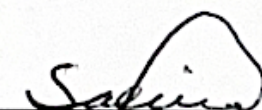
Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: **IN21-00002**



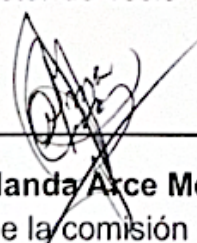
Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Director de Tesis



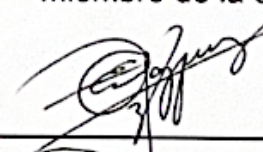
Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres
Co-director de Tesis



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Miembro de la comisión



Dr. C. Alma Yolanda Ace Mendoza
Miembro de la comisión



Dr. C. Eduardo Vázquez Garza
Miembro de la comisión

DEDICATORIA

*Para mi hija, Vania Sofía, mi luz nacida en medio del doctorado, fuente de fuerza,
amor y propósito.*

Para mi esposo, Carlos Díaz, por ser mi sostén y creer en mí cuando yo dudaba.

*Para mi familia; Ignacio, Juany, Brayan y Grecia— por darme raíces profundas y
alas para volar.*

*Para Nelli Rodriguez y Victor Díaz, un apoyo incondicional en cada paso de este
camino.*

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Inmunología y a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación profesional.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), que mediante el programa de apoyo financiero participó en la culminación de mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis, el Dr. Adrián G. Rosas Taraco, por abrirme las puertas de su laboratorio, compartir conmigo su experiencia profesional y guiarme durante el desarrollo de esta investigación.

A la comisión de tesis de este proyecto, el Dr. Manuel Guadalupe Mejía Torres, Dr. Mario C. Salinas Carmona, Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y el Dr. Eduardo Vázquez Garza, por brindar apoyo y resolver todas esas dudas de conocimiento que me surgieron en el camino.

Al gran equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de inmunología, gracias a su apoyo emocional y profesional todo esto fue posible.

A todos los profesores del departamento de inmunología y a mis compañeros de posgrado por todos los momentos agradables que pasamos juntos y volvieron este camino más sencillo.

RESUMEN

M.C. Kenia Yaretzy Osuna Espinoza

Fecha de titulación:

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

Título de estudio: Análisis del perfil de activación de células NK en pacientes con Infección grave por SARS-CoV-2.

Número de páginas: 98

Área de estudio: Inmunología

Propósito y diseño del estudio: Las células NK son linfocitos innatos con actividad citotóxica frente a infecciones virales. En la pandemia de COVID-19 se incrementaron las investigaciones sobre el papel de las células NK en la patogénesis y gravedad de la enfermedad. No obstante, el estado funcional de estas células continúan siendo área de interés. Estudios recientes destacan la relevancia del metabolismo celular en la regulación de la función celular; sin embargo, las alteraciones metabólicas de células NK en pacientes COVID-19 aún no han sido completamente caracterizadas. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de genes asociados al metabolismo, así como la expresión de marcadores de activación en células NK de pacientes con COVID-19 grave y su asociación con el desenlace clínico de estos pacientes.

Contribuciones y conclusiones: En este estudio se demostró que las células NK de pacientes con COVID-19 grave presentan una mayor expresión de marcadores de activación, como IFN- γ y granzima B, cuya expresión se asocia con un mejor desenlace clínico. Asimismo, los pacientes con desenlaces fatales mostraron una mayor expresión de genes relacionados con el metabolismo celular, incluyendo SIRT1, HIF1A y GLUT-1. En conclusión, las células NK de pacientes con COVID-19 grave exhiben una mayor expresión de marcadores de activación, así como alteraciones en la expresión de genes metabólicos, las cuales se asocian con el desenlace clínico de los pacientes.

INDICE GENERAL

CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 SARS-CoV-2	1
1.1.1 Características y estructura	1
1.1.2 Mecanismo de infección	2
1.2 COVID-19.....	3
1.2.1 Epidemiología	4
1.2.2 Clasificación de la gravedad	4
1.2.3 Manifestaciones clínicas	6
1.3 Respuesta inmune contra la infección por SARS-CoV-2	7
1.4 Alteraciones Inmunológicas en COVID-19	11
1.4.1 Linfopenia	11
1.4.2 Tormenta de citocinas	12
1.4.3 Expresión de receptores inhibidores.....	13
1.5 Células NK y COVID-19	14
1.5.1 Generalidades de las células NK.....	14
1.5.2 Rol de las células NK en COVID-19	17
1.6 Metabolismo de células NK en infecciones virales	20
CAPITULO 2	23
ANTECEDENTES.....	23
2.1 Disminución de células NK de sangre periférica en pacientes COVID-19.....	23
2.2 Alteraciones funcionales de células NK en COVID-19.....	24
2.3 Alteraciones metabólicas de las células NK en COVID-19	25
CAPITULO 3	27
JUSTIFICACIÓN.....	27
CAPITULO 4	28
HIPÓTESIS.....	28
CAPITULO 5	29
OBJETIVOS.....	29
5.1 Objetivo General	29
5.2 Objetivos Específicos	29
CAPITULO 6	30
ESTRATEGIA GENERAL	30
CAPITULO 7	32

MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
7.1 Diseño de estudio	32
7.2 Población de estudio.....	32
7.3 Tipo de muestreo	32
7.4 Criterios de selección.....	32
7.5 Consentimiento informado	34
7.6 Análisis de poblaciones celulares	35
7.6.1 Recuento Absoluto de Linfocitos.....	35
7.6.2 Expresión de Receptores Inhibidores en Linfocitos T CD8 ⁺	37
7.6.3 Fenotipo de células NK.....	39
7.6.4 Adquisición y análisis de muestras por citometría de flujo.....	40
7.7 Aislamiento de células NK de sangre periférica.....	41
7.8 Evaluación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos	42
7.9 Cuantificación de citocinas plasmáticas.....	43
CAPÍTULO 8	46
RESULTADOS	46
8.1 Pacientes con COVID-19 grave presentan linfopenia.....	46
8.2 Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica en pacientes con COVID-19 grave.....	47
8.3 Expresión de receptores inhibidores y granzima B en células T CD8 ⁺ de pacientes con COVID-19 grave.....	49
8.4 Asociación entre la expresión de receptores inhibidores en células T-CD8 ⁺ y el desenlace clínico de pacientes con COVID-19 grave.	51
8.5 Expresión de marcadores de activación en células NK de pacientes con COVID-19 grave.	54
8.6 Asociación entre la expresión de marcadores de activación en células NK y el desenlace clínico en pacientes con COVID-19 grave	57
8.7 Expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave	59
8.8 Asociación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK con el desenlace clínico de pacientes con COVID-19 grave.....	64
8.9 Expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células mononucleares de pacientes con COVID-19 grave.....	67
8.10 Concentración de citocinas plasmáticas en pacientes con COVID-19 grave.	69
CAPITULO 9	72
DISCUSIÓN.....	72
CAPITULO 10	85
CONCLUSIÓN.....	85
CAPITULO 11	86
LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	86

CAPITULO 12	88
REFERENCIAS	88
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos empleados en el recuento absoluto de linfocitos.....	35
Tabla 2. Anticuerpos empleados en análisis de la expresión de receptores inhibidores en linfocitos T-CD8+.	37
Tabla 3. Anticuerpos empleado para citometría de flujo.	39
Tabla 4. Sondas Taqman empleados en la expresión de genes inflamatorios.	42
Tabla 5. Secuencias de primers empleados en la expresión de genes metabólicos.	43
Tabla 6. Límites de detección y cuantificación de citocinas.	44
Tabla 7. Perfil hematológico de los participantes.	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2.....	2
Figura 2. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2.....	3
Figura 3. Casos reportados de COVID-19 en México.....	4
Figura 4. Manifestaciones clínicas en pacientes con COVID-19.....	7
Figura 5. Funciones efectoras de las células NK.....	15
Figura 6. Receptores inhibidores y activadores expresados en las células NK....	16
Figura 7. Esquema de la estrategia general del proyecto.....	31
Figura 8. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el recuento absoluto de linfocitos de sangre periférica.....	37
Figura 9. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el análisis de expresión de receptores inhibidores en linfocitos T-CD8+. En los histogramas se muestra la expresión de los marcadores evaluados en donde, de color gris se expresa el control de fluorescencia menos uno (FMO), y en color azul, los linfocitos T-CD8+ de la muestra de interés.....	38
Figura 10. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el análisis de expresión de marcadores de activación en células NK.....	40
Figura 11. Recuento absoluto de leucocitos en sangre periférica de pacientes con COVID-19 grave y grupo control.....	48
Figura 12. Expresión de receptores inhibidores en células T-CD8+.....	51
Figura 13. Expresión de receptores inhibidores en células T CD8+ y desenlace clínicos de pacientes con COVID-19 grave.....	52

Figura 14. Correlación de granzima B y PD-1 en células T-CD8+ de pacientes con COVID-19 grave.	53
Figura 15. Expresión de marcadores de activación e inhibición en células NK....	55
Figura 16. Dinámica en la expresión de marcadores de activación e inhibición en células NK a lo largo de la estancia hospitalaria.	56
Figura 17. Asociación de la expresión de marcadores de activación e inhibición en células NK y el desenlace.....	58
Figura 18. Niveles de expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave.	60
Figura 19. Dinámica en la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave.	61
Figura 20. Correlación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave.	63
Figura 21. Relación entre la expresión de genes inflamatorios y metabólicos.	64
Figura 22. Asociación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK y el desenlace clínico de pacientes con COVID-19 grave.	66
Figura 23. Expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células mononucleares.	68
Figura 24. Niveles de citocinas plasmáticas en pacientes con COVID-19 grave. ...	70
Figura 25. Resumen gráfico de resultados	71

LISTA DE ABREVIATURAS

SARS-CoV-2	Coronavirus de Tipo 2 Causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus 2019
ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ACE2	Receptor de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
VNI	Ventilación No Invasiva
VMI	Ventilación Mecánica Invasiva
SDRA	Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
NALT	Tejido Linfoide Asociado a Nasofaringe
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
TLR	Receptores tipo Toll
IFN	Interferón
NF- κ B	Factor Nuclear κ B
MPO	Mieloperoxidasa
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Natural Killer
CD	Células Dendríticas

cDCs	Células Dendríticas Clásicas
pDCs	Células Dendríticas Plasmocitoides
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
FasL	Ligando Fas
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
MHC-I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I
PD-1	Proteína de Muerte Celular Programada 1
LAG-3	Gen Asociado a la Activación Linfocitaria 3
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
OXPHOS	Fosforilación Oxidativa Mitocondrial
ATP	Trifosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Quinasa Activada por AMP
NHP	Primate No Humano
SIRT1	Sirtuina 1
HIF1 α	Subunidad Alfa del Factor 1 Inducible por Hipoxia
GLUT1	Transportador de Glucosa 1
CMNs	Células Mononucleares de Sangre Periférica
hPSC-AO	Células Madre Pluripotentes Humanas

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 SARS-CoV-2

1.1.1 Características y estructura

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es el agente causal de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Los coronavirus son virus de ARN de sentido positivo, envueltos, no segmentados y monocatenarios pertenecientes a la familia coronaviridae del género betacoronavirus. El nombre de este virus se debe a la observación en el microscopio electrónico de proyecciones que corresponden a grandes glicoproteína transmembrana espiga “Spike” (S, del inglés “*spike*”) que asimilan la forma de corona (Figura 1A) (1).

El genoma del SARS-CoV-2 contiene codifica para cuatro proteínas estructurales y once proteínas accesorias. Las cuatro proteínas estructurales son S, E, M y N (Figura 1B). Estas proteínas estructurales conforman un virión envuelto capaz de infectar células. Los once genes y proteínas accesorias son ORF3a-d, ORF6, ORF7a y b, ORF8, ORF9b y c, y ORF10, y desempeñan diversas funciones, desde la interacción con el huésped hasta la modulación inmunitaria (2).

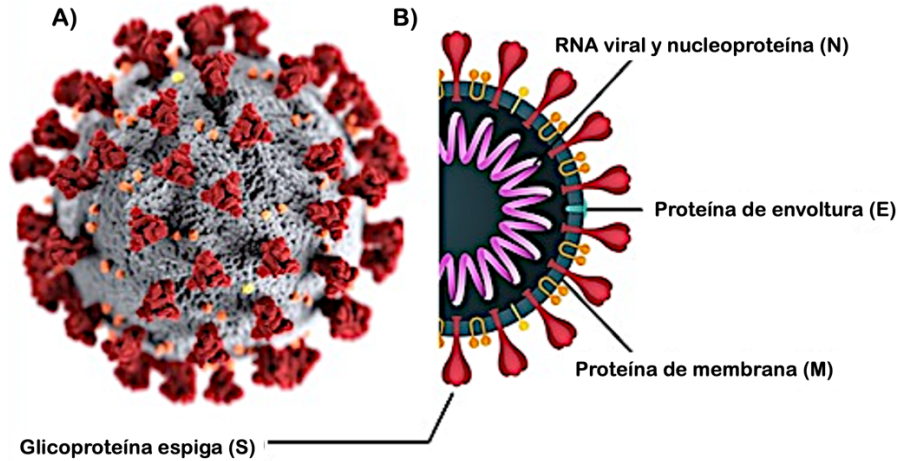


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2.

Imagen adaptada de: Cedillo-Barrón L., et al. (2020) COVID-19, la enfermedad viral que se diseminó en el mundo (3).

1.1.2 Mecanismo de infección

Estas mismas proteínas median la entrada del coronavirus en las células blanco al unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2); este receptor se ha identificado en pulmón y en otros tejidos del cuerpo, como la córnea, la vesícula biliar, el corazón, el riñón y los testículos, pero se distribuye con mayor frecuencia en las células epiteliales nasales, alveolares e intestinales (4). Una vez que el virus penetra en la célula huésped, libera su genoma viral en el citoplasma, donde se inicia la replicación del ARN genómico y subgenómico, así como la síntesis de proteínas estructurales. La traducción de las proteínas de membrana, envoltura y espiga tiene lugar en el retículo endoplásmico, mientras la síntesis de la nucleocápside ocurre en el citoplasma. Posteriormente, el ensamblaje de los nuevos viriones se lleva a cabo en el aparato de Golgi, donde se forman las

partículas virales maduras que son finalmente transportadas hacia la membrana plasmática y liberadas mediante un proceso de exocitosis (Figura 2) (5,6).

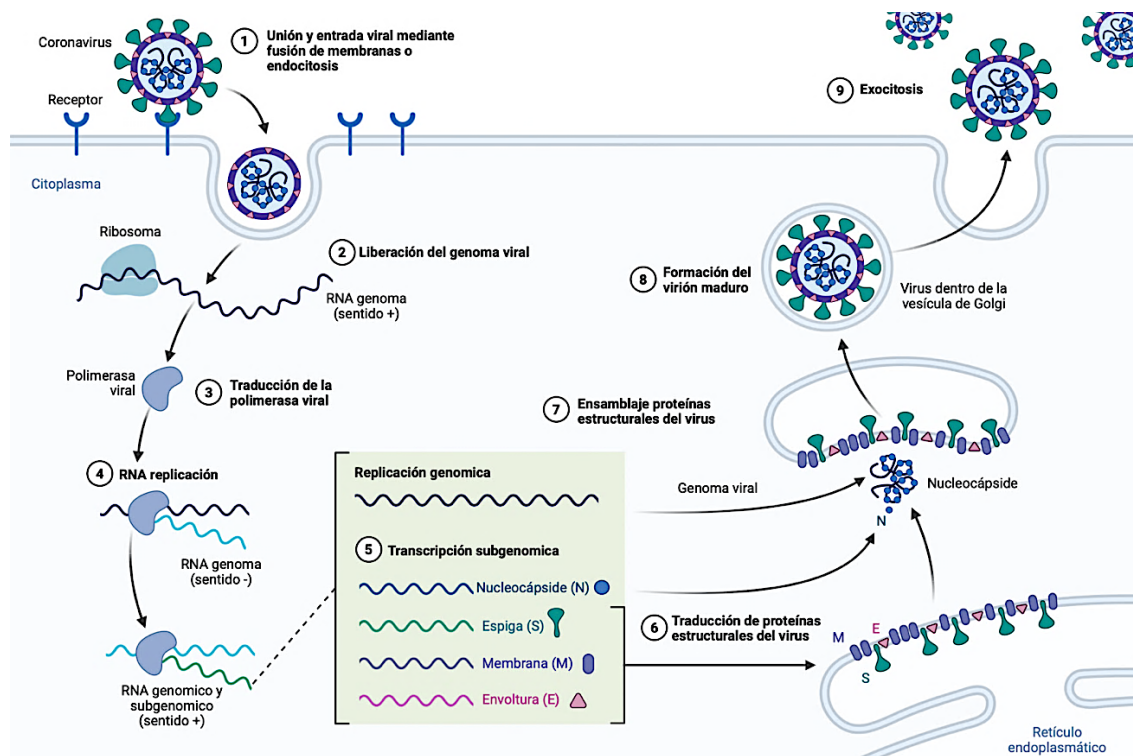


Figura 2. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2.

Imagen adaptada de: Harrison A., Lin T., Wang P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis (5).

1.2 COVID-19

La COVID-19 es una infección respiratoria causada por el virus SARS-CoV-2. El primer caso documentado se notificó en Wuhan, China, en diciembre de 2019. Debido a su alta transmisibilidad y rápida propagación a nivel global, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la COVID-19 como una pandemia en marzo de 2020 (7).

1.2.1 Epidemiología

Las cifras actuales de COVID-19 hasta el mes de mayo del año 2025, reporta un total de 777,891,034 casos de COVID-19 a nivel mundial, cobrando un total de 7,096,187 muertes por esta causa. En México se reporta un total de 7.6 millones de casos y 335 mil muertes atribuidas a esta causa, figura 3 (8).

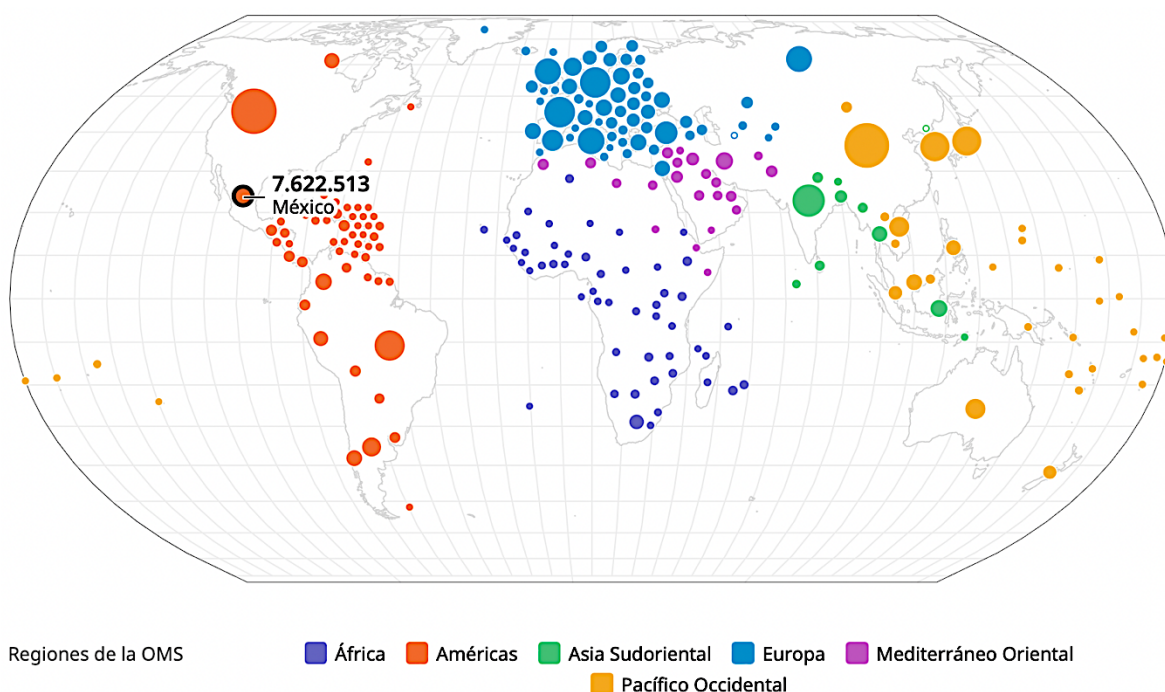


Figura 3. Casos reportados de COVID-19 en México.

Imagen obtenida: Panel de la OMS sobre la COVID-19 (9).

1.2.2 Clasificación de la gravedad

La evaluación de la gravedad de la COVID-19 es un componente fundamental en el abordaje clínico de los pacientes. Parámetros relacionados con el soporte respiratorio, como la saturación de oxígeno, así como la necesidad de ventilación no invasiva (VNI) o ventilación mecánica invasiva (VMI) al momento del ingreso

hospitalario, se consideran indicadores clave de riesgo, pronóstico y desenlaces clínicos adversos, incluida la mortalidad. Con el objetivo de estandarizar la evaluación de la progresión de la enfermedad, la OMS desarrolló la Escala de Progresión Clínica de la COVID-19. Aunque esta herramienta fue concebida originalmente para evaluar los desenlaces clínicos, su uso se ha extendido ampliamente como criterio para estratificar la gravedad de la enfermedad al ingreso hospitalario (10,11).

Definiciones de la OMS sobre la gravedad de la enfermedad por COVID-19 (11):

1. COVID-19 No Grave

Se define como la ausencia de criterios para COVID-19 grave o crítica.

2. COVID-19 Grave

Se define por cualquiera de los siguientes criterios:

- Saturación de oxígeno < 90%
- Neumonía grave
- Signos de dificultad respiratoria grave (uso de músculos accesorios, incapacidad para completar oraciones completas, frecuencia respiratoria > 30 respiraciones por minuto)

3. COVID-19 crítica

Se define por los criterios del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), sepsis, choque séptico u otras afecciones que normalmente requerirían terapias de soporte vital (VMI o VNI), o terapia vasopresora.

1.2.3 Manifestaciones clínicas

La respuesta inmunológica individual frente a la infección por SARS-CoV-2 desempeña un papel determinante en la gravedad clínica de la COVID-19. Los casos de COVID-19 leve-moderado pueden incluir tos, debilidad, fiebre y un espectro de síntomas como dolor de garganta, rinorrea, linfopenia y diarrea. Aquellos individuos que no pueden eliminar el virus desarrollan un estado de infección grave en donde con frecuencia se establece el SDRA el cual puede tener como desenlace la muerte del paciente (4).

En términos generales, se han identificado dos perfiles inmunológicos disfuncionales asociados a desenlaces adversos:

1. *Falta de una respuesta inmune antiviral oportuna y eficaz*, lo que permite una replicación viral descontrolada en las fases iniciales de la infección.
2. *Incapacidad para modular adecuadamente la respuesta inflamatoria*, lo que conduce a una activación inmune exacerbada.

Esta dicotomía resalta la importancia de un equilibrio de la respuesta inmunológica adecuada en el control efectivo de la infección y en la prevención de complicaciones graves.

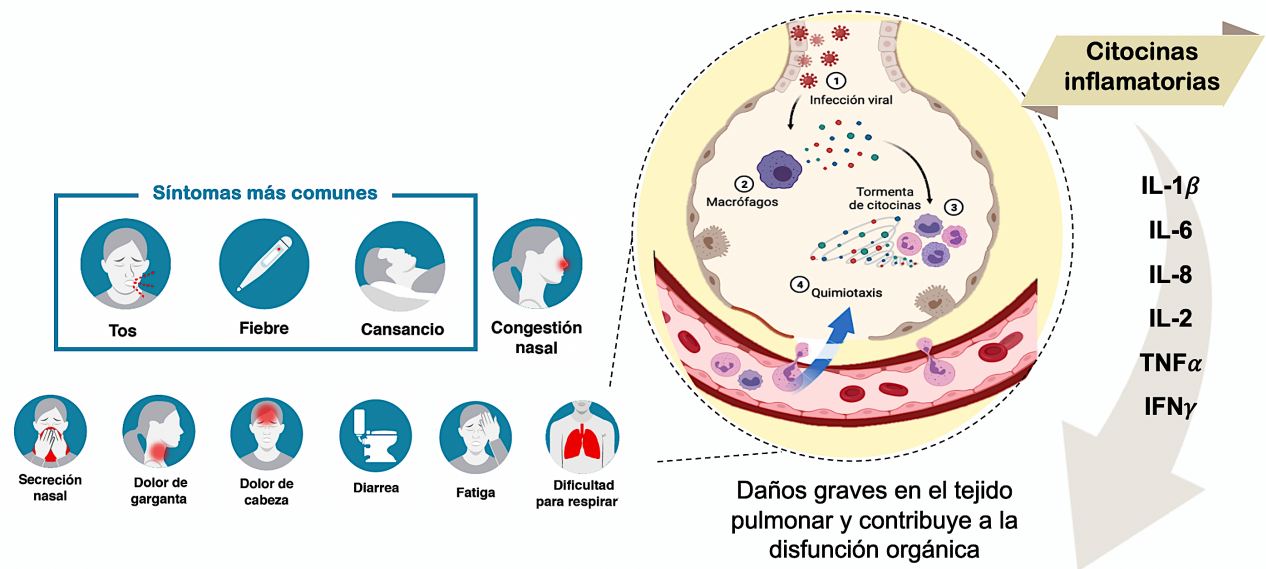


Figura 4. Manifestaciones clínicas en pacientes con COVID-19.

Imagen adaptada de: Iwasaki, A. (2025). Cytokine Storm. BioRender.

1.3 Respuesta inmune contra la infección por SARS-CoV-2

La contención de infecciones virales, como la provocada por el SARS-CoV-2, depende críticamente de la interacción sinérgica entre los componentes del sistema inmunológico innato y adaptativo. Tradicionalmente, se ha reconocido a las células citotóxicas, particularmente los linfocitos T-CD8+, como actores centrales en la respuesta inmunitaria antiviral. No obstante, una respuesta eficaz frente a la infección viral requiere la participación coordinada de múltiples tipos celulares pertenecientes: 1) inmunidad innata (macrófagos, células dendríticas y células NK); y 2) inmunidad adaptativa (linfocitos T y B). Lo anterior permite una respuesta robusta y específica para garantizar el control y eliminación de las infecciones virales (1,12).

Tras la entrada del virus al organismo, la interacción inicial entre el patógeno y las células del hospedero tiene lugar en el tracto respiratorio superior, particularmente a nivel del epitelio nasal, las amígdalas y las adenoides, estructuras que forman parte del tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT, por sus siglas en inglés). En esta región se activa la respuesta inmunitaria inicial, caracterizada por la inducción de la inmunidad de las mucosas (13).

En los pulmones, los macrófagos alveolares actúan como células centinela, constituyendo la primera línea de defensa frente al virus mediante la detección del agente patógeno y la activación de mecanismos innatos de inmunidad antiviral (13). Los macrófagos, al igual a otras poblaciones celulares, son capaces de reconocer al virus y células infectadas a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). Entre estos, los receptores en los endosomas, como TLR7, TLR8 y TLR9, así como los receptores citosólicos, como los de tipo RIG-I, desempeñan un papel fundamental en la inducción de fuertes respuestas antivirales (14). La señalización de los TLR activa la transcripción de los interferón (IFN) tipo I y tipo III, así como las citocinas y quimiocinas proinflamatorias dependientes del factor nuclear κB (NF- κB), esta respuesta inflamatoria localizada, liderada principalmente por macrófagos, se caracteriza por el aumento en la producción de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18, IL-8, IL-10, MCP-1 y MIP-1 α . Estas moléculas participan en el reclutamiento de otras poblaciones celulares al sitio de la infección, lo que marca el inicio de la respuesta inmune adaptativa contra el SARS-CoV-2 (13).

Ante el estímulo inicial, los neutrófilos migran rápidamente al sitio de la infección y despliegan una respuesta antiviral mediante diversos mecanismos, que incluyen la fagocitosis, la liberación de citocinas proinflamatorias, y la secreción de enzimas como la mieloperoxidasa (MPO), la elastasa y péptidos antimicrobianos como las defensinas. Además, estos leucocitos son capaces de formar trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), estructuras compuestas por ADN y proteínas citotóxicas que inmovilizan y neutralizan a los patógenos (15). Una activación eficaz de la inmunidad innata contribuye a limitar etapas clave del ciclo viral; incluyendo la entrada, traducción, replicación y ensamblaje, favoreciendo la detección y eliminación oportuna de las células infectadas (16).

La eliminación de células infectadas esta orquestada en gran medida por las células citotóxicas. Las células NK son linfocitos citotóxicos de la inmunidad innata, estas células ejercen su función citotóxica principalmente mediante la liberación de gránulos citotóxicos (granzimas y perforinas), y citocinas inflamatorias (TNF- α e IFN- γ). Una vez establecida la inmunidad adaptativa también llevan a cabo la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (17).

Las células dendríticas (CD) se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del tracto respiratorio, donde actúan como centinelas inmunológicas capaces de reconocer microorganismos invasores. En la infección por SARS-CoV-2 las células dendríticas mieloides clásicas (cDCs) cumplen principalmente la función de células presentadoras de antígenos; tras la captura del patógeno, migran hacia los ganglios linfáticos regionales para procesar y presentar los antígenos a los linfocitos T, lo que desencadena una respuesta inmunitaria adaptativa específica y duradera (18). Por

otro lado, las células dendríticas plasmocitoides (pDCs) constituyen un subtipo especializado en la detección de infecciones virales a través de los receptores TLR7 y TLR9, caracterizándose por su capacidad de producir grandes cantidades de interferones tipo I y participar en la presentación antigénica, contribuyendo así tanto a la inmunidad innata como a la transición hacia la inmunidad adaptativa (15).

Las CD inducen la activación, polarización y diferenciación de linfocitos T vírgenes mediante la presentación de péptidos antigénicos en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o II, acompañada por la secreción de citocinas y quimiocinas que modulan el microambiente inmunológico. Una vez activados, los linfocitos T migran hacia el sitio de infección, donde ejercen funciones efectoras a través de la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas citotóxicas, como granzimas y perforina. Tanto los linfocitos T CD4⁺ como los CD8⁺ desempeñan funciones efectoras importantes para la eliminación de infecciones virales, además de contribuir al establecimiento de la memoria inmunológica, proporcionando protección frente a infecciones subsecuentes (15). Los linfocitos B contribuyen a la respuesta inmunitaria antiviral principalmente mediante la producción de anticuerpos, siendo una fuente esencial de anticuerpos neutralizantes específicos para bloquear la entrada del virus y facilitar su eliminación. Además, participan en la secreción de mediadores inflamatorios y en la activación de linfocitos T CD4⁺ mediante la presentación antigénica, modulando así la respuesta inmunitaria adaptativa (15).

1.4 Alteraciones Inmunológicas en COVID-19

Las principales alteraciones inmunológicas observadas en pacientes con COVID-19 suelen ser manifestaciones sistémicas asociadas con el desenlace clínico de los pacientes. Dentro de estas, destaca la linfopenia, tormenta de citocinas, y expresión de receptores inhibidores en células citotóxicas.

1.4.1 Linfopenia

La linfopenia, definida como la disminución en el número absoluto de linfocitos en sangre periférica, constituye la principal alteración inmunológica observada en pacientes con COVID-19. Este hallazgo ha sido consistentemente documentado en la mayoría de los casos, independientemente de la gravedad clínica de la enfermedad; no obstante, en pacientes con formas graves o críticas de COVID-19, la linfopenia tiende a ser más pronunciada. Diversos estudios han reportado la reducción linfocitaria, especialmente en las subpoblaciones citotóxicas, como las células NK y los linfocitos T CD8+, sugiriendo un compromiso importante de la respuesta inmune antiviral en estos pacientes (7,19–24).

Recientemente, se ha documentado una reducción significativa en la población de linfocitos T CD4+ en pacientes con COVID-19 (1,25–29). En este contexto, la linfopenia, se considera una característica clínica relevante en la COVID-19, ya que se ha asociado de manera consistente con un peor pronóstico, mayor gravedad de la enfermedad y mayor riesgo de evolución hacia formas críticas. (27). A pesar de su importancia clínica, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al desarrollo de linfopenia en pacientes con COVID-19 aún no se comprenden por completo.

Entre las hipótesis se incluyen la apoptosis linfocitaria inducida por una activación inmunitaria desregulada y la migración de linfocitos desde la circulación sistémica hacia los tejidos infectados, particularmente hacia el parénquima pulmonar, donde ocurre la respuesta inflamatoria más intensa. Estas alteraciones podrían contribuir tanto a la inmunodeficiencia relativa a nivel sistémico, como al daño tisular observado en los casos graves de COVID-19 (4).

1.4.2 Tormenta de citocinas

La infección por SARS-CoV-2 desencadena una intensa respuesta proinflamatoria a nivel pulmonar, caracterizada por infiltración inflamatoria, daño alveolar y, en fases avanzadas, fibrosis pulmonar. Cuando esta respuesta inflamatoria no se regula adecuadamente, puede inducir un daño tisular grave, contribuyendo a la disfunción pulmonar y sistémica. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en pacientes con COVID-19 grave, en quienes se han observado elevadas concentraciones de múltiples citocinas y quimiocinas, incluyendo IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MCP-3, IL-1ra, MIP-1 α , IFN- γ y TNF- α . Estos hallazgos son consistentes con la denominada “tormenta de citocinas”, un estado de hiperactivación inmunitaria asociada estrechamente con la progresión a enfermedad crítica y desenlaces clínicos desfavorables, incluida la muerte (30–32).

Los niveles elevados de citocinas y quimiocinas en pacientes con COVID-19 no solo influye en la frecuencia de células citotóxicas en sangre periférica, también se ha reportado que estas citocinas participan en la disminución de la funcionalidad de estas células. Bordoni *et al.* observaron que tanto la IL-6 como la IL-8 se

correlacionan negativamente con el contenido de perforina en las células NK y T CD8+, demostrando que el aumento de los mediadores inflamatorios están asociados con la reducción de la función citotóxica en pacientes con COVID-19 grave (20,25).

1.4.3 Expresión de receptores inhibidores en células NK

La sobreexpresión de receptores inhibidores en células citotóxicas es otro de los hallazgos reportados ampliamente en pacientes con COVID-19. Un número creciente de estudios han demostrado el aumento en la expresión de PD-1 (33–35), TIM-3 (27,29,36) y LAG-3 (25,37). Estos hallazgos han respaldado la hipótesis de un estado de hipofuncionalidad en los linfocitos citotóxicos de pacientes con COVID-19, lo cual podría contribuir a un desenlace clínico desfavorable. Este fenómeno de "hipofuncionalidad" o "agotamiento" inmunológico ha sido ampliamente descrito en enfermedades crónicas como el cáncer y en infecciones virales persistentes, donde la exposición continua a estímulos antigénicos induce una expresión sostenida de estos receptores inhibidores, promoviendo un "fenotipo agotado" caracterizado por una disminución de las funciones efectoras celulares (38,39). No obstante, la relevancia y el impacto clínico de este fenómeno en el contexto de una infección viral aguda, como la causada por SARS-CoV-2, aún no se comprenden completamente y continúan siendo objeto de investigación (40).

1.5 Células NK y COVID-19

1.5.1 Generalidades de las células NK

Las células NK son linfocitos pertenecientes al sistema inmunitario innato y desempeñan un papel crucial como primera línea de defensa frente a infecciones virales y procesos neoplásicos, además de participar en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa (41). Derivan de un progenitor linfoide común y adquieren su funcionalidad y grado de maduración mediante la expresión secuencial y regulada de distintos receptores de superficie, lo cual permite su identificación y clasificación en distintas subpoblaciones funcionales. Fenotípicamente, las células NK se caracterizan por la expresión de los marcadores CD56/CD16, y representan aproximadamente entre el 5% y el 15% de las células mononucleares circulantes en sangre periférica (42,43). En términos generales, la principal función de las células NK es la citotoxicidad frente a células infectadas o transformadas, a través de distintas vías, figura 5 (41,44):

- A. Liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforinas y granzimas.
- B. Secreción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α .
- C. Inducción de apoptosis a través de la interacción del ligando Fas (FasL).
- D. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

Estos mecanismos permiten a las células NK desempeñar un papel esencial en la eliminación temprana de células infectadas por virus y en la contención de respuestas inmunitarias excesivas (45).

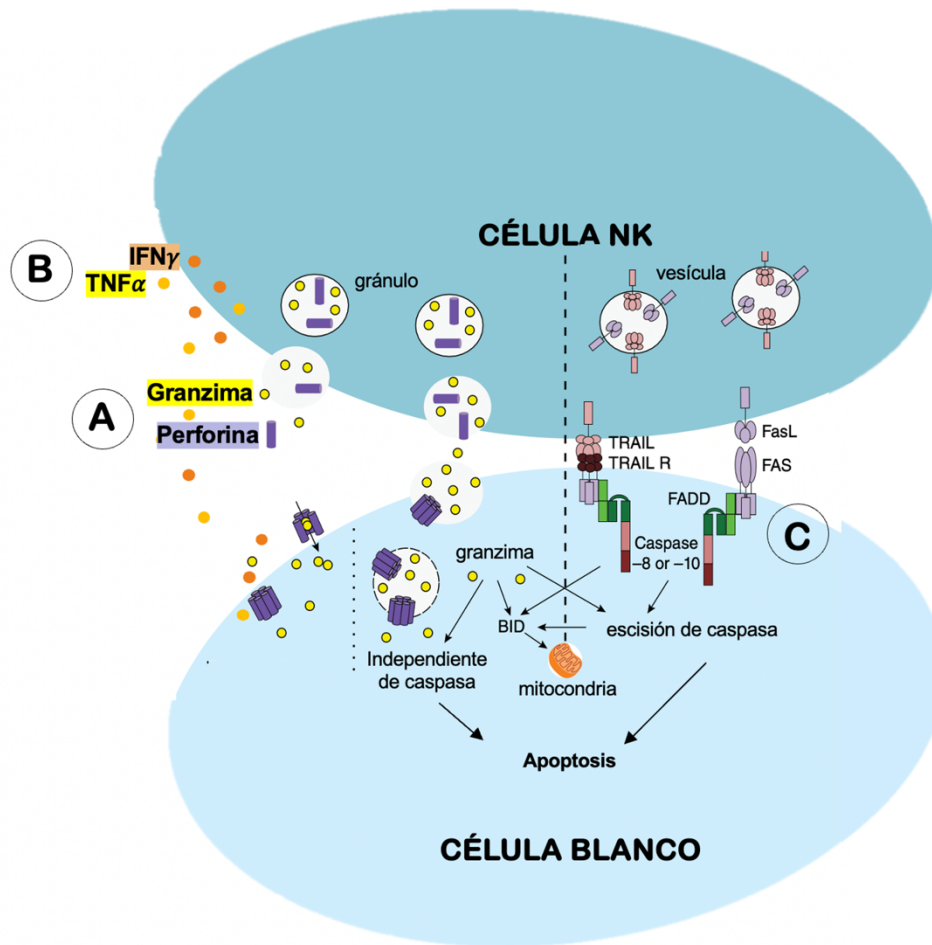


Figura 5. Funciones efectoras de las células NK.

La activación y las funciones de las células NK están reguladas por la interacción entre un gran número de receptores inhibidores y activadores en combinación con la presencia de ciertas citocinas. Los receptores activadores (NKG2D, NKp30, CD226, por mencionar algunos) al reconocer sus ligandos específicos transducen señales activadoras. Por otro lado, los receptores inhibidores (NKG2A, KIR2DL, etc.) detectan principalmente moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) en posibles células diana y transducen señales inhibitoras que antagonizan las señales activadoras. Así el balance en la expresión de estos

receptores determina la función final de las células NK. Estos receptores son codificados de línea germinal y muestran una gran variabilidad en su expresión por lo tanto, células NK del mismo individuo muestran diferencias en la expresión de sus receptores y responden a diferentes estímulos, figura 6 (46).

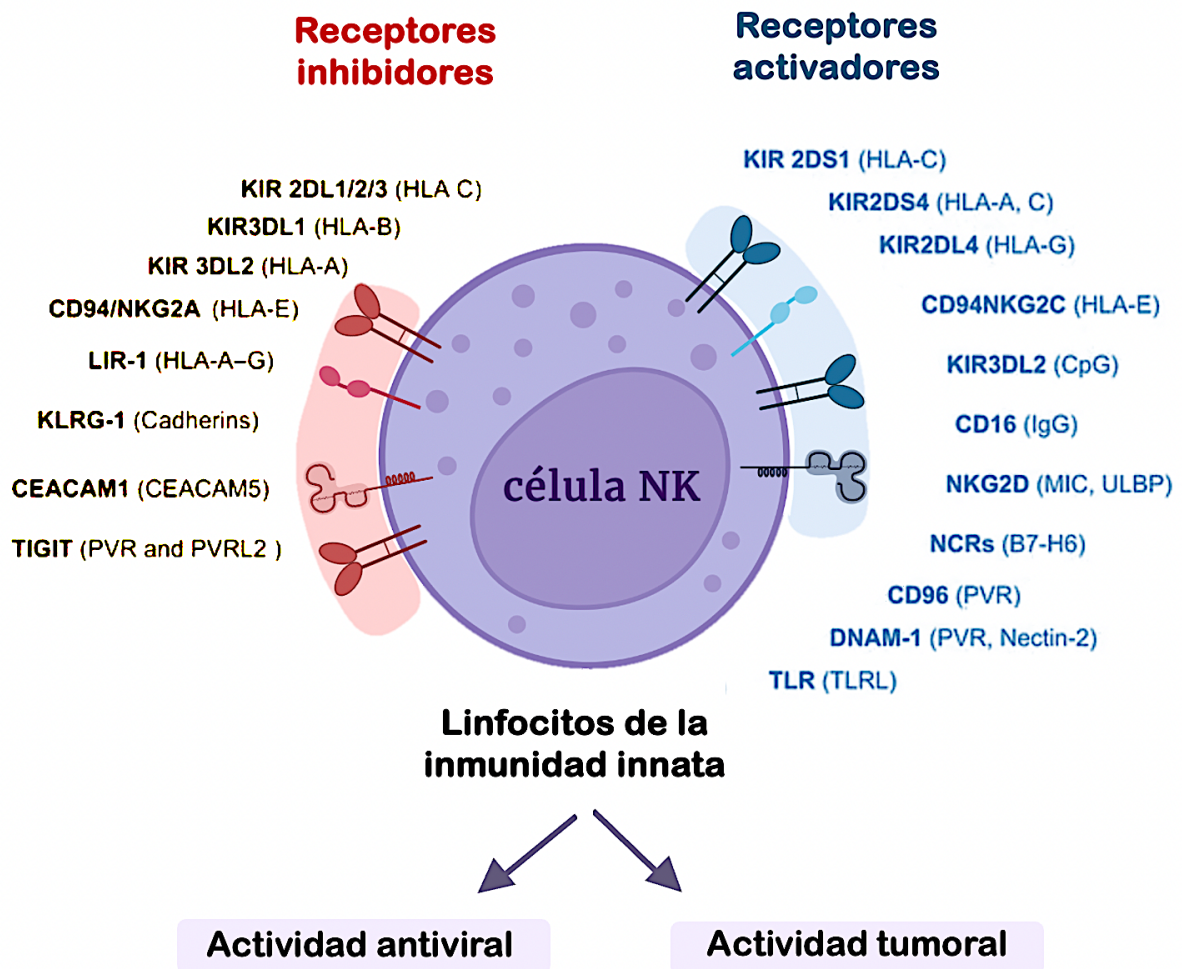


Figura 6. Receptores inhibidores y activadores expresados en las células NK.

Las células NK pueden dividirse en subconjuntos en base a los marcadores de superficie que expresan y funciones efectoras, de esta manera se identifican a las

células NK CD56^{DIM} y CD56^{BRIGHT}. Las células NK CD56^{DIM}CD16⁺ son abundantes en la sangre y su principal función es la citotoxicidad mediante la liberación de mediadores líticos como perforinas y granzimas B. Por otro lado, las células CD56^{BRIGHT}CD16⁻ son productoras de citocinas como IFN- γ en respuesta a la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18.(41,47).

1.5..2 Rol de las células NK en COVID-19

El correcto funcionamiento de las células NK es pieza clave en la respuesta inmune contra la infección por SARS-CoV-2. La localización de las células NK en el lugar de la infección es importante para la eliminación del virus. En condiciones de homeostasis, las células NK en pulmón muestran fenotipos altamente diferenciados, pero hiporreactivos, con un movimiento continuo y dinámico entre la sangre y el pulmón (4,47).

Estudios *in vitro* han demostrado que las células NK son capaces de interactuar directamente con células infectadas por el SARS-CoV-2, péptidos específicos derivados de la proteína S del SARS-CoV-2 pueden unirse al receptor activador NKG2D, potenciando tanto la actividad citotóxica de las células NK como la producción de IFN- γ (48). Asimismo, la célula NK es capaz de reconocer las proteínas no estructurales Nsp13 y Nsp16 del SARS-CoV-2 y potenciar su respuesta frente a la infección, facilitando el reconocimiento y limitando la replicación viral en células epiteliales de pulmón (49,50).

Por otra parte, diversos estudios sugieren un fenotipo disfuncional o de agotamiento inmunológico en las células NK durante la infección por SARS-CoV-2. En pacientes

con COVID-19 se ha observado una expresión aumentada de marcadores inhibidores como la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), el gen asociado a la activación linfocitaria 3 (LAG-3), TIGIT y NKG2A, en comparación con individuos sanos. Estos cambios fenotípicos podría contribuir a la evasión inmune del virus y al agravamiento del cuadro clínico en fases avanzadas de la enfermedad (33,51).

Para generar respuestas antivirales eficaces y sostenidas, las células NK requieren interacciones bidireccionales complejas con diversas poblaciones de células inmunitarias. De esta manera también logran modular adecuadamente su actividad y evitar una inflamación sistémica excesiva.

Tras la infección viral, las células NK secretan diversas citocinas, entre ellas la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α), que participa en el reclutamiento de monocitos hacia el sitio de infección y favorece su activación funcional. A su vez, los macrófagos activados liberan quimiocinas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11, que contribuyen al reclutamiento de células NK, y modulan la activación, función efectora y persistencia de las células NK, estableciendo un circuito de retroalimentación esencial para el control de la infección y la regulación de la inflamación (52). Por lo tanto, las señales activadoras e inhibidoras que reciben las células NK de los monocitos en la COVID-19 grave pueden explicar el estado activado pero disfuncional de estas células (52).

Los neutrófilos también contribuyen al reclutamiento de células NK a través de la secreción de múltiples quimiocinas, entre las que destacan CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Además, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la secreción de prostaglandinas y la liberación de componentes granulares son capaces de modular aspectos clave como la supervivencia, proliferación, actividad citotóxica y producción de IFN- γ de células NK (52).

Dado el papel fundamental de las células NK en la inmunidad antiviral y su implicación específica en la inmunopatogénesis de COVID-19, han surgido diversas estrategias terapéuticas basadas en la modulación o administración de células NK. Estos enfoques incluyen tanto el uso de células NK autólogas o alogénicas como el diseño de células NK modificadas genéticamente, con el objetivo de potenciar su capacidad citotóxica, mejorar su persistencia en el microambiente inflamatorio y restaurar su funcionalidad en contextos de agotamiento inmunológico, como el observado en pacientes con COVID-19 grave (53).

A pesar de los avances alcanzados en el conocimiento de la patogénesis y el tratamiento de la COVID-19, la evidencia científica actual señala que los mecanismos subyacentes a la disfunción de las células NK aún no se comprenden por completo (54). Es en este contexto donde radica la importancia de investigar nuevas variables que contribuyan a explicar las alteraciones funcionales reportadas en las células NK de pacientes con COVID-19 grave.

1.6 Metabolismo de células NK en infecciones virales

Las células NK están listas para destruir células diana y producir citocinas tras la activación. Esta rápida respuesta requiere diversos cambios metabólicos conocidos como “reprogramación metabólica” para una activación celular óptima. Existen dos vías metabólicas principales y superpuestas para generar trifosfato de adenosina (ATP): la glucólisis anaeróbica y la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS). La glucólisis convierte la glucosa en piruvato mediante diferentes reacciones metabólicas. Esta vía depende del oxígeno y es relativamente ineficiente, generando solo dos moléculas de ATP como producto final. Por otro lado, la OXPHOS es una vía dependiente del oxígeno que produce aproximadamente 30 moléculas de ATP. Por lo tanto, el metabolismo puede definirse como las reacciones anabólicas y catabólicas que se realizan para obtener la energía necesaria para las funciones celulares (55).

Todas las células pueden detectar la disponibilidad de nutrientes en su microambiente para activar diferentes vías metabólicas según sus necesidades energéticas. Esta acción de detección es posible gracias a diferentes reguladores metabólicos que pueden activar o desactivar las vías metabólicas y, por lo tanto, modificar el metabolismo celular (56). Se han identificado algunos "reguladores maestros del metabolismo", un ejemplo es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta proteína se activa en condiciones de privación energética, donde los niveles de ATP disminuyen y el AMP aumenta. Una vez activada, la AMPK disminuye el consumo de energía (anabolismo) y aumenta la producción de energía (catabolismo) mediante la fosforilación de proteínas clave en múltiples vías (57,58).

Se han desarrollado investigaciones sobre el metabolismo de las células NK, que muestran cambios metabólicos según su fenotipo funcional, estímulo de activación y estado de activación. En el fenotipo funcional, las células NK con actividad citotóxica (CD56^{dim}) mantienen tasas más altas de glucólisis y OXPHOS que las células NK productoras de citocinas (CD56^{bright}). Además, las células NK de diferentes tejidos difieren funcionalmente según su localización y presentan perfiles metabólicos diferentes (59,60).

La capacidad funcional de las células inmunitarias están estrechamente vinculadas a su actividad metabólica, por lo tanto, resulta relevante explorar el papel del metabolismo celular en las alteraciones funcionales observadas en estas células durante la infección por SARS-CoV-2. Estudios transcriptómicos realizados en células mononucleares de pacientes con COVID-19 han revelado una sobreexpresión de múltiples genes relacionados con rutas metabólicas clave, incluyendo componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la glucólisis y la gluconeogénesis (61). Recientemente, se han llevado a cabo investigaciones orientadas a evaluar los cambios metabólicos en células NK durante la infección por SARS-CoV-2. Un estudio analizó las células NK aisladas del tejido pulmonar de 19 pacientes fallecidos a causa de la COVID-19 donde observaron niveles elevados de actividad en diversas rutas metabólicas, incluyendo la glucólisis, el metabolismo del fosfato de inositol y el metabolismo de los glicerolípidos. Asimismo, se identificó una sobreexpresión de dos enzimas clave de la vía de los glicerolípidos: lipina 1 y lipina 2. Estos cambios metabólicos podrían

estar relacionados con una mejora en funciones efectoras de las células NK, tales como la quimiotaxis, la degranulación y la citotoxicidad (62).

La desregulación de genes asociados al metabolismo celular y a la fosforilación oxidativa, sugiere alteraciones en la activación y funcionalidad de las células NK durante la infección por SARS-CoV-2. Estos cambios reflejan una reprogramación metabólica significativa, que podría contribuir tanto a la disfunción inmunitaria como a la progresión de la enfermedad (17).

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Disminución de células NK de sangre periférica en pacientes COVID-19

En el caso específico de la infección por SARS-CoV-2 se ha identificado que los pacientes con COVID-19 presentan menor número de células NK en sangre periférica, especialmente en los pacientes con enfermedad grave en comparación con aquellos con enfermedad leve (4,47,51). La evaluación del fluido bronquio-alveolar de los pacientes con COVID-19 ha demostrado niveles elevados de citocinas quimioatrayentes de células NK, incluyendo CCL3, CCL3L1, CCL4, CXCL9, CXCL10 y CXCL11. De esta manera, el reducido número de células NK observado en la circulación podría reflejar en cierta medida una redistribución de estas células hacia el pulmón (63).

Una de las funciones efectoras de las células NK durante infecciones virales es la eliminación directa de las células infectadas, por lo que, la disminución en los números absolutos de células NK se ha asociado con mayor replicación viral y peores desenlaces clínicos en pacientes COVID-19. Balachandran *et. al.*, evaluaron el efecto de la deleción de células NK durante la infección por SARS-CoV-2 en un modelo de primates no humano (NHP, por sus siglas en inglés) observando que la eliminación de células NK resulta en un aumento de la replicación y carga viral. Estos resultados evidencian la importancia de la función de células NK con la gravedad de COVID-19 (64).

2.2 Alteraciones funcionales de células NK en COVID-19

La evidencia actual sobre el estado funcional de las células NK continúa siendo un área de investigación con hallazgos contradictorios. Por un lado, diversos estudios han reportado una mayor expresión de receptores inhibidores en células NK, lo que sugiere un estado hipofuncional o agotado de estas células, asociado a un peor desenlace clínico (33,51,65). Wilk y colaboradores identificaron mayor expresión de tres marcadores inhibidores, LAG3, PDCD1 y HAVCR2 en células NK de pacientes con COVID-19 indicando un fenotipo "agotado" en estas células (65).

Por otra parte, otros estudios sugieren un estado funcional altamente activado, evidenciado por la sobreexpresión de mediadores citotóxicos. Bert M. y colaboradores demostraron una regulación positiva de los marcadores de activación IFN- γ y LAMP1 en células NK provenientes de sangre periférica de pacientes con COVID-19 en estado grave (66). Otros estudios han reportado niveles elevados de granzima B en suero de pacientes con COVID-19, lo cual indica una activación de linfocitos citotóxicos, incluyendo células T CD8+ y células NK (26,33). En línea con estos hallazgos, Maucourant y colaboradores observaron una expresión aumentada de granzima B en células NK de pacientes con enfermedad grave (63). Por otra parte, Fernández-Soto et. al., demostraron que aunque las células NK muestran un fenotipo activado, también presentan menor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos asociado a una elevada concentración de NKG2DL en plasma de pacientes con COVID-19 grave (54).

2.3 Alteraciones metabólicas de las células NK en COVID-19

Investigaciones recientes han resaltado el papel fundamental del metabolismo celular en la regulación de la función de las células inmunitarias (67–70). En las células NK la activación celular induce cambios metabólicos específicos destinados a satisfacer las demandas energéticas asociadas a sus funciones efectoras. Un enfoque en el estudio del metabolismo celular consiste en evaluar la expresión de genes reguladores de distintas vías metabólicas, conocidos como “sensores metabólicos”. Entre estos se incluyen SIRT1, AMPK, HIF1A y GLUT1.

A la fecha, no se han realizado estudios que evalúen específicamente la expresión de estos genes en células NK. Sin embargo, la limitada evidencia disponible, proveniente principalmente de estudios en células mononucleares de sangre periférica (CMNs) o en modelos *in vitro*, ha arrojado resultados contradictorios. Zhang et al. sugieren que SIRT1 inhibe la replicación del SARS-CoV-2 y regula positivamente mecanismos antioxidantes (71). En contraste, Marius Walter y colaboradores demostraron que la deficiencia o inhibición farmacológica de SIRT1 reduce significativamente la replicación del SARS-CoV-2 en células A549-ACE2 (72). Una mayor expresión de HIF1A fue reportada en CMNs de pacientes con COVID-19 (73–75), y esta puede favorecer la replicación viral e inducir la producción de IL-6, IL-1 β e IFN- β (74).

Por lo tanto, a la fecha existe controversia del perfil de células NK asociado con la gravedad de la enfermedad. Debido a esto, el presente estudio se centró en evaluar el perfil de activación de células NK en pacientes con infección grave por SARS-CoV-2, y su asociación con la progresión clínica de los pacientes. Esto aportará conocimiento de los mecanismos que subyacen al deterioro inmunológico y funcional de pacientes con COVID-19 grave.

CAPITULO 3

JUSTIFICACIÓN

Durante las infecciones virales, las células NK desempeñan un papel importante en la eliminación del virus. En la pandemia de COVID-19 estudios han reportado alteraciones inmunológicas asociadas a la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, existe controversia respecto al estado funcional de células NK. Dado lo anterior, el presente estudio evaluó el perfil de activación de células NK asociados a la progresión clínica y desenlace de los pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.

CAPITULO 4

HIPÓTESIS

El perfil de células NK activadas se relaciona con el desenlace clínico de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.

CAPITULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar el perfil de activación de células NK en pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.

5.2 Objetivos Específicos

1. Cuantificar el número de linfocitos T, linfocitos B y células NK en sangre periférica de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.
2. Evaluar marcadores de activación e inhibición de células NK en sangre periférica de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.
3. Analizar la expresión relativa de genes asociados al metabolismo e inflamación en células NK obtenidas de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.
4. Determinar los niveles de citocinas en plasma de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2.

CAPITULO 6

ESTRATEGIA GENERAL

La realización de este estudio requirió la toma de una muestra de sangre venosa periférica en 3 tiempos: al ingreso hospitalario (día 0), al día 3 y al día 10 de estancia hospitalaria. La muestra sanguínea se fraccionó para evaluar los distintos parámetros. Para la cuantificación de citocinas se requirió 1 mL de plasma, obtenido de 2 mL de sangre entera. Para los ensayos de fenotipo de superficie y cuantificación de poblaciones celulares se requirió de 1 mL de sangre entera. Para medir la actividad transcripcional de células NK se llevó a cabo la metodología de separación y purificación de células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad, para posteriormente realizar la purificación de células NK empleando perlas magnéticas. Este paso fue imprescindible debido a que el número de células NK en circulación es relativamente bajo (representan el 10% de células mononucleares de sangre periférica), de esta manera aseguramos una cantidad y pureza adecuada para los experimentos posteriores (figura 1).

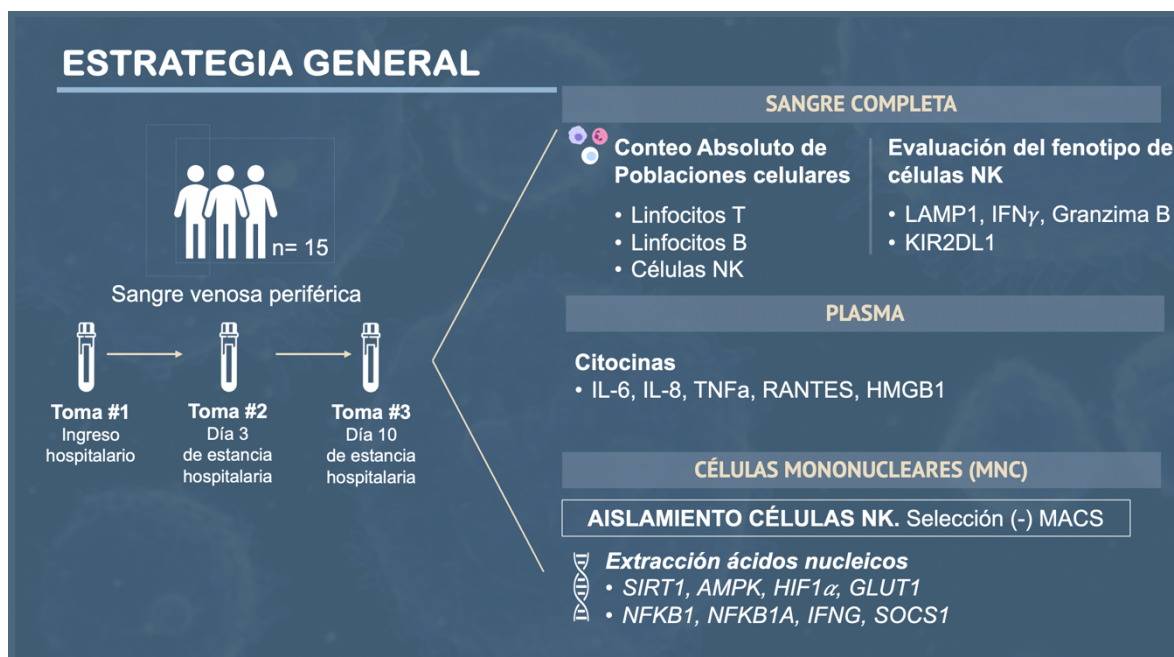


Figura 7. Esquema de la estrategia general del proyecto.

CAPITULO 7

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño de estudio

Estudio de tipo comparativo, prospectivo, longitudinal y observacional.

7.2 Población de estudio

Pacientes conscientes ingresados a la unidad de COVID-19 de la HAEMA (Hospital de Alta Especialidad y Medicina Avanzada), con diagnóstico de infección grave por SARS-CoV-2. Con fines comparativos, se incluyó un grupo control conformado por diez participantes sanos, homologado en cuanto a características como edad y sexo con los pacientes del estudio.

7.3 Tipo de muestreo

Muestreo no probabilístico por conveniencia

7.4 Criterios de selección

Grupo de estudio (Infección por SARS-CoV-2)

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años de edad, sexo indistinto.
- Ingreso a la unidad de COVID-19 de la HAEMA con infección grave por SARS-CoV-2 (presencia de falla respiratoria con $pO_2 < 80\text{mmHg}$ ó $pCO_2 < 35\text{mmHg}$ ó PaO_2/FiO_2 ratio $< 200\text{mmHg}$).
- Pacientes que acepten participar en este estudio.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con infección por VIH (la infección por el virus del VIH puede ocasionar cambios en la cantidad de leucocitos en sangre).
- Pacientes con otras infecciones virales (influenza A, rinovirus, sincitial respiratorio, entre otros).
- Pacientes con tratamientos inmunosupresores crónicos previos (pacientes postransplantados, reumatológicos, oncológicos, enfermedades hematológicas, entre otros).

Criterios de eliminación:

- Sujetos en los que las muestras obtenidas se degraden y no sea posible su procesamiento.
- Pacientes a los que no sea posible medir las variables de interés.
- Pacientes que retiren su consentimiento verbal para participar en el estudio.

Grupo control

Criterios de inclusión:

- Sujetos con prueba negativa para SARS-CoV-2
- Sujetos mayores de 18 años de edad, sexo indistinto
- Sujetos que acepten participar en este estudio

Criterios de exclusión:

- Sujetos con proceso infeccioso en curso (infección por VIH, tuberculosis, influenza, etc.) que pueda alterar la respuesta inmunológica.
- Sujetos con tratamientos inmunosupresores crónicos

- Sujetos en tratamiento farmacológico para enfermedades metabólicas (diabetes, hipertensión, obesidad, entre otras).

Criterios de eliminación:

- Sujetos en los que las muestras obtenidas se degraden y no sea posible su procesamiento.
- Sujetos a los que no sea posible medir las variables de interés.
- Sujetos que retiren su consentimiento verbal para participar en el estudio.

7.5 Consentimiento informado

Se le explicó de forma verbal al paciente y a un familiar los detalles del estudio, utilizando un lenguaje sencillo libre de tecnicismos que puedan generar confusión. Se realizó hincapié en la necesidad de evaluar 3 muestras de sangre: al ingreso hospitalario, al día 3 y 10 de estancia hospitalaria, éstas muestras fueron tomadas por el personal capacitado del área de infectología. La participación en el estudio fue totalmente voluntaria y la negativa a participar en el mismo no afectó en modo alguno el tratamiento médico que llevó el paciente en su estancia hospitalaria.

Toda la información proporcionada por el participante fue de carácter estrictamente confidencial, el participante fue identificado(a) con un número y no con su nombre en las carpetas correspondientes las cuales permanecieron resguardadas en el departamento de inmunología en donde podían ser consultadas por el sujeto de investigación. Los resultados obtenidos en este estudio son empleados solamente con fines científicos, manteniendo total confidencialidad del participante. Este

protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León con el número de registro IN21-00002.

7.6 Análisis de poblaciones celulares

Se empleó citometría de flujo convencional para el análisis de los siguientes parámetros: recuento absoluto de linfocitos, expresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8⁺ y expresión de marcadores de activación e inhibición en células NK, en muestras de sangre venosa periférica de pacientes con COVID-19 grave.

7.6.1 Recuento Absoluto de Linfocitos

El recuento absoluto de linfocitos se determinó utilizando tubos TruCount (BD Biosciences, #cat: 663028) y la tinción BD Multitest™ 6-Color TBNK (BD Biosciences, #cat: 662967), tabla 1. Brevemente, se incubaron 50 µL de sangre periférica anticoagulada con 20 µL del reactivo TBNK en un tubo TruCount.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en el recuento absoluto de linfocitos.

Anticuerpo	Fluorocromos	Compañía
Multitest 6-color TBNK reagent	CD3-FITC	BD Biosciences
	CD16/CD56-PE	
	CD45-PerCP-Cy5.5	
	CD4-PE-Cy7	
	CD19-APC	
	CD8-APC-Cy7	

Las muestras fueron adquiridas y analizadas conforme a la estrategia descrita en la figura 2; Brevemente, se identificaron las células CD45+ (leucocitos) y, con base en su morfología, se seleccionó la población de linfocitos. A partir de esta población, se distinguieron las células CD3+ y CD3-. Dentro de las células CD3+ se identificaron las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+, mientras que en las células CD3- se identificaron las células CD19+ (linfocitos B) y CD16/56+ (células NK). El número absoluto de poblaciones celulares se calculó siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando como referencia el número conocido de perlas fluorescentes contenido en cada tubo.

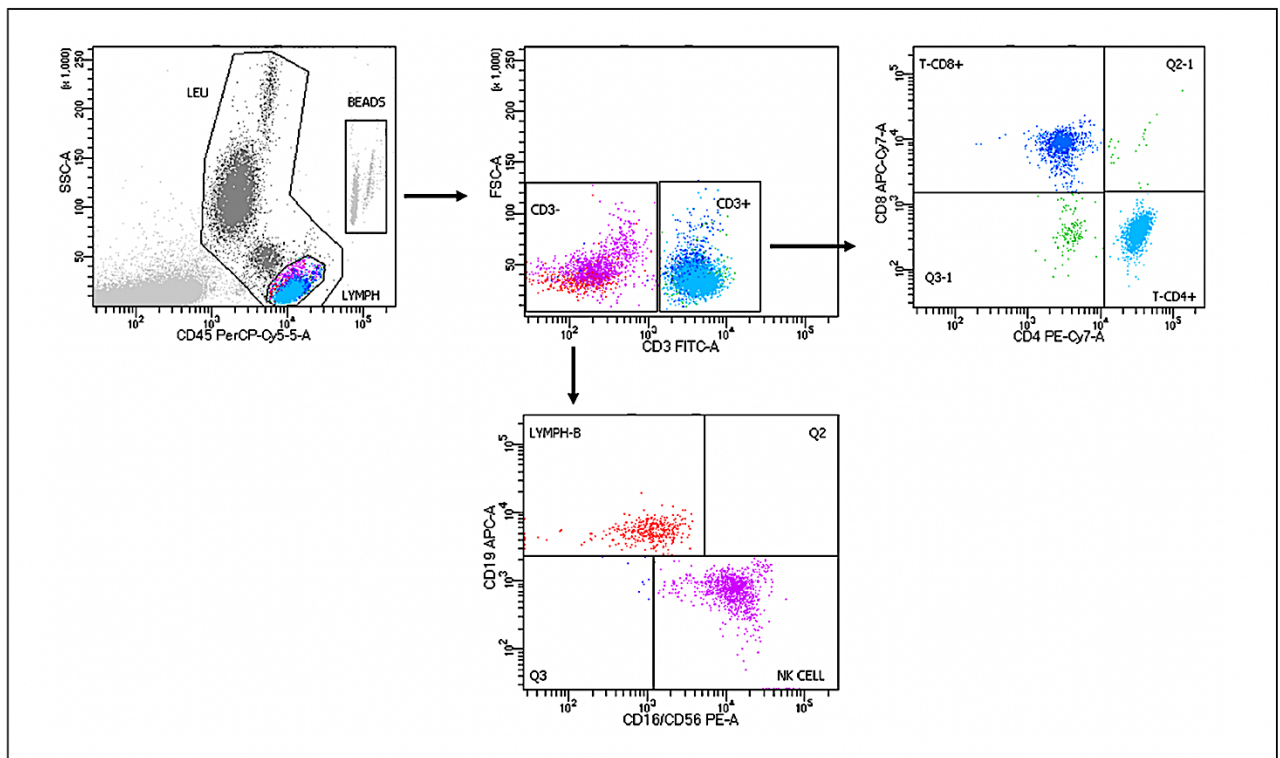


Figura 8. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el recuento absoluto de linfocitos de sangre periférica.

7.6.2 Expresión de Receptores Inhibidores en Linfocitos T CD8⁺

La expresión de los receptores inhibidores PD-1, TIM-3 y LAG-3 en linfocitos T CD8⁺ se evaluó a partir de 100 µL de sangre periférica anticoagulada. La tinción se realizó utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos específicos: anti-CD8, anti-PD-1, anti-LAG-3 y anti-TIM-3, tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos empleados en análisis de la expresión de receptores inhibidores en linfocitos T-CD8⁺.

Anticuerpos	Clona	Fluorocromos	Compañía
Mouse Anti-Human CD8	SK1	APC/Cyanine7	Thermo Fisher Scientific
Mouse Anti-Human CD279 (PD-1)	MIH4	PE	BD Bioscience
Mouse Anti-Human CD366 TIM-3	7D3	Alexa Fluor 647	BD Bioscience
Mouse Anti-Human CD223 LAG-3	T47-530	PE-CF594	BD Bioscience
Mouse Anti-Human Granzyme B	GB11	PE	BD Bioscience

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, protegidas de la luz. Finalizada la tinción, se procedió a la adquisición y análisis de los datos conforme a

la estrategia ilustrada en la figura 3. Brevemente, a partir de parámetros morfológicos se identificó la población de linfocitos, de esta población se identificaron las células CD8+. Una vez identificada esta población se procedió al análisis de la expresión de los receptores inhibidores y granzima B.

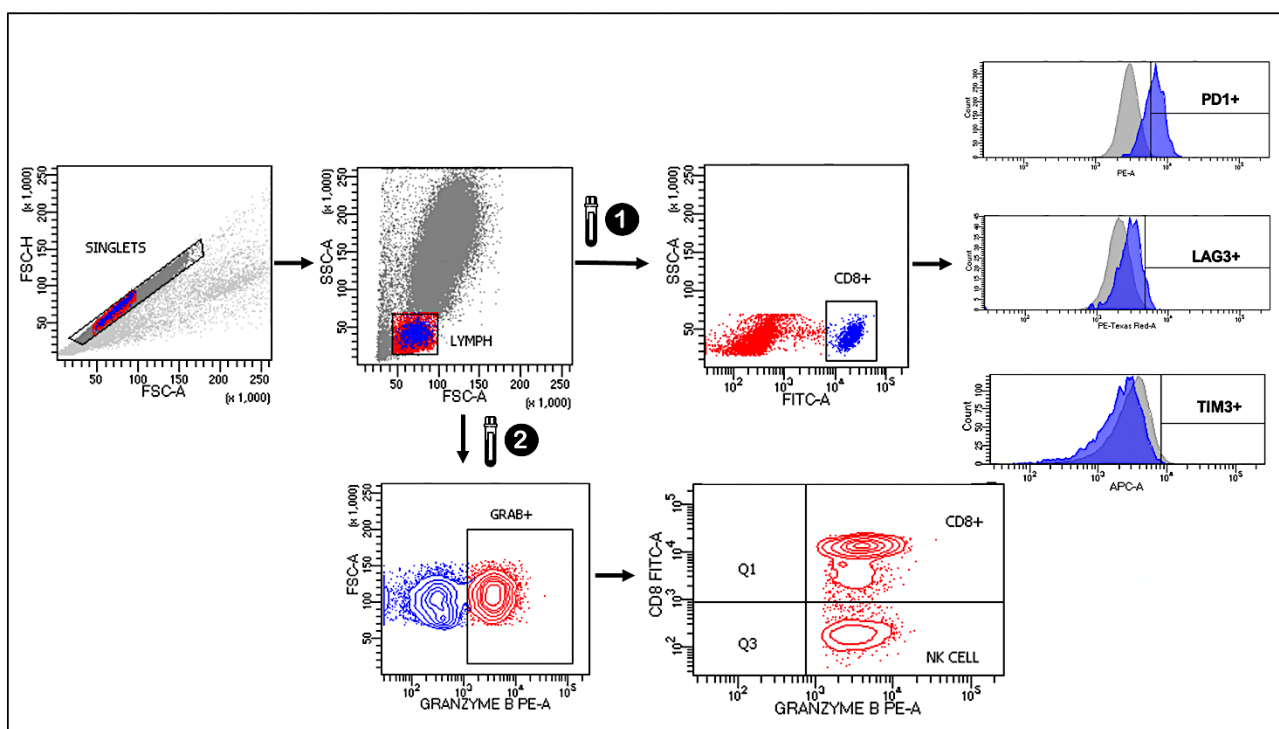


Figura 9. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el análisis de expresión de receptores inhibidores en linfocitos T-CD8+. En los histogramas se muestra la expresión de los marcadores evaluados en donde, de color gris se expresa el control de fluorescencia menos uno (FMO), y en color azul, los linfocitos T-CD8+ de la muestra de interés.

7.6.3 Fenotipo de células NK

Se analizó la expresión de los marcadores de activación LAMP-1 (CD107a), IFN- γ y granzima B, así como del marcador inhibidor KIR2DL1 en células NK provenientes de pacientes con COVID-19 grave. Se utilizaron 100 μ L de sangre periférica anticoagulada, y la tinción se realizó con anticuerpos específicos: anti-CD3, anti-CD56/16, anti-CD107a, anti-KIR2DL1, anti-IFN- γ y anti-granzima B, incubando durante 30 minutos a 4 °C, protegidos de la luz. Las tinciones extracelulares (CD107a y KIR2DL1) se realizaron en primera instancia, seguidas por las tinciones intracelulares (IFN- γ y granzima B), previa permeabilización celular utilizando el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, #cat: 554714), tabla 3. La estrategia de análisis de citometría empleada se muestra en la figura 4.

Tabla 3. Anticuerpos empleado para citometría de flujo.

Anticuerpos	Clona	Fluorocromos	Compañía
BD simultest CD3/CD16+CD56		FITC/PE	BD Bioscience
Mouse Anti-Human CD107a (LAMP1)	H4A3	Pacific Blue	BD Bioscience
Mouse Anti-Human CD158a (KIR2DL1)	HP-3E4	APC	BD Bioscience
Mouse Anti-Human IFN- γ	B27	Brilliant Violet 605	BD Bioscience
Mouse Anti-Human Granzyme B	GB11	PE	BD Bioscience
Mouse Anti-Human CD8	SK1	APC-CY7	BD Bioscience

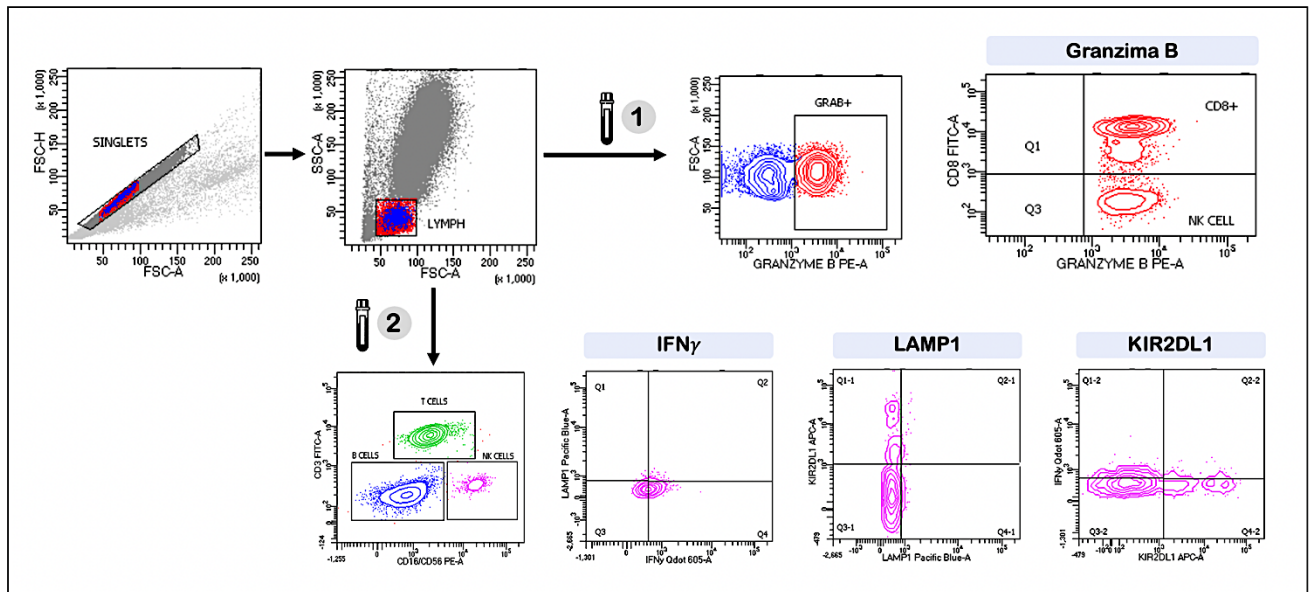


Figura 10. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el análisis de expresión de marcadores de activación en células NK.

7.6.4 Adquisición y análisis de muestras por citometría de flujo

Después de realizar las tinciones respectivas de cada análisis, se procedió con la lisis de eritrocitos mediante la adición de 450 μ L de solución FACS Lysing Solution 1X (BD Biosciences, #cat: 349202), incubando durante 15 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS para eliminar el exceso de solución de lisis.

La adquisición de los eventos celulares se llevó a cabo en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences), recolectando un mínimo de 5,000 eventos por muestra. El análisis de datos se efectuó utilizando el software FACSDiva v8.0 (BD Biosciences). La fluorescencia específica se determinó empleando controles FMO (fluorescence minus one) para cada marcador analizado.

7.7 Aislamiento de células NK de sangre periférica

El aislamiento de células NK altamente puras se realizó mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) a partir de células mononucleares (CMN) de sangre periférica. Brevemente, se aislaron CMN por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque™ Plus (Cytiva), el cual tiene una densidad intermedia entre eritrocitos y células nucleadas circulantes, permitiendo la separación de estas últimas. El protocolo de separación fue el siguiente: en tubos de 15 mL se agregaron 4 mL de Ficoll frío + 10 mL de sangre diluida 1:2 con PBS, evitando la mezcla de fases. Posteriormente se centrifugó a 1,800 rpm durante 30 minutos a 4°C, con aceleración y desaceleración lenta, para obtener un anillo de CMN en la interfaz entre Ficoll y plasma.

Una vez obtenidas las CMN se incubaron con un cóctel de anticuerpos durante 5 minutos a 4°C. Después, se añadió el cóctel de microperlas, se mezcló suavemente y se incubó durante 10 minutos más a 4°C. Posteriormente, la suspensión se pasó a través de columnas MS (Miltenyi Biotec) colocadas sobre una base magnética, donde las células marcadas permanecieron adheridas a la columna, mientras que las células NK pudieron pasar. La pureza de las células NK aisladas se evaluó mediante citometría de flujo, obteniéndose purezas superiores al 90%.

7.8 Evaluación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos

La evaluación de la expresión génica se realizó en células mononucleares (CMN) y células NK aisladas en pacientes con infección grave por SARS-CoV-2 y sujetos sanos como el grupo control.

La extracción de RNA fue realizada por la técnica de Trizol-Cloroformo (applied biosystems). Para el paso de retrotranscripción se utilizó High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, #cat: 4374967). La expresión de los genes inflamatorios (*NFKB1*, *NFKB1A*, *SOCS1* y *IFNY*) se realizó por la metodología de sondas TaqMan (ver tabla 4) y utilizando iQ supermix (Biorad).

Tabla 4. Sondas Taqman empleados en la expresión de genes inflamatorios.

Gen	Sondas Taqman	Catálogo.
<i>IFNG</i>	Hs00989291_m1	4331182
<i>SOCS1</i>	Hs00705164_s1	4331182
<i>NF-kB1</i>	Hs00765730_m1	4331182
<i>NF-kB1A</i>	Hs00355671_g1	4331182

Por otro lado, la expresión de genes metabólicos (*AMPK*, *SIRT1*, *PGC1a*, *HIF1A* y *GLUT1*) se llevo a cabo empleando SYBR Green PCR Master Mix (applied biosystems, #cat: 4309155), ver tabla 5. Los resultados fueron normalizados empleando con el control endógeno (*GAPDH*). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el metodo de Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre los grupos de interés.

Tabla 5. Secuencias de primers empleados en la expresión de genes metabólicos.

Gene	Primers	Ref.
<i>AMPKA1</i>	F: 5'AGGAAGAATCCTGTGACAAGCAC R: 5'CCGATCTCTGTGGAGTAGCAGT	(76–80)
<i>SIRT1</i>	F: 5'AATCCAGTCATTAAAGGTCTACAA R: 5'TAGGACCATTACTGCCAGAGG	(81–83)
<i>GLUT1</i>	F: 5'TATGTGGAGCAACTGTGTGGT R: 5'TCCGGCCTTTAGTCTCAGGA	(13)
<i>HIF1A</i>	F: 5'CAAGAACCTACTGCTAATGC R: 5'TTATGTATGTGGGTAGGAGATG	(14,15)
<i>GAPDH</i>	F: 5'GACAGTCAGCCGCATCTTCT R: 5'AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	(16,17,18)

7.9 Cuantificación de citocinas plasmáticas

De la muestra de sangre venosa periférica, se obtuvo el plasma por centrifugación durante 10 minutos a 2,000 rpm y se almacenó en alícuotas a -80°C para su posterior análisis. Una vez obtenidos todas las muestra se analizó la concentración de las citocinas interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 15 (IL-15), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10) y RANTES se evaluaron por inmunoensayo múltiple LUMINEX (ThermoFisher Scientific Inc), según las

instrucciones del fabricante. El análisis de las placas se realizó en Bio-Plex 200 mediante el software Bio-Plex Manager y Data Pro tomando en cuenta los límites de detección y cuantificación para cada citocina, ver tabla 6.

Tabla 6. Límites de detección y cuantificación de citocinas.

Analito	Límite de detección (pg/mL)	Límite de cuantificación (pg/mL)
IL-6	5,823	0.36
IL-1 β	4,988	0.25
IL-15	319,328	19.49
IL-8	15,080	0.92
IL-10	17,897	1.09
RANTES	15,709	0.96

Mientras las citocinas TNF- α , IFN- γ , HMGB1 e interleucina-2 (IL-2) fueron evaluadas mediante inmunoensayo E.L.I.S.A. tipo sandwich siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7.10 Análisis estadísticos

Una vez obtenidos los datos, se procedió a la captura de las variables de interés y a la verificación de la calidad de la base de datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism, versión 9. En primer lugar, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos. Los valores descriptivos de tendencia central y dispersión se seleccionaron según el tipo de distribución observada.

Para la comparación entre dos grupos, se empleó la prueba *t* de Student en el caso de datos con distribución paramétrica, y la prueba *U* de Mann-Whitney para datos no paramétricos. En las comparaciones entre más de dos grupos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para datos paramétricos o la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Las correlaciones entre variables cuantitativas se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según correspondiera a datos paramétricos o no paramétricos, respectivamente. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS

8.1 Pacientes con COVID-19 grave presentan linfopenia

Después de obtener una muestra de sangre periférica de los participantes, se evaluó su perfil hematológico mediante el análisis de biometría hemática. Los resultados fueron comparados entre pacientes con COVID-19 grave al ingreso hospitalario (día 0) y el grupo control. Se observó un incremento significativo de la población de leucocitos en pacientes con COVID-19 grave (1.9 veces más alto, $P<0.05$), atribuido principalmente al incremento de neutrófilos (2.7 veces más alto, $P<0.05$) en sangre periférica. Además observamos la disminución del porcentaje de linfocitos totales en sangre periférica de pacientes con COVID-19 grave (2.6 veces menor, $P<0.05$) comparado con el grupo control, tabla 7.

Tabla 7. Perfil hematológico de los participantes.

<i>Variable</i>	<i>Controles n=5</i>	<i>COVID-19 n=16</i>	<i>Unidades</i>	<i>P</i>
Leucocitos	5.65 ±0.47	10.79 ±0.98	10 ³ /μl	0.0002
Neutrófilos	3.29 ±0.49	8.90 ±0.90	10 ³ /μl	0.00001
% Neutrófilos	57.84 ±5.84	81.10 ±2.66	%	0.0007
Linfocitos	1.73 ±0.33	1.12 ±0.12	10 ³ /μl	0.040
% Linfocitos	31.02 ±5.8	11.7 ±1.7	%	0.0004
Monocitos	0.44 ±0.03	0.62 ±0.09	10 ³ /μl	0.291

% Monocitos	7.84 ±0.48	6.03 ±0.90	%	0.094
Eosinófilos	0.17 ±0.03	0.011 ±0.034	10 ³ /μl	0.009
% Eosinófilos	2.74 ±0.41	0.55 ±0.29	%	0.001
Basófilos	0.03 0.001	0.05 ±0.01	10 ³ /μl	0.201
% Basófilos	0.56 ±0.14	0.49 ±0.08	%	0.705

*Datos expresados como media ±DE. Prueba estadística t de Student.

8.2 Alteración de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica en pacientes con COVID-19 grave.

Para evaluar directamente la homeostasis en subpoblaciones de linfocitos, analizamos el número absoluto de linfocitos totales y las subpoblaciones de linfocitos B, linfocitos T-CD4+, linfocitos T-CD8+ y células NK de sangre periférica de pacientes con COVID-19 grave empleando la metodología de citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 11B, estos pacientes presentaron una disminución significativa de los linfocitos totales (mediana= 727.4 células/μL, IQR= 416.7) en comparación con el grupo de control (mediana= 1.095 células/μL, IQR= 218.5) ($P < 0.01$). Al evaluar las subpoblaciones de linfocitos, observamos una reducción significativa en la población de linfocitos T-CD4+ (1.76 veces menor, $P < 0.01$) (Figura 11D), los linfocitos T-CD8+ (1.63 veces menor, $P < 0.05$) (Figura 11E) y las células NK (1.5 veces menor, $P < 0.05$) en comparación con el grupo control, figura

11F. Por el contrario, la subpoblación de linfocitos B no mostró diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$) (Figura 11C).

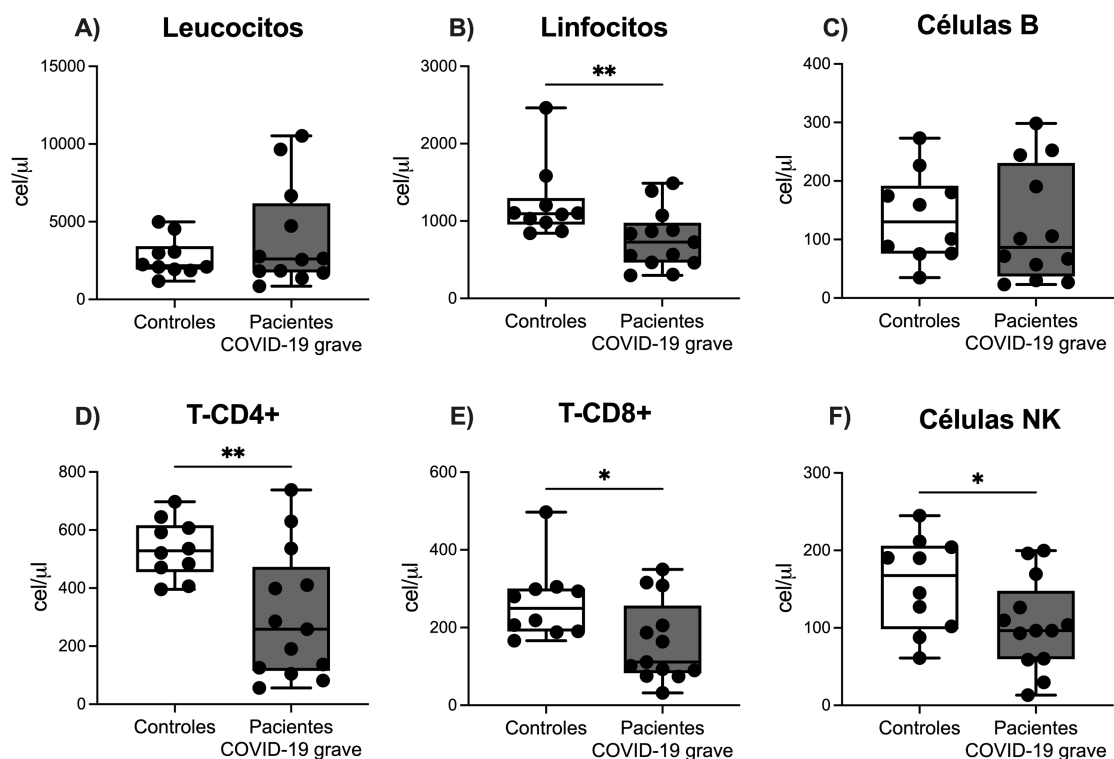


Figura 11. Recuento absoluto de leucocitos en sangre periférica de pacientes con COVID-19 grave y grupo control.

Número absoluto de (A) leucocitos totales, (B) linfocitos totales, (C) células B, (D) linfocitos T CD4+, (E) linfocitos T CD8+ y (F) células NK en pacientes con COVID-19 grave en comparación con el grupo control. Prueba U de Mann-Whitney, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. Grupo control ($n = 10$), pacientes con COVID-19 grave ($n = 13$).

8.3 Sobreexpresión de los receptores inhibidores TIM-3 y PD-1 en células T CD8⁺ de pacientes con COVID-19 grave.

Después de observar la reducción de linfocitos T-CD8⁺ en pacientes con COVID-19 grave se decidió evaluar la expresión de receptores inhibidores (TIM-3, LAG-3 y PD-1) y un marcador de activación (granzima B) en esta población celular por citometría de flujo. El porcentaje de células T-CD8⁺ positivas para TIM-3 fue significativamente mayor en los pacientes con COVID-19 grave (mediana= 21.3; IQR= 29.8) en comparación con el grupo de control (mediana= 0.55; IQR = 2,5; $P < 0,05$), figura 12A. La IMF de TIM-3 en células T-CD8⁺ fue mayor en los pacientes con COVID-19 grave (mediana= 2,894; IQR= 4,425) comparado con el grupo de control (mediana= 640; IQR= 641,7; $P < 0.05$), figura 12A. El porcentaje de células T-CD8⁺ positivas para LAG-3 y PD-1 fue similar entre los pacientes y el grupo de control, ver figura 12 B-C. Sin embargo, la IMF de PD-1 fue mayor en las células T-CD8⁺ de los pacientes con COVID-19 grave (mediana= 4,746; IQR= 2,253) que en el grupo de control (mediana = 2,792; IQR = 2,767; $P < 0.05$) (Figura 12C). Estos hallazgos indican una mayor expresión de marcadores inhibidores (TIM-3 y PD-1) en las células T-CD8⁺ de pacientes con COVID-19 grave. Adicionalmente, se evaluó la expresión de granzima B como un marcador de activación de células T-CD8⁺. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de células T-CD8⁺ positivas para granzima B entre los pacientes con COVID-19 grave (mediana= 48.2%; IQR= 37.4) y los controles sanos (mediana= 69.85%; IQR= 32.17), figura 12D. Asimismo, la IMF de la granzima B en células T-CD8⁺ no difirió

significativamente entre pacientes con COVID-19 grave (mediana= 12,760; IQR= 15,775) y el grupo control (mediana= 8,896; IQR= 6,398), figura 12D.

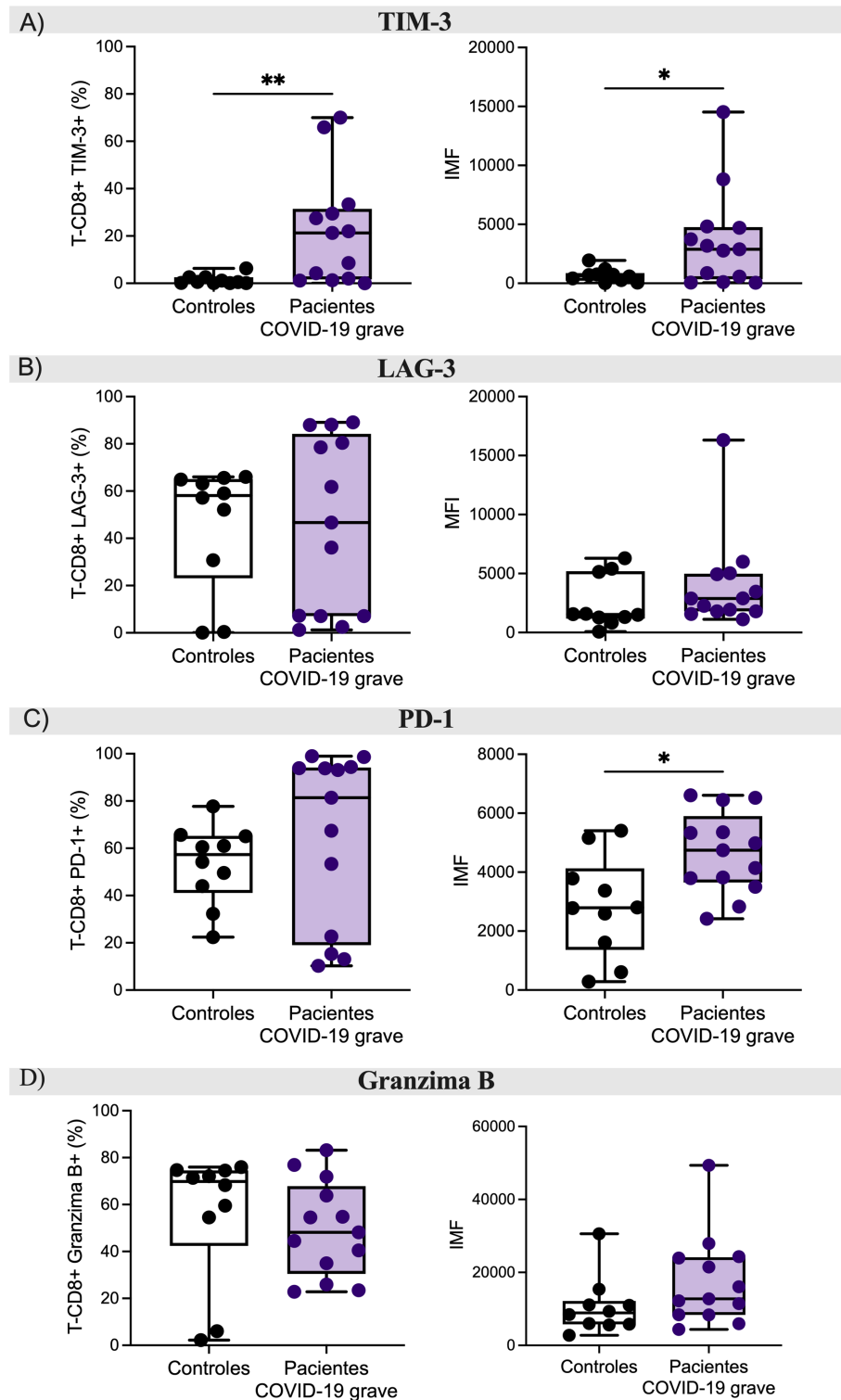


Figura 12. Expresión de receptores inhibidores en células T-CD8+.

Análisis de la expresión de receptores inhibidores TIM-3 (A), LAG-3 (B) y PD-1 (C), y el marcador de activación granzima B (D) en células T CD8+ de sangre periférica en pacientes con COVID-19 grave en comparación con el grupo de control. IMF (Intensidad media de Fluorescencia). Prueba U de Mann-Whitney, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Grupo de control ($n = 10$), pacientes con COVID-19 grave ($n = 13$).

8.4 Reducción del porcentaje de linfocitos T-CD8+ PD-1+ en pacientes con COVID-19 grave intubados y casos con desenlace fatal.

Tras analizar la expresión de marcadores inhibidores en linfocitos T-CD8+, evaluamos si sus niveles de expresión se asociaban con la gravedad de la enfermedad, en función características clínicas: duración de la estancia hospitalaria (<7 días o ≥ 7 días), soporte ventilatorio (invasivo o no invasivo) y evolución del paciente (mejoría o muerte).

Los resultados obtenidos revelan una expresión de PD-1 significativamente menor en los pacientes con asistencia ventilatoria invasiva (intubados) (mediana= 15.3%, IQR= 9,6) en comparación con pacientes que recibían asistencia no invasiva mediante cánula nasal (mediana= 93.8%, IQR= 16.2; $P < 0.05$), figura 13B. Del mismo modo, los pacientes que fallecieron tenían una expresión de PD-1 significativamente menor (mediana= 22.7%, IQR= 54.3) comparado con los pacientes dados de alta por mejoría médica (mediana= 93.8%, IQR= 23.2; $P < 0.05$), figura 13C.

Estos hallazgos sugieren que la expresión de PD-1 en los linfocitos T-CD8+ puede estar asociada a mejores resultados clínicos en pacientes con COVID-19 grave. Otros receptores inhibidores evaluados (TIM-3 y LAG-3) no mostraron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$), figura 13.

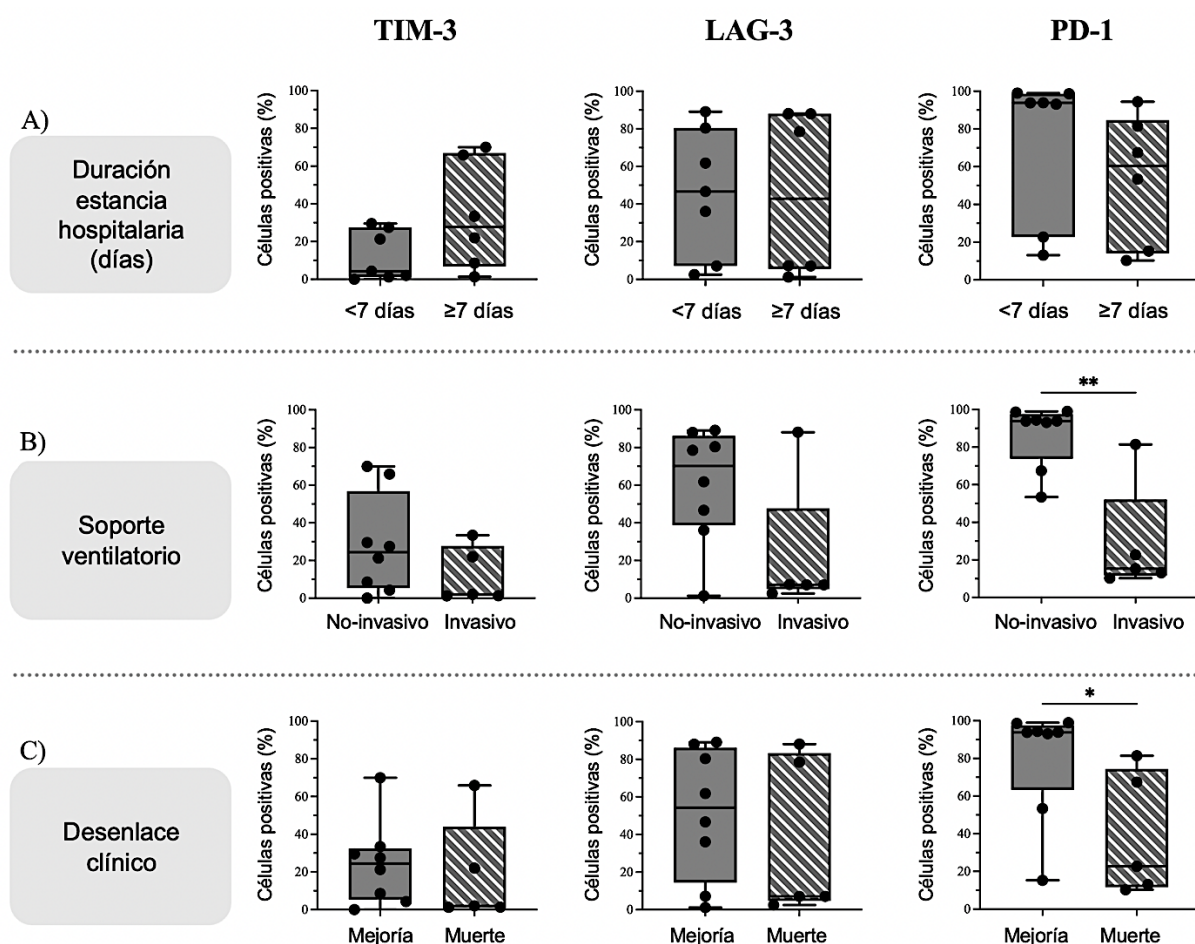


Figura 13. Expresión de receptores inhibidores en células T CD8+ y desenlace clínicos de pacientes con COVID-19 grave.

Expresión de TIM-3, LAG-3 y PD-1 en relación con (A) estancias hospitalarias cortas y largas, (B) necesidad de soporte ventilatorio invasivo o no invasivo y (C) desenlace clínicos (alta hospitalaria o muerte). Análisis estadístico: Prueba U de Mann-Whitney ($n = 13$), $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

Además, evaluamos la expresión de granzima B en células T-CD8+, un marcador de activación de linfocitos citotóxicos, y encontramos una correlación positiva significativa con la expresión de PD-1 ($P= 0.044$, $R^2= 0.326$), figura 14. Estos resultados sugieren que el incremento del marcador inhibidor PD-1 en pacientes con COVID-19 grave puede estar relacionada con un estado activado de las células T CD8+.

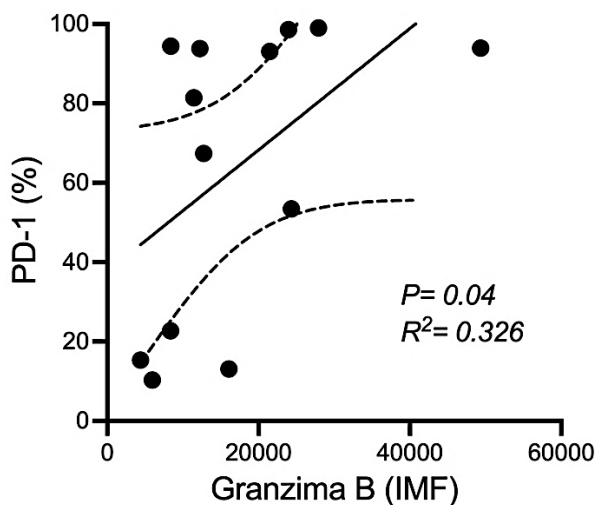
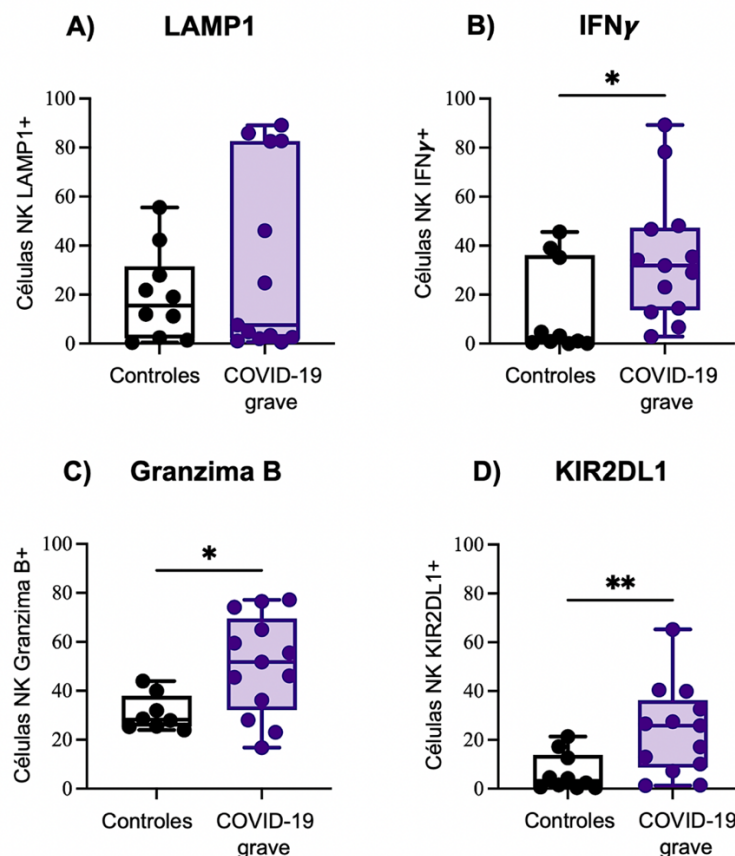


Figura 14. Correlación de granzima B y PD-1 en células T-CD8+ de pacientes con COVID-19 grave.

Análisis de correlación de la expresión de Granzima B y PD-1 en células T-CD8+ de pacientes con COVID-19 grave. Correlación de Spearman, $*P < 0.05$. Línea continua (—):regresión lineal, línea punteada (----): intervalos de confianza.

8.5 Mayor expresión de marcadores de activación en células NK de pacientes con COVID-19 grave.

Para evaluar el estado de activación de las células NK circulantes en pacientes con COVID-19 grave, analizamos la expresión de marcadores de activación (LAMP1, IFN- γ y granzima B) y el receptor inhibidor KIR2DL1 mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que los pacientes con COVID-19 grave presentan mayor porcentaje de células NK positivas a los marcadores de activación IFN- γ (31.9% [2.9-89.3]) y granzima B (51.8% [16.8-77.2]) en comparación con el grupo control (2.15% [0-45.6]; 28.2% [24-44], respectivamente), $P < 0.05$. Así como el receptor inhibidor KIR2DL1 (25.9% [1.3-65.2]) en comparación con el grupo control (3.30% [0.5-21.4]) al ingreso hospitalario ($P < 0,05$), ver figura 15.



Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores de activación en células NK de sangre periférica proveniente de pacientes con COVID-19 grave. Los marcadores de activación analizados incluyen LAMP1 (A), IFN- γ (B), y Granzima B (C); y KIR2DL1 (D) como marcador inhibidor. Análisis estadístico: prueba U de Mann-Whitney, controles (n= 10), pacientes con COVID-19 grave (n= 15); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

La expresión de marcadores de activación e inhibición en las células NK observadas al ingreso hospitalario (día 0) se mantuvieron estables durante toda la estancia

hospitalaria. No hubo diferencias significativas en los niveles de expresión en las muestras de sangre posteriores (días 3 y 10 de estancia hospitalaria), ver figura 16.

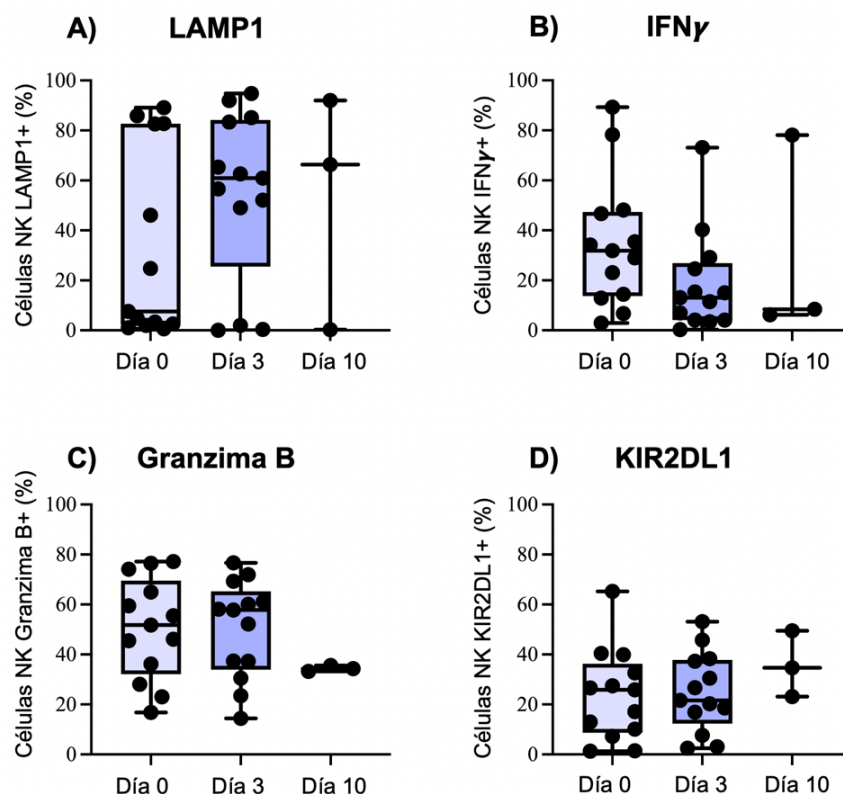


Figura 16. Dinámica en la expresión de marcadores de activación e inhibición en células NK a lo largo de la estancia hospitalaria.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores de activación en células NK de sangre periférica proveniente de pacientes con COVID-19 grave al ingreso hospitalario (día 0), día 3 y día 10 de estancia hospitalaria. Los marcadores de activación analizados incluyen LAMP1 (A), IFN- γ (B), y Granzima B (C); y KIR2DL1 (D) como marcador inhibidor. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis, posthoc Dunn's. Grupo control (n=10), pacientes con COVID-19 grave (n=15); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

8.6 La expresión de granzima B y LAMP1 en células NK se asocia con el desenlace clínico de pacientes con COVID-19 grave

Los pacientes hospitalizados durante más de 7 días presentaron un porcentaje significativamente menor de células NK positivas a granzima B (32.1% [16.8-77.2]) en comparación con los pacientes hospitalizados durante menos de 7 días (59.5% [46.1-76.5], $P < 0.05$), figura 17A. Los días de estancia hospitalaria se correlacionó significativamente con la expresión de LAMP1 ($P = 0.044$, $r = -0.493$) y granzima B ($P = 0.020$, $r = -0.579$), ver figura 17B-C. Además, los pacientes fallecidos mostraron un porcentaje significativamente menor de células NK positivas para granzima B (36.2% [16.8–65]) en comparación con los pacientes que mejoraron (57.5% [23.1–77.2]; $P < 0.05$). De igual manera, la expresión del marcador de degranulación LAMP1 también fue menor en los pacientes fallecidos (2.6% [1.1–7.6]) frente a aquellos que presentaron mejoría (64.35% [0.6–89.1]; $P < 0.05$).

Por el contrario, no se encontraron asociaciones entre la expresión de IFN- γ o KIR2DL1 y el desenlace clínico ($P > 0.05$), figura 17E. Estos hallazgos indican un fenotipo de células NK activadas en pacientes con COVID-19 grave, y los niveles elevados de LAMP1 y granzima B se asocian con un desenlace clínico favorable.

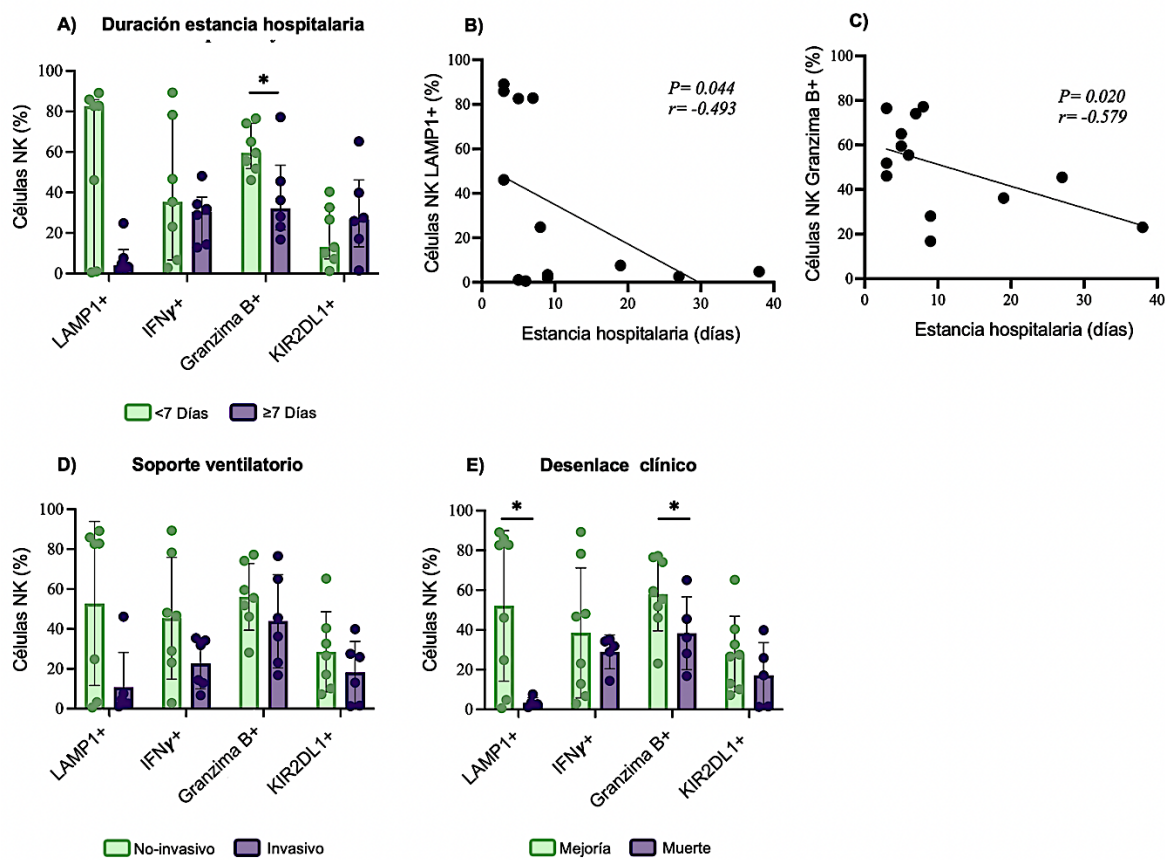


Figura 17. Asociación de la expresión de marcadores de activación e inhibición en células NK y el desenlace.

Evaluación de la asociación entre la expresión de marcadores de activación en células NK y el desenlace clínico de pacientes con COVID-19 grave en relación con (A-C) la duración de la estancia hospitalaria (corta o larga), (D) la necesidad de soporte ventilatorio (no-invasivo o invasivo), y (E) el desenlace clínico (mejoría o muerte). Análisis estadístico: prueba U de Mann-Whitney (panel A, D y E) y correlación de Spearman (panel B y C). Grupo control (n= 10), pacientes graves con COVID-19 (n= 15); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

8.7 Alteración en la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave

Exploramos la posible implicación de genes relacionados con la inflamación (NFKB1, IFNG, NFKB1A y SOCS1) en células NK de pacientes con COVID-19 grave. La expresión de *NFKB1*, un marcador característico de la activación de células NK, se incrementó significativamente en pacientes con COVID-19 grave, con un aumento de 11.3 veces (7.73 [0.86–47.18]) en comparación con el grupo control (0.68 [0.20–1.89]; $P < 0.05$). En cambio, para *IFNG*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con COVID-19 grave (1.44 [0–105.4]) y el grupo control (0.64 [0.07–24.93]; $P > 0.05$).

No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de los genes antiinflamatorios NFKB1A (inhibidor del factor de transcripción proinflamatorio NFKB1) y SOCS1 (supresor clave de la señalización de citocinas) entre los grupos ($P > 0.05$), ver figura 18A.

La activación celular desencadena la activación vías metabólicas que satisfacen las demandas energéticas necesarias para sus funciones efectoras. Para investigar los cambios metabólicos de células NK provenientes de pacientes con COVID-19 grave, analizamos la expresión de genes conocidos como «reguladores maestros del metabolismo», debido a que participan en la activación o inhibición de las principales vías metabólicas (glucólisis y fosforilación oxidativa). Este enfoque proporciona una amplia visión de las adaptaciones metabólicas que se producen en células NK durante la infección por SARS-CoV-2.

Como se muestra en la figura 18B, no se observaron diferencias significativas en la expresión de SIRT1 (1.14 [0.2-7.1]) o AMPK (1.51 [0.1-5.4]) en comparación con el grupo control (1.53 [0.06-14.1], 0.96 [0.39-2.74], respectivamente), $P > 0.05$. Por el contrario, la expresión de HIF1A fue 2.6 veces menor en las células NK de pacientes con COVID-19 grave (0.45 [0.07-1.35]) en comparación con el grupo control (1.17 [0.47-1.63], $P < 0.05$). Resultados similares fueron observados en la expresión de GLUT1; fue 2.7 veces menor en pacientes con COVID-19 grave (0.41 [0.09-2.62]) que en los controles (1.12 [0.39-2.45], $P < 0.05$), figura 18B.

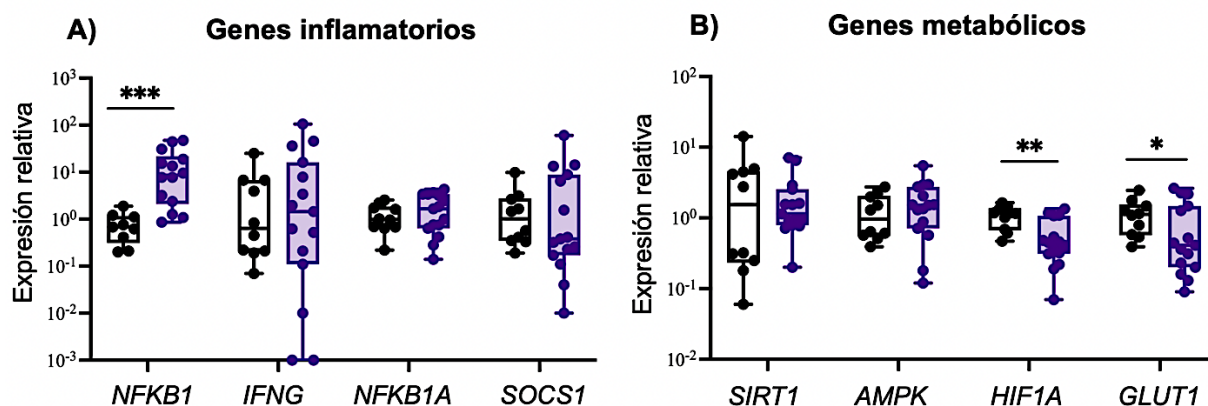


Figura 18. Niveles de expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave.

Niveles de expresión relativa de genes relacionados con y la inflamación (A) y el metabolismo (B) en células NK de pacientes con COVID-19 grave en comparación con controles sanos. Prueba U de Mann-Whitney. Controles (n= 10), pacientes con COVID-19 grave (n= 15); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La expresión de genes inflamatorios durante la estancia hospitalaria de pacientes con COVID-19 grave (día 3 y día 10 de estancia) reveló una disminución de NFKB1, así como de su inhibidor NFKB1A en el día 10 de hospitalización ($P < 0.05$, figura 19A), lo que puede indicar una reducción de la respuesta inflamatoria. Por el contrario, los niveles de expresión de SOCS1 e IFNG permanecieron estables a lo largo de la hospitalización ($P > 0.05$), figura 19A. Los niveles de expresión de SIRT1, AMPK, HIF1A y GLUT1 no mostraron diferencias significativas a lo largo de la estancia hospitalaria ($P > 0.05$, figura 19B).

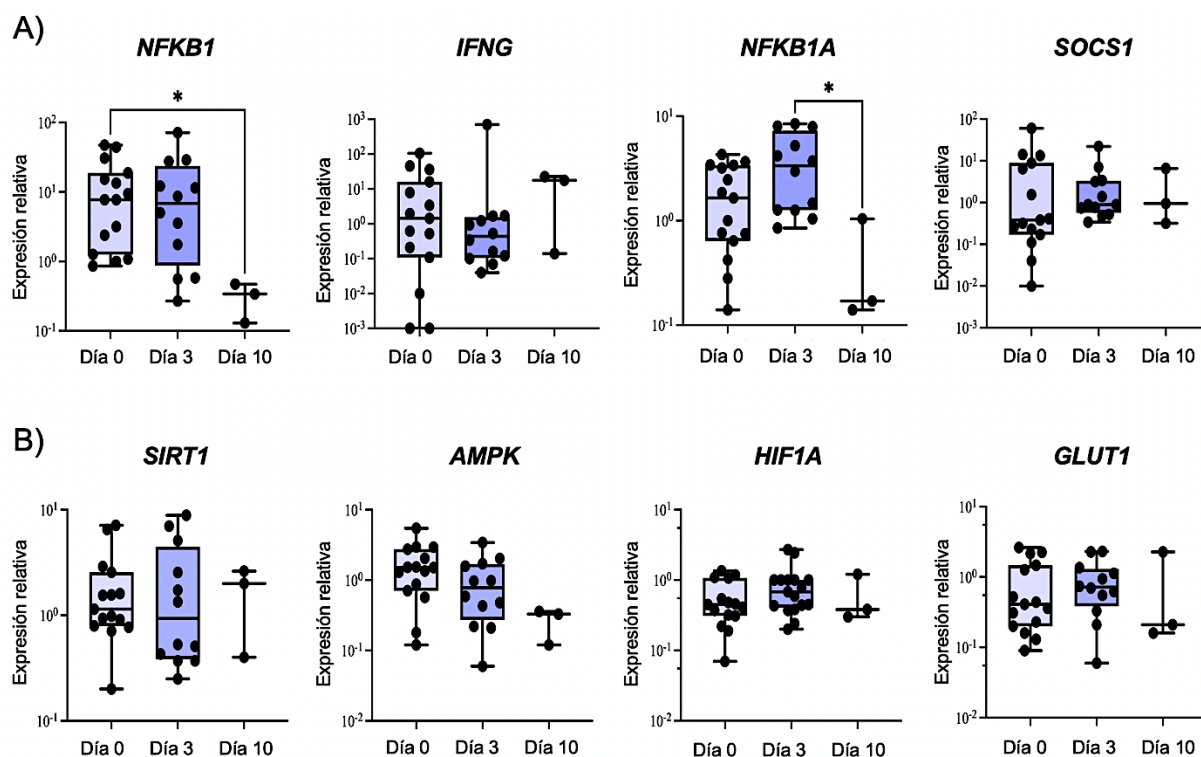


Figura 19. Dinámica en la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave.

(A) Expresión de genes inflamatorios —NFKB1, IFNG, NFKB1A y SOCS1—, y (B) metabólicos —SIRT1, AMPK, HIF1A y GLUT1— en células NK de pacientes con COVID-19 grave al ingreso hospitalario (día 0), los días 3 y 10 de hospitalización. Prueba de Kruskal-Wallis, post hoc de Dunn's. Día 0 (n= 15), día 3 (n= 12) y día 10 (n= 3).

Finalmente, se realizó un análisis de correlación para identificar posibles vínculos entre genes metabólicos e inflamatorios (figura 20). Nuestro análisis reveló una correlación positiva entre la expresión de AMPK y GLUT1 ($P= 0.002$, $r= 0.70$) y SOCS1 ($P= 0.02$, $r= 0.50$). También se observó una correlación positiva entre GLUT1 y la expresión de IFNG ($P= 0.007$, $r= 0.63$). La figura 21 ilustra las correlaciones significativas observadas entre los genes metabólicos e inflamatorios evaluados en este estudio.

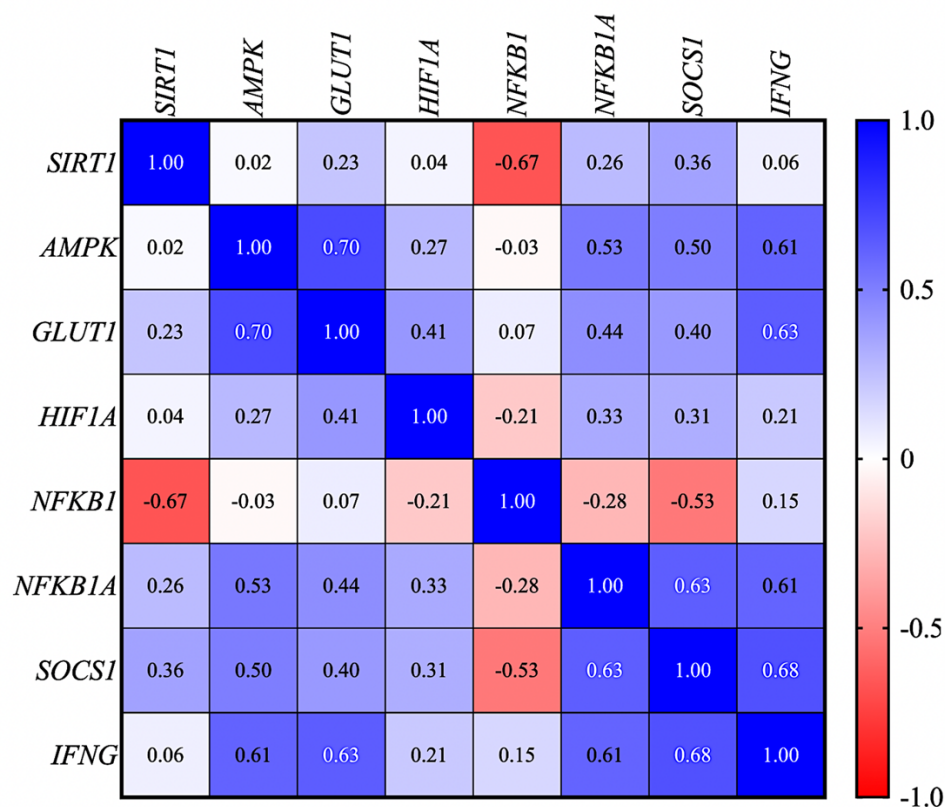


Figura 20. Correlación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave.

Mapa de calor que representa la matriz de correlación de la expresión de genes inflamatorios y en células NK de pacientes con COVID-19 grave. Correlación de Spearman. Controles (n= 10), pacientes con COVID-19 grave (n= 15).

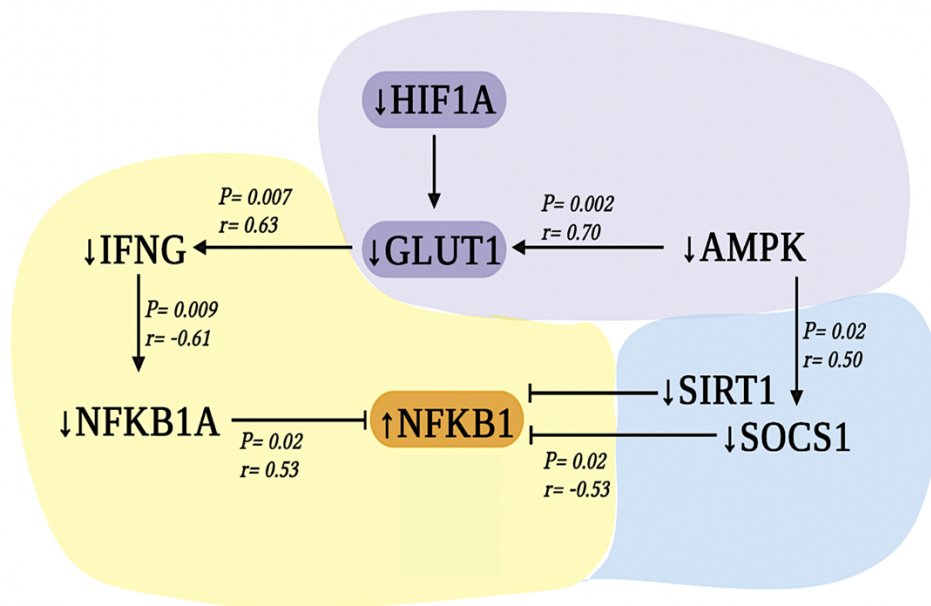


Figura 21. Relación entre la expresión de genes inflamatorios y metabólicos.

Representación esquemática de las correlaciones significativas identificadas entre la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de estos pacientes (B). Correlación de Spearman. Controles (n= 10), pacientes con COVID-19 grave (n= 15).

8.8 Sobreexpresión de genes metabólicos en células NK asociada a desenlaces fatales en COVID-19 grave.

Tras analizar la expresión de genes metabólicos e inflamatorios en células NK de pacientes con COVID-19 grave, evaluamos si su expresión estaba asociada a la gravedad de la enfermedad en función de tres características clínicas: duración de las estancias hospitalarias, necesidad de soporte ventilatorio invasivo o no invasivo y evolución del paciente (mejoría o muerte). Se observó una expresión

significativamente mayor de *HIF1A* (1.6 veces mayor; 0.54 [0.31–1.34]) en pacientes hospitalizados durante 7 días o más, en comparación con aquellos hospitalizados por menos de 7 días (0.33 [0.07–1.17]; $P < 0.05$). De manera similar, la expresión de *GLUT1* fue cinco veces mayor en los pacientes con hospitalización prolongada (1.47 [0.15–2.62]) frente al grupo con estancias más cortas (0.29 [0.09–1.26]; $P < 0.05$) (Figura 22A). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la expresión de genes relacionados con la inflamación ($P > 0.05$), figura 22B.

En cuanto al soporte ventilatorio, se observó una mayor expresión del gen metabólico *SIRT1* (2.3 veces mayor, 1.84 [0.7-7.1]) en células NK de pacientes con COVID-19 grave intubados en comparación con quienes recibieron soporte ventilatorio no invasivo (0.97 [0.2-2.8]), figura 22C.

Finalmente, se comparó la expresión de estos genes entre pacientes recuperados y fallecidos. Se observó una disminución en la expresión de *NFKB1* (3.4 veces menor) en los casos mortales (5.45 [1.08-13.45]) en comparación con los recuperados (18.7 [0.8-87.4]), $P < 0.05$, ver figura 22F. Estos hallazgos respaldan la relación entre una respuesta inflamatoria insuficiente y una evolución clínica desfavorable en pacientes con COVID-19 grave. Entre los genes metabólicos analizados, *SIRT1* mostró una sobreexpresión de 2.7 veces en pacientes graves (2.7 [0.9–7.1]) en comparación con los pacientes recuperados (0.97 [0.2–1.6]; $P < 0.05$). De igual forma, la expresión de *HIF1A* fue 2.5 veces mayor en pacientes graves (0.80 [0.4–1.3]) en comparación con los recuperados (0.31 [0.07–1.17]; $P < 0.05$). Asimismo, la expresión de *GLUT1* fue 4.2 veces mayor en pacientes

graves (0.95 [0.3–2.6]) frente al grupo de pacientes recuperados (0.22 [0.09–2.17]; $P < 0.05$) (Figura 22E).

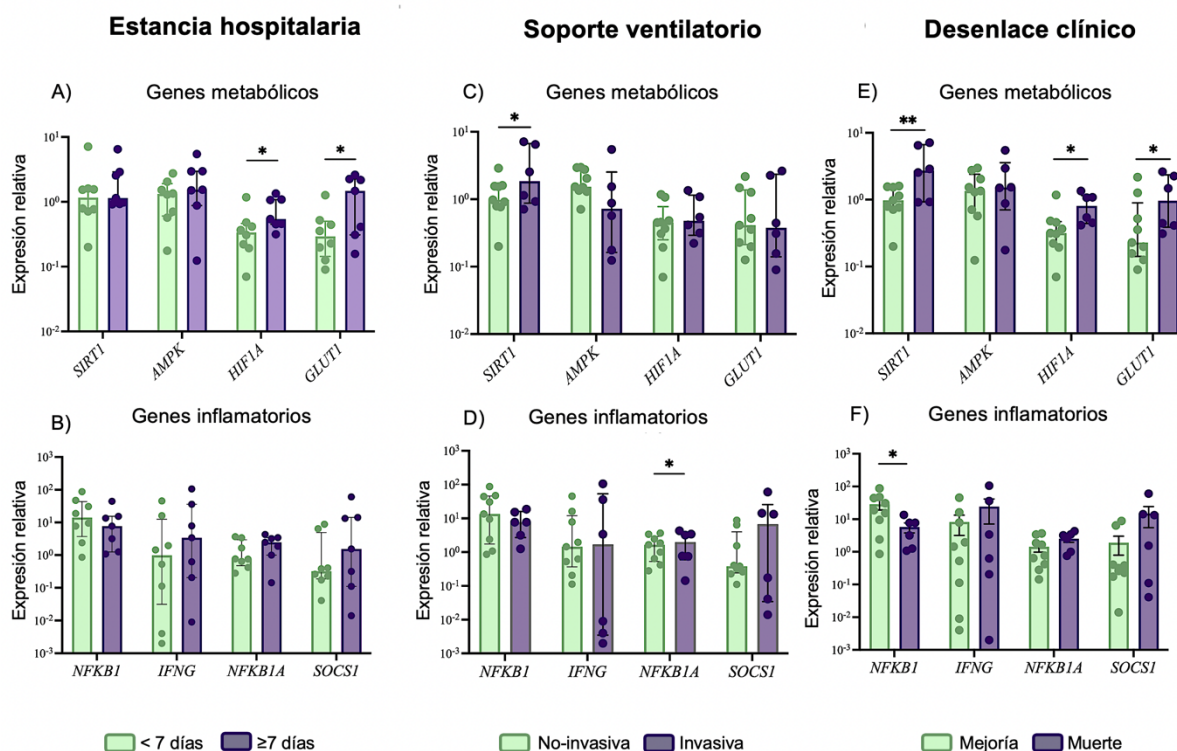


Figura 22. Asociación de la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK y el desenlace clínico de pacientes con COVID-19 grave.

Niveles relativos de expresión de genes metabólicos (paneles A, C, E) e inflamatorios (paneles B, D, F) en células NK de pacientes con COVID-19 grave, estratificados por: (A-B) duración de la estancia hospitalaria (corta vs. larga), (C-D) tipo de soporte ventilatorio requerido (no invasivo vs. invasivo), y (E-F) resultado clínico (mejoría vs. muerte). Análisis estadístico: prueba U de Mann-Whitney. Controles (n=10), pacientes con COVID-19 grave (n=15); $P < 0.05$, $P < 0.01$.

8.9 Alteración en la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células mononucleares de pacientes con COVID-19 grave.

Después de evidenciar alteraciones en la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK de pacientes con COVID-19 grave, decidimos evaluar si estos cambios en la expresión génica también son observados en CMN. La expresión de NFKB1, que codifica el factor de transcripción NF- κ B, no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo de control ($P > 0.05$). Del mismo modo, la expresión de NFKB1A, inhibidor de NF- κ B, no difirió significativamente entre los grupos ($P > 0.05$). La expresión de IFNG no mostró diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$). Asimismo, SOCS1, un gen conocido por su función antiinflamatoria en la supresión de la señalización de citocinas, no mostró variaciones significativas en comparación con el grupo de control ($P > 0.05$), figura 23A.

Respecto a los genes metabólicos, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de SIRT1 (mediana= 1.10; IQR= 1.29) o AMPKA (mediana= 1.45; IQR= 1.12) en comparación con el grupo control (mediana= 1.93; IQR= 5.6 y mediana= 0.93; IQR= 1.24, respectivamente) ($P > 0.05$). Por el contrario, la expresión de GLUT1 fue 0.545 veces menor en los pacientes con COVID-19 grave (mediana= 0.360; IQR= 0.43) comparada con los controles (mediana= 0.905; IQR= 0.66) ($P = 0.012$). Por otro lado, la expresión de HIF1A fue 1.6 veces menor en los pacientes con COVID-19 grave (mediana= 0.53; IQR= 0.24) en comparación con el grupo control (mediana= 0.885; IQR= 0.93) ($P = 0.005$, figura 23B). Además, evaluamos la relación entre la expresión de HIF1A y el resultado clínico de los

pacientes con COVID-19 grave, mostrando un aumento significativo de la expresión de HIF1A en los pacientes fallecidos (figura 23E).

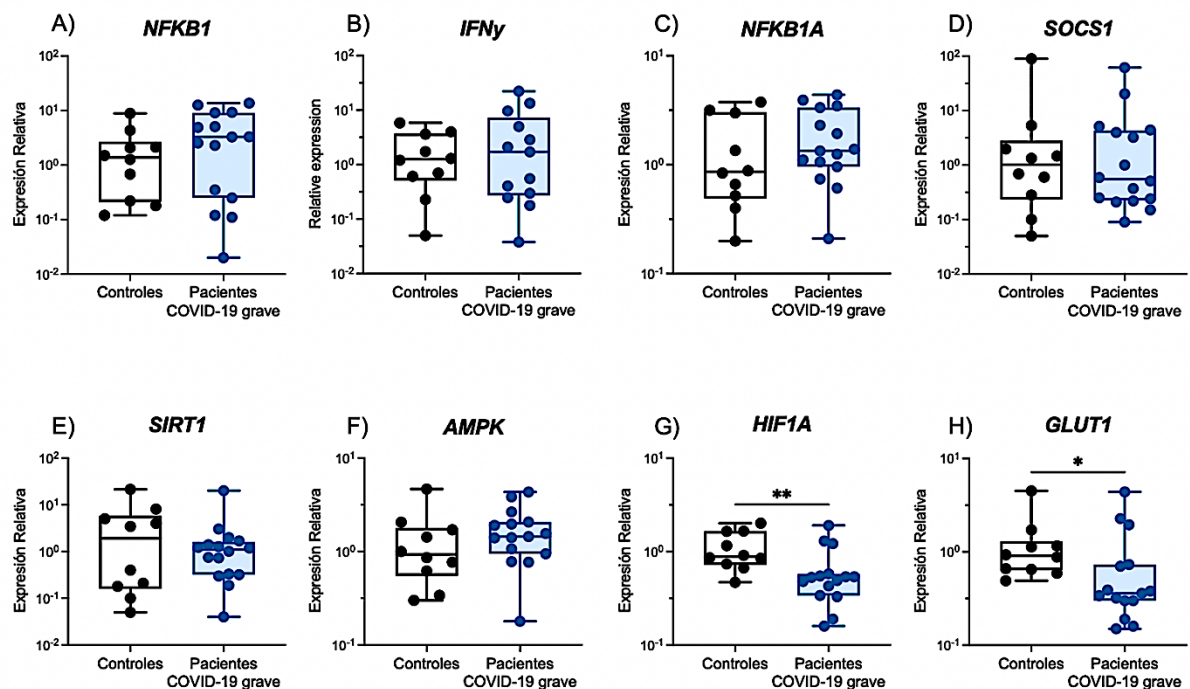


Figura 23. Expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células mononucleares.

Expresión relativa de genes inflamatorios (paneles A-D: *NFKB1*, *IFN- γ* , *NFKB1A*, *SOCS1*) y genes metabólicos (paneles E-H: *SIRT1*, *AMPK*, *HIF1A*, *GLUT1*) en CMN de sangre periférica proveniente de pacientes con COVID-19 ($n=15$) y el grupo control ($n=10$). Prueba U de Mann-Whitney, $*P<0.05$.

8.10 Niveles elevados de IL-6 e IL-8 en plasma de pacientes con COVID-19 grave.

Para conocer el estado inflamatorio de estos pacientes, evaluamos las concentraciones plasmáticas de citocinas en sangre periférica de pacientes con COVID-19 grave. Como se muestra en la figura 24A, los pacientes con COVID-19 grave presentan niveles de IL-6 significativamente más altos (aumento de 11.9 veces; mediana= 7.89, IQR= 15.6) en comparación con el grupo control (mediana= 0.66, IQR= 0.45) ($P= 0.007$). Se observó un comportamiento similar con la citocina inflamatoria IL-8 (aumento de 2.7 veces; mediana= 3.26; IQR= 42.2) en comparación con el grupo control (mediana= 1.18; IQR= 1.63) ($P= 0.019$, figura 24B). Mientras que, no observamos diferencias significativas en los niveles de $\text{TNF}\alpha$, RANTES y HMGB1 entre los grupos ($P> 0.05$, figura 24C-E).

Otras citocinas evaluadas, incluidas IL-2, $\text{IFN-}\gamma$, IL-1 β , IL-15 e IL-10, presentaron concentraciones por debajo de los límites de detección (datos no mostrados). Al evaluar el comportamiento de estas citocinas proinflamatorias a lo largo de la estancia hospitalaria, no observamos diferencias significativas al comparar su concentración al ingreso hospitalario (día 0), al día 3 y el día 10 de estancia hospitalaria ($P> 0.05$), ver figura 24 paneles inferiores.

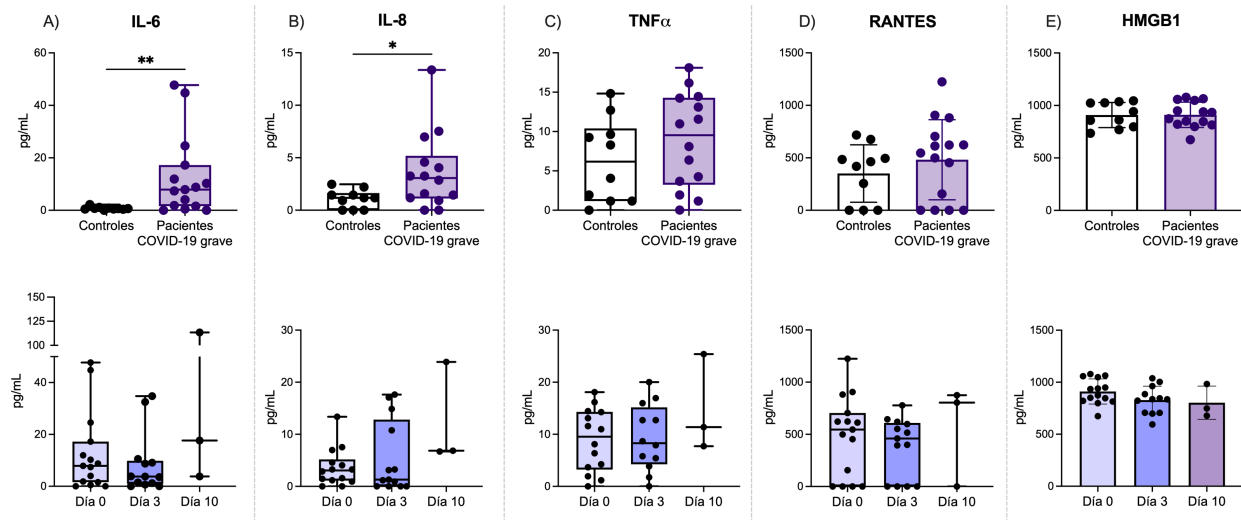


Figura 24. Niveles de citocinas plasmáticas en pacientes con COVID-19 grave.

Evaluación de las concentraciones de las citocinas proinflamatorias IL-6 (A), IL-8 (B), TNF α (C), RANTES (D) y HMGB1 (E) en plasma de pacientes con COVID-19 grave en comparación con el grupo control. Prueba U de Mann-Whitney (paneles superiores) y comparaciones múltiples con la prueba Kruskal-Wallis (paneles inferiores). Grupo control (n= 10), pacientes graves con COVID-19 (n= 15); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

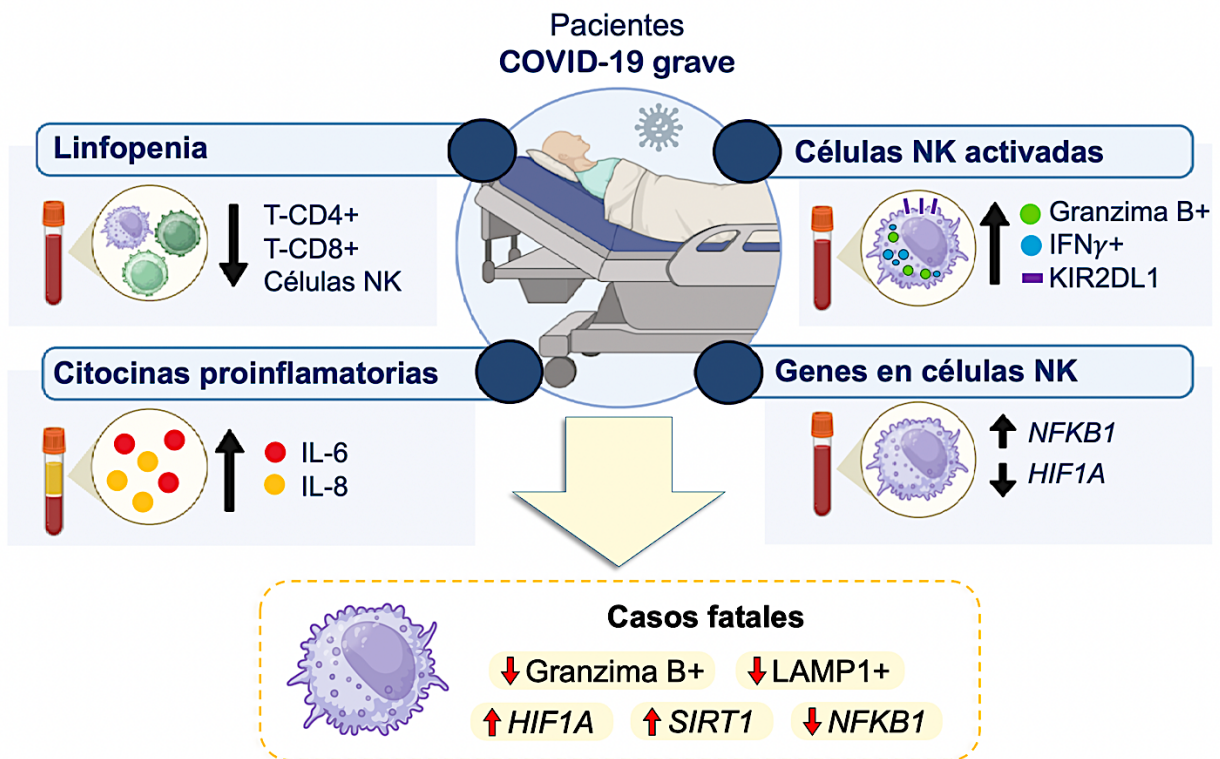


Figura 25. Resumen gráfico de resultados

CAPITULO 9

DISCUSIÓN

Durante las infecciones virales, la actividad de las células citotóxicas es fundamental para la eliminación eficaz del virus. Al inicio de la pandemia de COVID-19, diversos estudios se enfocaron en caracterizar la respuesta inmunológica frente a la infección, y su asociación con el desenlace clínico de los pacientes. Entre los primeros hallazgos relevantes reportados, se identificó una disminución significativa en el número de linfocitos en sangre periférica (linfopenia) en los pacientes con COVID-19, lo cual se reconoció como un signo distintivo de la enfermedad, especialmente en los casos graves, y actualmente continúa siendo un parámetro clínico de estos pacientes (1,7,25,47,84). En concordancia con dichos estudios, en el presente trabajo encontramos una reducción significativa en el recuento total de linfocitos en pacientes con COVID-19 grave, principalmente de la población de células T-CD4+ y de la población de linfocitos citotóxicos (células NK y los linfocitos T-CD8+).

En el esfuerzo continuo por identificar los factores que contribuyen a la inmunopatología de COVID-19, numerosos estudios se han centrado en evaluar el estado de activación de células del sistema inmunológico, principalmente células citotóxicas. A la fecha, diversos trabajos han reportado mayor expresión de receptores inhibidores como TIM-3 y PD-1 en linfocitos T-CD8+. A raíz de estos hallazgos, muchos investigadores sugieren que los linfocitos T-CD8+ en pacientes con COVID-19 presentan un fenotipo de “agotamiento” (22,33,34,36,51).

El agotamiento celular se describe como un estado hipofuncional inducido por estimulación antigénica constante. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en contextos de estimulación crónica, como cáncer y la infección por VIH, donde la exposición persistente a antígenos conduce la pérdida progresiva de la función celular (38,39). Sin embargo, la infección por SARS-CoV-2 representa un estímulo inmunológico agudo, planteando la interrogante si los linfocitos T-CD8+ realmente experimentan agotamiento en este contexto.

En el presente estudio se demostró una sobreexpresión de los receptores inhibidores PD-1 y TIM-3 en linfocitos T-CD8+ de pacientes con COVID-19 grave, en comparación con un grupo control. No obstante, al evaluar su asociación con el desenlace clínico, una mayor expresión del receptor inhibidor PD-1 en linfocitos T-CD8+ se asoció con una mejor evolución clínica de los pacientes. Estos resultados sugieren que la expresión de PD-1 en linfocitos T-CD8+ de pacientes con COVID-19 grave no es indicativa de agotamiento, sino que posiblemente refleja un estado de activación celular. Estos hallazgos coinciden con estudios previos; Shahbaz *et al.* demostraron que la expresión de receptores inhibidores (PD-1 y TIM-3) en linfocitos T-CD8+ no se asocia con disfunción, sino con células altamente activadas y conservan su capacidad de respuesta frente a la reactivación del SARS-CoV-2 *in vitro* (25). De manera similar, Rha *et al.* observaron niveles elevados de PD-1 en linfocitos T-CD8+; y al evaluar su funcionalidad *ex vivo* estas células mostraron una alta capacidad proliferativa, indicativa de activación y no de agotamiento (85).

Durante la activación celular, la sobreexpresión de receptores coinhibitorios puede constituir un mecanismo clave para prevenir la sobreactivación del sistema

inmunológico, actuando como un sistema de autorregulación o “control de daños”. Los hallazgos de este estudio refuerzan el papel crucial de estos receptores en el desenlace clínico y sugieren su posible utilidad como indicadores pronósticos en pacientes con COVID-19 grave.

Las células NK son una población de linfocitos pertenecientes a la inmunidad innata, que desempeñan un papel primordial en la eliminación de virus. Dada su importancia, el estado funcional de estas células durante la infección por SARS-CoV-2 continúa siendo objeto de intensa investigación. Algunos estudios han reportado un fenotipo hipofuncional de las células NK, asociado con un control viral deficiente y desenlaces clínicos adversos (33,34,51), mientras otros estudios sugieren una mayor actividad de estas células, contribuyendo a la respuesta inflamatoria en COVID-19 (66). Ante estas observaciones contradictorias, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el perfil de activación de las células NK circulantes en pacientes con COVID-19 grave. Nuestros resultados muestran una sobreexpresión de los marcadores de activación IFN- γ y Granzima B, así como del receptor inhibidor KIR2DL1, en células NK de pacientes con COVID-19 grave, en comparación con el grupo control. Estos hallazgos sugieren que las células NK en pacientes con COVID-19 grave exhiben un fenotipo activado, caracterizado por el aumento de mediadores típicos de la actividad citotóxica. Nuestros resultados difieren de algunos estudios en los que no se reportan cambios o incluso se evidencia una disminución en la expresión de IFN- γ (1,42,51) y Granzima B (47). Sin embargo, es importante señalar que dichos análisis involucraron estimulación *in vitro* con células K562 y no consideraron la estratificación de los pacientes según la

gravedad de la enfermedad. Por otro lado, nuestros hallazgos coinciden con los reportados por otros grupos de investigación. Bert M. *et al.* demostraron una regulación positiva de IFN- γ y LAMP1, mientras que Maucourant *et al.* reportaron un aumento en la expresión de granzima B en células NK de sangre periférica en pacientes con COVID-19 grave (63,66). Estos resultados concuerdan a los resultados encontrados en esta investigación, ya que sus protocolos experimentales, similar al nuestro, no incluyeron manipulación *in vitro* de las células.

Además de los marcadores de activación, evaluamos la expresión de KIR2DL1, un receptor inhibidor clave de la familia KIR. En este estudio, observamos una sobreexpresión de dicho receptor en células NK de pacientes con COVID-19 grave, hallazgo consistente con otros estudios donde evaluaron células NK no estimuladas y estratificaron a los pacientes según la gravedad de la enfermedad (86,87). Estos resultados destacan la importancia de la co-expresión de receptores activadores e inhibidores en la regulación de la función de las células NK.

Un aspecto relevante que merece ser considerado es la caracterización fenotípica de las subpoblaciones de células NK. Las células CD56^{BRIGHT} NK se asocian predominantemente con funciones inmunorreguladoras y producción de citocinas, mientras que las CD56^{DIM} presentan mayor actividad citotóxica. Estudios realizados demostraron que en pacientes con COVID-19 grave que requirieron apoyo ventilatorio invasivo, la subpoblación de células CD56^{DIM} se encuentra disminuida, lo que podría reflejar una respuesta desregulada de las células NK relacionada con la severidad de la enfermedad (88). Aunque en el presente estudio no se realizó un análisis diferencial de estas subpoblaciones, la sobreexpresión de marcadores

como IFN- γ y granzima B sugiere una expansión funcional de la fracción CD56^{DIM}, más citotóxica. La evaluación específica de estas subpoblaciones en futuros estudios podría aportar información clave sobre los mecanismos de activación y disfunción de las células NK en COVID-19.

Durante la activación celular, se incrementa la actividad metabólica de las células para satisfacer las demandas energéticas necesarias para sus funciones efectoras. Con el objetivo de investigar los cambios metabólicos en células NK provenientes de pacientes con COVID-19 grave, analizamos la expresión de genes clave conocidos como “reguladores maestros del metabolismo”. Este enfoque permite obtener una visión general de las adaptaciones metabólicas que acompañan la activación celular.

Uno de los reguladores metabólicos evaluados en este estudio fue SIRT1 (sirtuina 1), una desacetilasa dependiente de NAD⁺. El papel de SIRT1 en la respuesta inmune innata frente a infecciones virales es complejo y varía considerablemente según el contexto celular. Recientemente, dos estudios *in vitro* han investigado el papel de SIRT1 en la infección por SARS-CoV-2, destacando su interacción con la proteína viral NSP14. Por un lado, Zhang *et al.* propusieron que SIRT1 inhibe la replicación del SARS-CoV-2 y regula positivamente la vía NRF2/HMOX1, un mecanismo de defensa antioxidante inducible involucrado en la patogénesis de la COVID-19 (71). Marius Walter *et al.* demostraron que la deficiencia de SIRT1 o su inhibición farmacológica reducía significativamente la replicación del virus en células A549-ACE2 (72).

La evidencia actual sobre el papel de SIRT1 en COVID-19 sigue siendo limitada y contradictoria, y proviene principalmente de modelos *in vitro*. En el presente estudio, evaluamos por primera vez los niveles de expresión de SIRT1 en células NK aisladas de pacientes con COVID-19 grave. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SIRT1 entre el grupo de pacientes COVID-19 y el grupo control, identificamos una asociación relevante entre la expresión de SIRT1 en células NK y el desenlace clínico. Esta asociación fue observada en pacientes que requirieron VMI y aquellos con desenlace fatal presentaron niveles elevados de expresión de SIRT1.

Estos hallazgos sugieren un posible papel adverso de SIRT1 en el contexto de la COVID-19 grave, lo cual concuerda con los resultados de Walter *et al.*, quienes observaron una asociación positiva entre la expresión de SIRT1 y la replicación del SARS-CoV-2 (72). No obstante, se requieren más estudios para esclarecer el papel preciso de SIRT1 en la fisiopatología de COVID-19.

La señalización de SIRT1 puede inducir un aumento en la expresión de AMPK. En este estudio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de AMPK en células NK de pacientes con COVID-19 grave en comparación con el grupo control. Asimismo, la expresión de AMPK no mostró asociación con los desenlaces clínicos en estos pacientes. Hasta la fecha, ningún estudio ha evaluado específicamente la expresión de AMPK en células NK. Las investigaciones disponibles analizan el papel de AMPK principalmente en modelos *in vitro*; sin embargo, los hallazgos obtenidos hasta el momento son contradictorios. Jang *et al.* reportaron una reducción en la replicación del SARS-CoV-2 en células de

rabdomiosarcoma que carecían de AMPK (modelos *knockdown*) o tratadas con un inhibidor farmacológico (Compuesto C, también conocido como dorsomorfina) (89). En contraste, Gassen *et al.* reportaron que la infección por SARS-CoV-2 induce una regulación negativa de las formas activas de AMPK y de los genes relacionados con su señalización en células Vero (67). Estas observaciones han estimulado el interés por investigar fármacos activadores de AMPK como posibles agentes terapéuticos en el contexto de COVID-19 (90). En nuestro estudio, evaluamos la expresión de AMPK específicamente en células NK de sangre periférica, sin inducir infección viral directa como en los modelos *in vitro*. Esta es una variable relevante, ya que los cambios metabólicos observados en otros estudios podrían deberse a alteraciones provocadas directamente por el virus, y no necesariamente a modificaciones metabólicas asociadas con la activación celular.

Otro de los genes metabólicos analizados en este estudio fue HIF1A, uno de los más investigados en el contexto de infección por SARS-CoV-2. La activación de HIF1A induce una reprogramación metabólica favoreciendo la glucólisis y potencia la respuesta inflamatoria a través de las vías de señalización de NF- κ B. Aunque los estudios disponibles aún son limitados, varios han reportado una sobreexpresión de HIF1A en células mononucleares de sangre periférica (CMNs) de pacientes con COVID-19 (73–75). Esta sobreexpresión también se ha atribuido a los cambios inducidos directamente por la infección viral, los cuales incrementan las demandas metabólicas de las células infectadas para facilitar la replicación del SARS-CoV-2. En este sentido, se ha planteado que HIF1A podría desempeñar un papel facilitador de la infección. No obstante, nuestros resultados muestran una disminución

significativa en la expresión de *HIF1A* en pacientes con COVID-19 grave, con niveles 1.6 veces menores en comparación con el grupo control. Este hallazgo sugiere una posible disfunción metabólica en las CMNs de pacientes con enfermedad grave. De manera consistente, también observamos una reducción significativa en la expresión de *GLUT1*, un transportador de glucosa regulado por *HIF1A*.

Estudios *in vitro* han demostrado una relación directa entre HIF1A y la respuesta inflamatoria observada en pacientes con COVID-19. El estudio realizado por Tian *et al.* demostraron que HIF-1 α favorece la replicación viral e induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β e IFN- β (74). De la misma manera, Mou *et al.* demostraron que SARS-CoV-2 estimula la producción de IL-6 mediada por HIF-1 α en células HEK293T (50). Estos hallazgos son especialmente relevantes, ya que citocinas como IL-6 e IL-8 han sido propuestas como biomarcadores pronósticos en pacientes con COVID-19 (91,92), lo que resalta el papel potencial de HIF-1 α como marcador de gravedad.

Duan *et al.* utilizaron organoides de vías respiratorias derivados de células madre pluripotentes humanas (hPSC-AO) para investigar el papel de HIF-1 α durante la infección por SARS-CoV-2. La inhibición farmacológica de HIF-1 α redujó significativamente la carga viral y la expresión de genes relacionados con la glucólisis en estos organoides (93), reforzando así la importancia de HIF-1 α en el metabolismo celular y en la patogénesis de la enfermedad. A partir de estos hallazgos, han surgido propuestas terapéuticas donde se considera el uso de inhibidores o activadores de sensores metabólicos como HIF-1 α , con el objetivo de

modular la respuesta inmune y controlar la progresión de la enfermedad (90,94,95). En este estudio, a pesar de encontrar menor expresión de *HIF1A* y *GLUT1* en pacientes con COVID-19 grave, al estratificar a los pacientes según el desenlace clínico, se observó un aumento significativo de *HIF1A* y *GLUT1* en aquellos pacientes que fallecieron en comparación con quienes mostraron mejoría, esto resultados pueden indicar que la reactivación de esta vía metabólica ocurre como respuesta a un deterioro sistémico más severo. Sin embargo, se requiere mayor investigación para dilucidar el papel clínico de estos sensores metabólicos y sus implicaciones en la severidad de la COVID-19.

Este es el primer estudio donde se evalúa la expresión de HIF-1 α en células NK aisladas de pacientes con COVID-19. Nuestros hallazgos muestran que las células NK de sangre periférica en pacientes con COVID-19 grave presentan una expresión significativamente reducida de HIF-1 α y GLUT1 en comparación con individuos sanos. Aunque estos resultados difieren de los previamente reportados en células mononucleares, son coherentes con la asociación previamente observada entre una mayor expresión de HIF-1 α y un peor desenlace clínico (73–75). Los pacientes con desenlace fatal presentaron niveles más altos de expresión de HIF1A y GLUT1 en células NK.

En base a estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que HIF1A no influye directamente en el estado de activación de las células NK en pacientes con COVID-19 grave. En cambio, la asociación observada entre la expresión de HIF1A y el desenlace clínico podría reflejar el estado inflamatorio sistémico de los pacientes, respaldado por la regulación positiva del gen inflamatorio NF κ B1. No obstante, se

requiere de más investigación para esclarecer la posible relación entre la expresión de HIF1A y la producción de citocinas inflamatorias por parte de las células NK.

Diversos factores podrían contribuir a las discrepancias observadas entre nuestros hallazgos y los previamente reportados en la literatura científica. Cabe destacar que la mayoría de los estudios que han evaluado la expresión de genes relacionados con el metabolismo en el contexto de la infección por SARS-CoV-2 se han realizado en CMNs de sangre periférica, empleando además distintos estímulos activadores *in vitro*. En contraste, en el presente estudio observamos una disminución significativa en la expresión de *HIF1A* y *GLUT1* tanto en CMNs como en células NK aisladas de sangre periférica de pacientes con COVID-19 grave, sin la aplicación de estímulos *in vitro*. Esta diferencia metodológica podría ser uno de los factores determinantes de la divergencia entre nuestros resultados y los reportados por otros grupos de investigación.

Adicionalmente, gran parte de la evidencia disponible en la literatura no considera la gravedad clínica de la enfermedad como variable de análisis, a pesar de que se ha demostrado que esta influye de manera directa en la respuesta inmunológica de los pacientes. Esta omisión podría limitar la interpretación comparativa entre estudios y subestimar el impacto del estado clínico sobre la expresión génica en células inmunitarias.

Si bien se ha descrito que las células NK pueden ser infectadas directamente por el SARS-CoV-2 y presentar alteraciones en su metabolismo energético, la evidencia actual indica que el virus infecta predominantemente a monocitos, macrófagos, CD y linfocitos B dentro de las poblaciones inmunitarias (96). Esto podría representar

un factor clave que impulsa las alteraciones metabólicas celulares y modula la expresión de estos genes reguladores del metabolismo.

Adicionalmente, muchos estudios que evalúan la expresión de genes metabólicos en el contexto de la infección por SARS-CoV-2 utilizan modelos *in vitro* basados en líneas celulares establecidas. Solo un número limitado de investigaciones ha analizado muestras provenientes de pacientes con COVID-19, y entre ellas, pocas han estratificado los datos según la gravedad de la enfermedad, lo cual representa un determinante crítico en la respuesta inmunitaria. Actualmente, se ha demostrado que la severidad de la infección influye significativamente en la naturaleza y magnitud de las alteraciones inmunológicas (27).

En este estudio, evaluamos exclusivamente muestras de pacientes con COVID-19 grave; por lo tanto, nuestros resultados podrían no ser directamente comparables con los de otros trabajos, particularmente debido a diferencias en el diseño experimental, poblaciones analizadas e inclusive la cepa viral circulante.

Después de evaluar la expresión de genes inflamatorios y metabólicos en células NK, decidimos analizar si estos genes presentaban un patrón de expresión similar en las CMN de sangre periférica. En cuanto a los genes inflamatorios, no se observaron diferencias significativas en la expresión de NFKB1, NFKBIA, IFN- γ y SOCS1 en comparación con el grupo control. Estos hallazgos sugieren que la inflamación en pacientes con COVID-19 grave podría estar impulsada por vías de señalización independientes del eje NF- κ B (97). Sin embargo, se requiere de mayor investigación para identificar y comprender mejor las vías alternativas que contribuyen a la respuesta inflamatoria en este contexto.

Por otro lado, al evaluar la expresión de genes metabólicos, observamos un comportamiento similar al registrado en las células NK, con una expresión significativamente menor de HIF1A y GLUT1 en las células mononucleares de pacientes con COVID-19 grave. HIF-1 α promueve la glucólisis mediante la regulación de la expresión del transportador de glucosa, un proceso crucial para la activación de las células inmunitarias durante la respuesta del huésped frente a la infección (98). En el contexto de la infección por SARS-CoV-2, se ha reportado una expresión elevada de GLUT1 en pacientes con enfermedad grave (99), lo que sugiere su posible participación en la progresión de la enfermedad (100).

Nuestros hallazgos respaldan la hipótesis de que las células mononucleares de pacientes con COVID-19 grave presentan un estado metabólico alterado en respuesta a la infección, y que dichos cambios podrían estar asociados con la severidad clínica de la enfermedad.

Las citocinas desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunológica frente a infecciones virales. En el contexto de la infección por SARS-CoV-2, se ha documentado un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias que contribuye al daño tisular y desenlace clínico desfavorable. Los pacientes que evolucionan hacia formas graves de la enfermedad suelen presentar una respuesta inflamatoria exacerbada, caracterizada por concentraciones elevadas de IL-6, TNF- α , IL-1, IL-2, IL-17, IFN- γ , G-CSF y MCP-1 (21,30–32).

Tanto la IL-6 como la IL-8 pueden ser secretadas hacia la circulación sistémica por monocitos/macrófagos activados y células T CD4⁺ en respuesta a la infección (101). Algunos estudios aportaron evidencia que respalda el uso de las concentraciones

séricas de IL-6 e IL-8 como biomarcadores fiables para predecir el pronóstico de la enfermedad (91,92). En concordancia con lo reportado en estudios previos, en nuestro análisis se observaron niveles plasmáticos significativamente más elevados de IL-6 e IL-8 en individuos con COVID-19 grave en comparación con el grupo control. No obstante, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en otras citocinas frecuentemente descritas, como TNF- α , IL-2 e IFN- γ . Esta discrepancia podría atribuirse a que la mayoría de las investigaciones que reportan concentraciones de citocinas fueron realizados en etapas tempranas de la pandemia (alrededor del año 2020), cuando predominaban diferentes variantes del virus y la cobertura vacunal aún era limitada.

CAPITULO 10

CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio demuestra que el perfil de activación de las células NK se asocia con el desenlace clínico de los pacientes con COVID-19 grave, reforzando el papel del inmunometabolismo como un determinante clave en la evolución de la enfermedad.

CAPITULO 11

LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Entre las principales limitaciones de este estudio se encuentra el tamaño muestral relativamente reducido, condicionado por el periodo posterior a la vacunación, lo cual dificultó la obtención de una cohorte suficientemente amplia. No obstante, el tamaño de nuestra muestra es comparable al de estudios previos enfocados en casos graves de COVID-19 (73,84,85).

Aunque la expresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8⁺ ha sido analizada en investigaciones anteriores, nuestros resultados aportan información valiosa al documentar dicha expresión en pacientes con COVID-19 grave dentro de una población mexicana. Estos hallazgos respaldan la evidencia existente que sugiere que la expresión de dichos receptores en linfocitos T CD8⁺ no necesariamente refleja un estado de agotamiento funcional, sino que podría estar asociada con mecanismos de regulación inmunológica.

A pesar de los avances en el conocimiento sobre la inmunopatología del SARS-CoV-2, son aún escasos los estudios que han evaluado de manera sistemática la expresión de reguladores metabólicos durante la infección por este virus (50,73,74,100,102). En este contexto, el presente trabajo contribuye al entendimiento del metabolismo de las células NK en pacientes con COVID-19 grave y propone una posible asociación entre alteraciones inmunometabólicas y el desenlace clínico.

Es necesario ampliar la caracterización de rutas metabólicas a través del análisis de genes clave relacionados con la glicólisis, la fosforilación oxidativa, la biosíntesis de lípidos, y la β -oxidación. Complementariamente, técnicas funcionales como el análisis de tasas de consumo de oxígeno (OCR) y de producción de ácido láctico (ECAR) mediante sistemas como el Seahorse XF Analyzer podrían ofrecer una evaluación en tiempo real del perfil bioenergético celular.

Asimismo, futuros estudios con un diseño longitudinal de los pacientes puede permitir correlacionar el perfil metabólico inicial con la evolución clínica, incluyendo la presencia de secuelas persistentes o long-COVID. Esta línea de investigación se identificarían firmas metabólicas predictivas de recuperación, fatiga crónica o disfunción inmunológica prolongada. Además, la inclusión de pacientes con manifestaciones clínicas leves, moderadas y graves de COVID-19, así como su estratificación según edad, sexo, comorbilidades (diabetes, hipertensión, obesidad, entre otras) y estado inflamatorio basal, podría mejorar la sensibilidad del análisis y permitir identificar subgrupos con mayor susceptibilidad a alteraciones inmunometabólicas. Esta estratificación permitiría también el análisis multivariado de factores de riesgo y el establecimiento de modelos predictivos más robustos.

A futuro, los hallazgos obtenidos podrían tener aplicaciones clínicas mediante el uso de compuestos capaces de modular la expresión de genes considerados “reguladores maestros” del metabolismo, con el objetivo de influir en la función inmunitaria. No obstante, para avanzar hacia estas aplicaciones, se requiere un mayor volumen de investigación *in vitro* en el campo del inmunometabolismo.

CAPITULO 12

REFERENCIAS

1. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *Clin Med*. 2020;130(9):4694–703.
2. Chung C, Irudayaraj P, Lallow E, Xu Z, Park YK, Kudchodkar SB, et al. An overview of SARS-CoV-2 viral proteins with relevance to improved diagnostic and therapeutic platforms. *Front Virol*. 2024;4(1):1399993.
3. Leticia Cedillo-Barrón, Verónica Lopez-Perrusquilla, Julio García-Cordero, Giovani Visososo-Carvajal. COVID-19, la enfermedad viral que se diseminó en el mundo [Internet]. CINVESTAV; 2020. Report No.: 4. Available from: <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/covid-19-el-virus-que-se-disemino-en-el-mundo/>
4. Ahmed F, Jo DH, Lee SH. Can Natural Killer Cells Be a Principal Player in Anti-SARS-CoV-2 Immunity? *Front Immunol*. 2020;11(586765):1–8.
5. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*. 2020 Dec;41(12):1100–15.
6. Subong BJJ, Forteza IL. SARS-CoV-2 Replication Revisited: Molecular Insights and Current and Emerging Antiviral Strategies. *COVID*. 2025;5(6):85.
7. Jiang Y, Wei X, Guan J, Qin S, Wang Z, Lu H, et al. COVID-19 pneumonia: CD8+ T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic potential. *Clinical Immunology*. 2020 Sep;218:108516.
8. World Health Organization. WHO COVID-19 dashboard [Internet]. 2025. Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=o>
9. Organización Mundial de la Salud (OMS). Panel de la OMS sobre la COVID-19 [Internet]. 2025. Available from: <https://data-who-int.translate.google/dashboards/covid19/cases?m49=484>
10. Garry EM, Weckstein AR, Quinto K, Bradley MC, Lasky T, Chakravarty A, et al. Categorization of COVID-19 severity to determine mortality risk.

Pharmacoepidemiology and Drug. 2022;31(7):721–8.

11. World Health Organization (WHO). Living guidance for clinical management of COVID-19 [Internet]. 2023 p. 1–116. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
12. Notarbartolo S, Ranzani V, Bandera A, Gruarin P, Bevilacqua V, Putignano AR, et al. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional, and repertoire analyses delineate immune responses in patients with COVID-19. *Sci Immunol*. 2021 Aug 10;6(62):eabg5021.
13. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022;375(6585):1122–7.
14. Maison DP, Deng Y, Gerschenson M. SARS-CoV-2 and the host-immune response. *Front Immunol*. 2023 Jun 19;14:1195871.
15. Nasrollahi H, Talepoor AG, Saleh Z, Eshkevar Vakili M, Heydarinezhad P, Karami N, et al. Immune responses in mildly versus critically ill COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2023;14(1077236):1–18.
16. Sievers BL, Cheng MTK, Csiba K, Meng B, Gupta RK. SARS-CoV-2 and innate immunity: the good, the bad, and the “goldilocks.” *Cell Mol Immunol*. 2023 Nov 20;21(2):171–83.
17. Di Vito C, Calcaterra F, Coianiz N, Terzoli S, Voza A, Mikulak J, et al. Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 2022;13:888248.
18. Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Pavelić E, Molnar V, Matišić V, et al. Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front Immunol*. 2022 May 4;13:848582.
19. Lombardi A, Trombetta E, Cattaneo A, Castelli V, Palomba E, Tirone M, et al. Early Phases of COVID-19 Are Characterized by a Reduction in Lymphocyte Populations and the Presence of Atypical Monocytes. *Front Immunol*. 2020;11(1):560330.
20. Bordoni V, Sacchi A, Cimini E, Notari S, Grassi G, Tartaglia E, et al. An Inflammatory Profile Correlates With Decreased Frequency of Cytotoxic Cells in Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 2020 Nov 19;71(16):2272–

5.

21. Yin SW, Zhou Z, Wang JL, Deng YF, Jing H, Qiu Y. Viral loads, lymphocyte subsets and cytokines in asymptomatic, mildly and critical symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection: a retrospective study. *Viol J.* 2021 Dec;18(1):126.

22. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):541–3.

23. Ramljak D, Vukoja M, Curlin M, Vukojevic K, Barbaric M, Glamoclija U, et al. Early Response of CD8+ T Cells in COVID-19 Patients. *JPM.* 2021 Dec 3;11(12):1291.

24. Andrejkovits ÁV, Huțanu A, Manu DR, Dobreanu M, Văsieșiu AM. Dynamic Changes in Lymphocyte Populations and Their Relationship with Disease Severity and Outcome in COVID-19. *IJMS.* 2024 Nov 6;25(22):11921.

25. Shahbaz S, Xu L, Sligl W, Osman M, Bozorgmehr N, Mashhouri S, et al. The Quality of SARS-CoV-2–Specific T Cell Functions Differs in Patients with Mild/Moderate versus Severe Disease, and T Cells Expressing Coinhibitory Receptors Are Highly Activated. *The Journal of Immunology.* 2021 Aug 15;207(4):1099–111.

26. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, Cavallaro D, Gangi S, Cekorja B, et al. NK and T Cell Immunological Signatures in Hospitalized Patients with COVID-19. *Cells.* 2021 Nov 15;10(11):3182.

27. Song JW, Zhang C, Fan X, Meng FP, Xu Z, Xia P, et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun.* 2020;11(3410):1–10.

28. Yang L, Gou J, Gao J, Huang L, Zhu Z, Ji S, et al. Immune characteristics of severe and critical COVID-19 patients. *Sig Transduct Target Ther.* 2020 Dec;5(1):179.

29. Varchetta S, Mele D, Oliviero B, Mantovani S, Ludovisi S, Cerino A, et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2021 Mar;18(3):604–12.

30. Luo X, Zhu Y, Mao J, Du R. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. *Scand J Immunol*. 2021 Mar;93(3):e12989.
31. Niedźwiedzka-Rystwej P, Majchrzak A, Kurkowska S, Małkowska P, Sierawska O, Hryniewicz R, et al. Immune Signature of COVID-19: In-Depth Reasons and Consequences of the Cytokine Storm. *IJMS*. 2022 Apr 20;23(9):4545.
32. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020 Jul 1;108(1):17–41.
33. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8⁺ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front Immunol*. 2020 Oct 14;11:580237.
34. Bobcakova A, Petriskova J, Vysehradsky R, Kocan I, Kapustova L, Barnova M, et al. Immune Profile in Patients With COVID-19: Lymphocytes Exhaustion Markers in Relationship to Clinical Outcome. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11(1):1–15.
35. De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun*. 2020 Jul 6;11(1):3434.
36. Wu Y, Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
37. Herrmann M, Schulte S, Wildner NH, Wittner M, Brehm TT, Ramharter M, et al. Analysis of Co-inhibitory Receptor Expression in COVID-19 Infection Compared to Acute Plasmodium falciparum Malaria: LAG-3 and TIM-3 Correlate With T Cell Activation and Course of Disease. *Front Immunol*. 2020;11(1):1–15.
38. Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S. CD8⁺ T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol*. 2021 Jul 20;12:715234.
39. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019 Apr 26;37(1):457–95.
40. Nishikawa Y, Yamaguchi K, Shofiudin MA, Mimura M, Takata M, Mihara S, et al. Distinct immunity dynamics of natural killer cells in mild and moderate COVID-19

- cases during the Omicron variant phase. *Front Immunol*. 2025;16(1):1594296.
41. van Eeden C, Khan L, Osman MS, Cohen Tervaert JW. Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. *IJMS*. 2020 Sep 1;21(17):6351.
 42. Krämer B, Knoll R, Bonaguro L, ToVinh M, Raabe J, Astaburuaga-García R, et al. Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. *Immunity*. 2021 Nov;54(11):2650-2669.e14.
 43. Masselli E, Vaccarezza M, Carubbi C, Pozzi G, Presta V, Mirandola P, et al. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2. *Advances in Biological Regulation*. 2020 Aug;77:100737.
 44. Björkström NK, Strunz B, Ljunggren HG. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*. 2022 Feb;22(2):112–23.
 45. Blunt MD. NK Cells in Health and Disease. *Biomedicines*. 2025;13(6):1312.
 46. Wang Z, Guan D, Wang S, Chai LYA, Xu S, Lam KP. Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Play Critical Roles in Natural Killer Cell Receptor-Mediated Natural Killer Cell Functions. *Front Immunol*. 2020 Feb 20;11:202.
 47. Osman M, Faridi RM, Sligl W, Shabani-Rad MT, Dharmani-Khan P, Parker A, et al. Impaired natural killer cell counts and cytolytic activity in patients with severe COVID-19. *Clin Med*. 2020;4(20):5035–9.
 48. Kim H, Byun JE, Yoon SR, Koohy H, Jung H, Choi I. SARS-CoV-2 peptides bind to NKG2D and increase NK cell activity. *Cellular Immunology*. 2022;371(1):104454.
 49. Marquardt N, Kekäläinen E, Chen P, Lourda M, Wilson JN, Scharenberg M, et al. Unique transcriptional and protein-expression signature in human lung tissue-resident NK cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):3841.
 50. Xiaoli Mou, Fan Luo, Weihao Zhang, Qi Cheng, Jussi Hepojoki, Shaowei Zhu, et al. SARS-CoV-2 NSP16 promotes IL-6 production by regulating the stabilization of HIF-1 α . *Cell Signal*. 2024;124(111387):1–13.
 51. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):533–5.
 52. Lee MJ, De Los Rios Kobara I, Barnard TR, Vales Torres X, Tobin NH, Ferbas

KG, et al. NK Cell–Monocyte Cross-talk Underlies NK Cell Activation in Severe COVID-19. *The Journal of Immunology*. 2024 Jun 1;212(11):1693–705.

53. Qin Y, Cui Q, Sun G, Chao J, Wang C, Chen X, et al. Developing enhanced immunotherapy using NKG2A knockout human pluripotent stem cell-derived NK cells. *Cell Reports*. 2024 Nov;43(11):114867.

54. Fernández-Soto D, García-Jiménez ÁF, Casasnovas JM, Valés-Gómez M, Reyburn HT. Elevated levels of cell-free NKG2D-ligands modulate NKG2D surface expression and compromise NK cell function in severe COVID-19 disease. *Front Immunol*. 2024 Feb 12;15:1273942.

55. Walls JF, Subleski JJ, Palmieri EM, Gonzalez-Cotto M, Gardiner CM, McVicar DW, et al. Metabolic but not transcriptional regulation by PKM2 is important for natural killer cell responses. *eLife*. 2020 Aug 19;9:e59166.

56. Gardiner CM, Finlay DK. What Fuels Natural Killers? Metabolism and NK Cell Responses. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Apr 3 [cited 2022 Sep 4];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00367/full>

57. Day EA, Ford RJ, Steinberg GR. AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017 Aug;28(8):545–60.

58. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Feb;19(2):121–35.

59. Salzberger W, Martrus G, Bachmann K, Goebels H, Heß L, Koch M, et al. Tissue-resident NK cells differ in their expression profile of the nutrient transporters Glut1, CD98 and CD71. Bernardino de la Serna J, editor. *PLoS ONE*. 2018 Jul 20;13(7):e0201170.

60. Cong J. Metabolism of Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol*. 2020 Aug 28;11:1989.

61. Gardinassi LG, Souza COS, Sales-Campos H, Fonseca SG. Immune and Metabolic Signatures of COVID-19 Revealed by Transcriptomics Data Reuse. *Front Immunol*. 2020 Jun 26;11:1636.

62. Li S, Zhao F, Ye J, Li K, Wang Q, Du Z, et al. Cellular metabolic basis of altered immunity in the lungs of patients with COVID-19. *Med Microbiol Immunol*.

2022 Feb;211(1):49–69.

63. Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, Aleman S, Cornillet M, Hertwig L, et al. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol*. 2020 Aug 14;5(50):eabd6832.

64. Balachandran H, Kroll K, Terry K, Manickam C, Jones R, Woolley G, et al. NK cells modulate in vivo control of SARS-CoV-2 replication and suppression of lung damage. Klatt NR, editor. *PLoS Pathog*. 2024;20(8):e1012439.

65. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jul;26(7):1070–6.

66. Malengier-Devlies B, Filtjens J, Ahmadzadeh K, Boeckx B, Vandenhoute J, De Visscher A, et al. Severe COVID-19 patients display hyper-activated NK cells and NK cell-platelet aggregates. *Front Immunol*. 2022;13:861251.

67. Gassen NC, Papies J, Bajaj T, Emanuel J, Dethloff F, Chua RL, et al. SARS-CoV-2-mediated dysregulation of metabolism and autophagy uncovers host-targeting antivirals. *Nat Commun*. 2021;12(1):3818.

68. Alqarni MH, Foudah AI, Muharram MM, Labrou NE. The Pleiotropic Function of Human Sirtuins as Modulators of Metabolic Pathways and Viral Infections. *Cells*. 2021 Feb 21;10(2):460.

69. Aslan ES, Aydın H, Tekin YK, Keleş S, White KN, Hekim N. Association between iron metabolism and SARS-COV-2 infection, determined by ferritin, hephaestin and hypoxia-induced factor-1 alpha levels in COVID-19 patients. *Mol Biol Rep*. 2023;50(3):2471–8.

70. Ayres JS. Immunometabolism of infections. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(2):79–80.

71. Zhang S, Wang J, Wang L, Aliyari S, Cheng G. SARS-CoV-2 virus NSP14 Impairs NRF2/HMOX1 activation by targeting Sirtuin 1. *Cell Mol Immunol*. 2022;19(8):872–82.

72. Walter M, Chen IP, Vallejo-Gracia A, Kim IJ, Bielska O, Lam VL, et al. SIRT5 is a proviral factor that interacts with SARS-CoV-2 Nsp14 protein. Dittmann M, editor. *PLoS Pathog*. 2022;18(9):e1010811.

73. Codo AC, Davanzo GG, Monteiro LDB, De Souza GF, Muraro SP, Virgilio-da-Silva JV, et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism*. 2020;32(3):437–46.
74. Mingfu Tian, Weiyong Liu, Xiang Li, Peiyi Zhao, Muhammad Adnan Shereen, Chengliang Zhu, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Sig Transduct Target Ther*. 2021;6(308):1–13.
75. Karabulut Uzunçakmak S, Naldan ME, Dirican E, Kerget F, Halıcı Z. Preliminary investigation of gene expression levels of PAPP-A, STC-2, and HIF-1 α in SARS-Cov-2 infected patients. *Mol Biol Rep*. 2022;49(9):8693–9.
76. Ma L, Gao J. Suppression of lncRNA-MALAT1 activity ameliorates femoral head necrosis by modulating mTOR signaling. *Arch Med Sci*. 2020;20(2):612–7.
77. Harmel E, Grenier E, Bendjoudi Ouadda A, El Chebly M, Ziv E, Beaulieu JF, et al. AMPK in the Small Intestine in Normal and Pathophysiological Conditions. *Endocrinology*. 2014;155(3):873–88.
78. Xue J, Zhong S, Sun B min, Sun QF, Hu LY, Pan SJ. Lnc-THOR silencing inhibits human glioma cell survival by activating MAGEA6-AMPK signaling. *Cell Death Dis*. 2019;10(11):1–13.
79. Aghara H, Chadha P, Mandal P. Mitigative Effect of Graphene Oxide Nanoparticles in Maintaining Gut–Liver Homeostasis against Alcohol Injury. *Gastroenterology Insights*. 2024;15(3):574–87.
80. Childs-Disney JL, Tran T, Vummidi BR, Velagapudi SP, Haniff HS, Matsumoto Y, et al. A Massively Parallel Selection of Small Molecule-RNA Motif Binding Partners Informs Design of an Antiviral from Sequence. *Chem*. 2018;4(10):2384–404.
81. Xiao H, Liu Z. Effects of microRNA-217 on high glucose-induced inflammation and apoptosis of human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) and its underlying mechanism. *Mol Med Report*. 2019;
82. Zhang L, Chen J, He Q, Chao Z, Li X, Chen M. MicroRNA-217 is involved in the progression of atherosclerosis through regulating inflammatory responses by

targeting sirtuin 1. *Mol Med Report*. 2019;20(1):3182–90.

83. Deng X, Shang L, Du M, Yuan L, Xiong L, Xie X. Mechanism underlying the significant role of the miR-4262/SIRT1 axis in children with inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med*. 2020;20(1):2227–35.

84. Kang CK, Han GC, Kim M, Kim G, Shin HM, Song KH, et al. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;97(1):313–21.

85. Rha MS, Jeong HW, Ko JH, Choi SJ, Seo IH, Lee JS, et al. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity*. 2021;54(1):44–53.

86. Demaria O, Carvelli J, Batista L, Thibault ML, Morel A, André P, et al. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural Killer cells in COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2020 Sep;17(9):995–7.

87. Saresella M, Trabattoni D, Marventano I, Piancone F, La Rosa F, Caronni A, et al. NK Cell Subpopulations and Receptor Expression in Recovering SARS-CoV-2 Infection. *Mol Neurobiol*. 2021 Dec;58(12):6111–20.

88. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jul;26(7):1070–6.

89. Jang M, Park R, Yamamoto A, Park YI, Park Y, Lee S, et al. AMPK inhibitor, compound C, inhibits coronavirus replication in vitro. Parthasarathy K, editor. *PLoS ONE*. 2023;18(10):e0292309.

90. Parthasarathy H, Tandel D, Siddiqui AH, Harshan KH. Metformin suppresses SARS-CoV-2 in cell culture. *Virus Research*. 2023 Jan;323:199010.

91. Lili Li, Jie Li, Meiling Gao, Huimin Fan, Yanan Wang, Xin Xu, et al. Interleukin-8 as a Biomarker for Disease Prognosis of Coronavirus Disease-2019 Patients. *Front Immunol*. 2021;11(602395):1–10.

92. D’Rozario R, Raychaudhuri D, Bandopadhyay P, Sarif J, Mehta P, Liu CSC, et al. Circulating Interleukin-8 Dynamics Parallels Disease Course and Is Linked to Clinical Outcomes in Severe COVID-19. *Viruses*. 2023;15(2):1–15.

93. Duan X, Tang X, Nair MS, Zhang T, Qiu Y, Zhang W, et al. An airway

organoid-based screen identifies a role for the HIF1 α -glycolysis axis in SARS-CoV-2 infection. *Cell Reports*. 2021 Nov;37(6):109920.

94. Kamyshnyi O, Matskevych V, Lenchuk T, Strilbytska O, Storey K, Lushchak O. Metformin to decrease COVID-19 severity and mortality: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;144(1):1–12.

95. Ramdani L.H., Bachari K. Potential therapeutic effects of Resveratrol against SARS-CoV-2. *Acta Virol* . 2020;64(3):276–80.

96. Matveeva O, Nechipurenko Y, Lagutkin D, Yegorov YE, Kzhyshkowska J. SARS-CoV-2 infection of phagocytic immune cells and COVID-19 pathology: Antibody-dependent as well as independent cell entry. *Front Immunol*. 2022;13(1):01–21.

97. Amini-Farsani Z, Yadollahi-Farsani M, Arab S, Forouzanfar F, Yadollahi M, Asgharzade S. Prediction and analysis of microRNAs involved in COVID-19 inflammatory processes associated with the NF- κ B and JAK/STAT signaling pathways. *International Immunopharmacology*. 2021;100.

98. Serebrovska ZO, Chong EY, Serebrovska TV, Tumanovska LV, Xi L. Hypoxia, HIF-1 α , and COVID-19: from pathogenic factors to potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(12):1539–46.

99. Shuba Krishnan, Hampus Nordqvist, Anoop T. Ambikan, Soham Gupta, Maïke Sperk, Sara Svensson-Akusjärvi, et al. Metabolic Perturbation Associated With COVID-19 Disease Severity and SARS-CoV-2 Replication. *Mol Cell Proteomics*. 2021;20(100159):1–14.

100. Julian Mustroph, Julian Hupf, Frank Hanses, Katja Evert, Maria J. Baier, Matthias Evert, et al. Decreased GLUT1/NHE1 RNA expression in whole blood predicts disease severity in patients with COVID19. *ESC Heart Failure*. 2021;8(1):309–16.

101. Grebenciucova E, VanHaerents S. Interleukin 6: at the interface of human health and disease. *Front Immunol*. 2023;14(1):1–10.

102. Tian M, Liu W, Li X, Zhao P, Shereen MA, Zhu C, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Sig Transduct Target Ther*. 2021;6(1):308.

CAPITULO 13

ANEXOS

13.1 Aprobación por Comité de Ética en Investigación, Subdirección de Posgrado, Facultad de Medicina, UANL.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

DR. C. ADRIÁN GEOVANI ROSAS TARACO

Investigador Principal

Servicio de Inmunología

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"

Presente.-

Estimado Dr. Rosas:

En respuesta a su solicitud con número de ingreso **PI20-00356** con fecha del **22 de octubre del 2021**, recibida en las oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente notificación con fundamento en el artículo 41 BIS de la Ley General de Salud; los artículos 14 inciso VII, 99 inciso I, 102, 109 y 112 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; además de lo establecido en los puntos 4.4, 6.2, 6.3.2.8, 8 y 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su proyecto de investigación clínica abajo mencionado cumple con los aspectos éticos necesarios para garantizar el bienestar y los derechos de los sujetos de investigación que la sociedad mexicana demanda, por lo cual ha sido **APROBADO**.

Titulado "Evaluación del perfil de citocinas, quimiocinas, adipocinas y fenotipo de células NK en pacientes con infección grave por SARS-CoV-2 y su asociación con la progresión clínica"

De igual forma el (los) siguiente(s) documento(s):

- Protocolo de Investigación, versión 2 de fecha dic 2021.

Por lo tanto usted ha sido **autorizado** para realizar dicho estudio en el **Servicio de Inmunología** del Hospital Universitario como Investigador Responsable. Su proyecto aprobado ha sido registrado con la clave **IN21-00002** La vigencia de aprobación de este proyecto es al día **16 de diciembre del 2021**.

Participando además la M.C. Kenia Yarety Osuna Espinoza como **tesista**, el Dr. Manuel Mejía Torres, Dr. Mario César Salinas Carmona, Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, Dr. Jorge Armando González Chapa, Dr. Adrián Camacho Ortiz, Dr. Eduardo Pérez Alba, Est. Mariana Dennis de León López y la Q.C.B. Azalia Magdalen Martínez Castilla como Co-Investigadores.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado o cualquier documento involucrado en el proyecto sufran modificaciones, éstas deberán someterse para su re-aprobación.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior se encuentre debidamente consignado. En caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el bienestar y seguridad de los sujetos en investigación.

El proyecto aprobado será revisado:

1. Al menos una vez al año, en base a su naturaleza de investigación.

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 818329 4050, Ext. 2870 a 2874 Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

2. Cuando cualquier enmienda pudiera o claramente afecte bienestar y los derechos de los sujetos de investigación o en la conducción del estudio.
3. Cualquier evento o nueva información que pueda afectar la proporción de beneficio/riesgo del estudio.
4. Así mismo llevaremos a cabo auditorias por parte de la Coordinación de Control de Calidad en Investigación aleatoriamente o cuando el Comité lo solicite.
5. Toda revisión será sujeta a los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas en Investigación, la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, la NOM-012-SSA3-2012, el Reglamento Interno de Investigación de nuestra Institución, así como las demás regulaciones aplicables.

Atentamente,

"Alere Flammam Veritatis"

Monterrey, Nuevo León, a 16 de diciembre del 2021



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DR. med. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL

Presidente del Comité de Ética en Investigación

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



September 18, 2017

13.2 Producción Científica



OPEN ACCESS

EDITED BY
Amol Suryawanshi,
Auburn University, United States

REVIEWED BY
Stefania Mantovani,
San Matteo Hospital Foundation (IRCCS),
Italy
Elisabeth Littwitz-Salomon,
University Hospital Essen, Germany

*CORRESPONDENCE
Adrián G. Rosas-Taraco
✉ adrian.rosastr@uanl.edu.mx

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 07 October 2022
ACCEPTED 04 January 2023
PUBLISHED 18 January 2023

CITATION
Osuna-Espinoza KY and Rosas-Taraco AG
(2023) Metabolism of NK cells during viral
infections.
Front. Immunol. 14:1064101.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1064101

COPYRIGHT
© 2023 Osuna-Espinoza and Rosas-Taraco.
This is an open-access article distributed
under the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Metabolism of NK cells during viral infections

Kenia Y. Osuna-Espinoza and Adrián G. Rosas-Taraco*

Faculty of Medicine, Department of Immunology, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey,
Nuevo Leon, Mexico

Cellular metabolism is essential for the correct function of immune system cells, including Natural Killer cells (NK). These cells depend on energy to carry out their effector functions, especially in the early stages of viral infection. NK cells participate in the innate immune response against viruses and tumors. Their main functions are cytotoxicity and cytokine production. Metabolic changes can impact intracellular signals, molecule production, secretion, and cell activation which is essential as the first line of immune defense. Metabolic variations in different immune cells in response to a tumor or pathogen infection have been described; however, little is known about NK cell metabolism in the context of viral infection. This review summarizes the activation-specific metabolic changes in NK cells, the immunometabolism of NK cells during early, late, and chronic antiviral responses, and the metabolic alterations in NK cells in SARS-CoV2 infection. The modulation points of these metabolic routes are also discussed to explore potential new immunotherapies against viral infections.

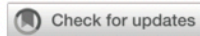
KEYWORDS

natural killer cells (NK cells), viral infection, glycolysis, oxidative phosphorylation
immunometabolism

Introduction

Natural Killer (NK) cells are innate lymphoid cells (ILCs) that share certain morphological characteristics with adaptive immunity lymphocytes, establishing a complementary innate counterpart to T helper cells. The differences between these populations are based on stimulation and the response to stimuli. The ILCs are divided into two functional groups: cytotoxic ILCs (conventional NK cells) and helper-like ILCs (ILC1, ILC2, and ILC3) (1).

Abbreviations: OXPHOS, Oxidative phosphorylation; AMPK, AMP-protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; HIF1 α , hypoxia-inducible Factor-1 α ; OCR, oxygen consumption rate; ECAR, extracellular acidification rate; COX2, cyclooxygenase-2; LDHA, lactate dehydrogenase A; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PKM, pyruvate kinase muscle isozyme; ENO1, enolase 1; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; ALDOA, aldolase A; 2-DG, 2-deoxyglucose.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Rita Silva-Gomes,
University of Minho, Portugal

REVIEWED BY
Silvia Barbon,
University of Padua, Italy
Domenico Supino,
University of Milan, Italy
Cristián Gutiérrez-Vera,
University of Chile, Chile

*CORRESPONDENCE
Adrian G. Rosas-Taraco
✉ adrian.rosastr@uanl.edu.mx

RECEIVED 27 May 2025
ACCEPTED 28 July 2025
PUBLISHED 25 August 2025

CITATION
Osuna-Espinoza KY, Mejia-Torres MG,
Camacho-Ortiz A, Perez-Alba E,
Martinez-Castilla AM, Salinas-Carmona MC
and Rosas-Taraco AG (2025) Expression of
metabolic genes in NK cells is associated
with clinical outcomes in patients with
severe COVID-19: a brief report.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 15:1636463.
doi: 10.3389/fcimb.2025.1636463

COPYRIGHT
© 2025 Osuna-Espinoza, Mejia-Torres,
Camacho-Ortiz, Perez-Alba, Martinez-Castilla,
Salinas-Carmona and Rosas-Taraco. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Expression of metabolic genes in NK cells is associated with clinical outcomes in patients with severe COVID-19: a brief report

Kenia Y. Osuna-Espinoza¹, Manuel G. Mejia-Torres¹,
Adrian Camacho-Ortiz², Eduardo Perez-Alba²,
Azalia M. Martinez-Castilla¹, Mario C. Salinas-Carmona¹
and Adrian G. Rosas-Taraco^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Servicio y Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Monterrey, NL, Mexico, ²Universidad Autónoma de Nuevo León, Servicio de Infectología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Monterrey, NL, Mexico

Natural killer (NK) cells are innate lymphocytes with cytotoxic activity against tumors and viruses. The pandemic of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) has increased the investigation of their role in disease severity. However, their functional status and modulators remain controversial. Recent studies highlighted the role of metabolism in immune function, but metabolic changes in NK cells during SARS-CoV-2 infection remain unexplored. This study compares metabolic (*SIRT1*, *AMPKA*, *HIF1A*, and *GLUT1*) and inflammatory (*NFKB1*, *NFKB1A*, *IFNG*, and *SOCs1*) gene expression, and flow cytometry-based assessment of functional markers in NK cells from severe COVID-19 patients (n=15) and the control group (n=10), and their association with clinical outcomes. Severe COVID-19 patients exhibited elevated IFN γ , Granzyme B, and KIR2DL1 expression in NK cells compared to controls ($P < 0.005$), while LAMP1 was unchanged ($P > 0.05$). NK cells from deceased patients exhibited significantly lower expression levels of LAMP1 and Granzyme B ($P < 0.05$). Patients hospitalized >7 days presented lower Granzyme-B+ NK cells ($P < 0.05$). NK cells from severe COVID-19 patients showed downregulation of *HIF1A* and *GLUT1*, and upregulation of *NFKB1* ($P < 0.05$). *HIF1A* and *GLUT1* expression were elevated in patients with >7 days of hospitalization ($P < 0.05$). *SIRT1* expression was higher in patients requiring intubation ($P < 0.05$). *SIRT1*, *HIF1A*, and *GLUT1* were upregulated in deceased patients ($P < 0.05$). In conclusion, we demonstrate that NK cells from patients with severe COVID-19 exhibit increased functional markers and dysregulated metabolic gene expression associated with clinical outcomes.

13.3 Asistencia y participación en congresos



SOCIEDAD MEXICANA
DE INMUNOLOGÍA
En la lucha contra las enfermedades
infecciosas, autoinmunes, alergias y el cáncer



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

KENIA YARETZY OSUNA ESPINOZA

Por su participación como **ponente modalidad ORAL** con el
trabajo titulado:

**High expression of inhibitory markers on CD8+ T cells from patients with SARS-CoV-2
infection.**

**XXV Congreso Nacional de Inmunología
Querétaro 2023**

Querétaro, Qro., México, del 4 al 8 de junio del 2023


DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO
PRESIDENTE
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA


DR. JULIO ENRIQUE CASTAÑEDA DELGADO
SECRETARIO
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA



SOCIEDAD MEXICANA
DE INMUNOLOGÍA
En la lucha contra las enfermedades
infecciosas, autoinmunes, alergias y el cáncer



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

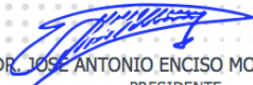
Kenia Yaretzy Osuna Espinoza

Por su participación como **ponente modalidad CARTEL** con el
trabajo titulado:

**High expression of inhibitory markers on CD8+ T cells from patients with SARS-CoV-2
infection.**

**XXV Congreso Nacional de Inmunología
Querétaro 2023**

Querétaro, Qro., México, del 4 al 8 de junio del 2023


DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO
PRESIDENTE
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA


DR. JULIO ENRIQUE CASTAÑEDA DELGADO
SECRETARIO
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA

LA SECRETARÍA DE SALUD

Otorga la presente

CONSTANCIA

**Kenia Y. Osuna Espinoza, Manuel G. Mejía Torres, Adrián Camacho Ortiz,
Eduardo Pérez Alba, Mario C. Salinas Carmona, Adrián G. Rosas Traco**

Por su **Participación** con el trabajo de investigación titulado:

**“La expresión de LAMP1 en células NK se asocia con el desenlace clínico de
pacientes con infección por SARS-CoV-2”**

en la modalidad **TRABAJO EN EXTENSO**, en la categoría **III. Investigación en Ciencias Clínicas**; en el
curso **PRESENCIAL** de:

«23 ENCUENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD»

Realizado el 3 y 4 de agosto de 2023

Duración: **16 horas**

Créditos: **4**



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
DIRECTOR DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN EN SALUD
Y CALIDAD



LIC. ROSA MARÍA ALCALÁ ROBLEDO
JEFA DEL DEPARTAMENTO ESTATAL DE ENSEÑANZA Y
CAPACITACIÓN

DESIC/DEEC / No. Curso: 48/2023 Folio: 113

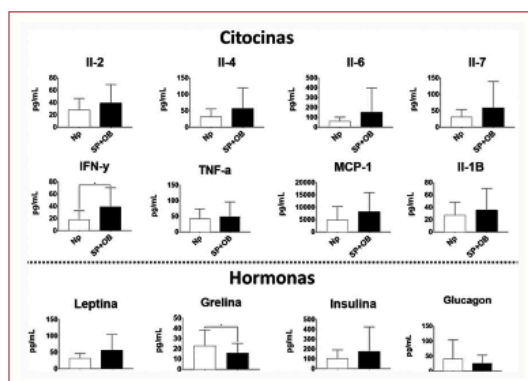


Figura 1. Analitos determinados en muestras de leche materna. NP: normopeso (n = 19). SP+OB: sobrepeso y obesidad (n = 31). Las diferencias en los analitos estudiados se analizaron por ANOVA de una vía y se hizo una comparación múltiple de Bonferroni. *p < 0.05.

Inmunología

O-394

Disminución en la expresión de marcadores de activación en células NK de pacientes con infección por SARS-CoV-2

Kenia Y. Osuna-Espinoza¹, Manuel Mejía-Torres¹, Adrián Camacho-Ortiz², Eduardo Pérez-Alba², Azalia M. Martínez-Castilla¹, Mario C. Salinas-Carmona¹ y Adrián G. Rosas-Taraco¹

¹Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; ²Departamento de Infectología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Monterrey, Nuevo León, México

Antecedentes: Las infecciones por virus respiratorios son de principal interés en la salud pública debido a su potencial de generar pandemias. La pandemia de COVID-19 causada por el SARS-CoV-2 ha generado numerosas investigaciones que asocian los cambios en la respuesta del sistema inmunitario con la gravedad de este padecimiento. En la respuesta a infecciones virales participan células citotóxicas en el control de la infección. Las células *natural killer* (NK) son linfocitos citotóxicos de la inmunidad innata que fungen como primera línea de defensa en infecciones virales mediante la eliminación directa de células infectadas, por mecanismos citolíticos y secreción de citocinas inflamatorias. En la infección por SARS-CoV-2, los estudios han reportado cambios específicos en el fenotipo de las células NK, tales como la disminución de la expresión de marcadores de activación, liberación de mediadores citotóxicos (perforinas y granzimas B) y producción de citocinas (TNF- α e IFN- γ), lo que sugiere menor actividad de las células NK durante la infección por SARS-CoV-2. Aunque la mayoría de las investigaciones realizadas han demostrado una disminución de la capacidad citotóxica de estas células, otras sugieren lo contrario, reportando

mayor activación de las células NK en pacientes con COVID-19.

Objetivo: Debido a que los datos continúan sin ser concluyentes, es importante esclarecer el estado funcional de las células NK en la infección por SARS-CoV-2 y su relación con el desenlace clínico de estos pacientes. **Método:** Estudio prospectivo, transversal y comparativo. La población se conformó por 15 pacientes de 20-85 años ingresados al Hospital Universitario José Eleuterio González con diagnóstico de neumonía por SARS-CoV-2 durante el periodo de julio de 2022 a febrero de 2023, además de 5 sujetos clínicamente sanos como controles. Se analizaron muestras obtenidas de sangre venosa periférica al ingreso y al tercer día de hospitalización. En cada muestra de sangre se hicieron conteos absolutos de poblaciones celulares (leucocitos, linfocitos, NK, linfocitos B, linfocitos T) y determinación del estado de activación de células NK mediante la expresión de LAMP1, IFN- γ , KIR2DL1 y granzimas B, utilizando análisis de citometría de flujo de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism 5. Un valor de p < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. **Resultados:** No se observaron diferencias significativas en los recuentos absolutos de las poblaciones celulares entre el grupo control y las muestras de los pacientes con COVID-19 al ingreso (p > 0.05). La expresión de marcadores de activación en pacientes COVID-19 está alterada. El porcentaje de células NK positivas a LAMP1 fue significativamente mayor en los pacientes con COVID-19 que en el grupo control (p < 0.05). Respecto al resto de los marcadores (IFN- γ , KIR2DL1 y granzimas B), no se observaron diferencias significativas, pero mostraron una tendencia al aumento. **Conclusiones:** Mostramos evidencias de una mayor expresión del marcador de activación LAMP1 en las células NK de los pacientes COVID-19 que pudiera comprometer una adecuada respuesta contra el SARS-CoV-2.

Inmunología

O-405

Metaanálisis por bioinformática integrativa de perfiles de expresión génica en pacientes con depresión: descifrando mecanismos moleculares y nuevos blancos terapéuticos

Elisama Covarrubias-Martínez¹, Santiago E. Rojas-Gutiérrez¹, César V. Elizondo-Solis¹, Alejandra Montoya-Rosales², Mario C. Salinas-Carmona¹ y Noé Macías-Segura¹

¹Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina; ²Departamento de Inmunomoduladores, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Antecedentes: El trastorno depresivo mayor (TDM) es una condición psiquiátrica altamente prevalente de etiología compleja y manifestaciones clínicas heterogéneas. A pesar de los avances en el entendimiento del TDM, los mecanismos moleculares subyacentes continúan siendo, en gran medida, descono-



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certifies that the following person attended and participated in

IMMUNOLOGY2024™
Annual Meeting
of
The American Association of Immunologists
on May 3 - 7, 2024.

KENIA OSUNA ESPINOZA

*Loretta L. Doan, Ph.D., Chief Executive Officer
The American Association of Immunologists, Inc.*

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Kenia Yaretzy Osuna Espinoza

**Candidata para obtener el Grado de Doctorado en Ciencias con Orientación
en Inmunología**

Título de tesis: Evaluación del Perfil de Activación de Células NK en Pacientes
con Infección Grave por SARS-CoV-2

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Culiacán, Sinaloa, México el 12 de octubre de 1995,
hija de Ignacio Osuna Ramírez y Juany Espinoza Calderón.

Educación:

Licenciada en Nutrición, Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía de la
Universidad Autónoma de Sinaloa. 2018. Graduada con honores.

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica, Facultad de
Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2021.