

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y CLÍNICA

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR LINFOCITOS T
EN PACIENTES HOSPITALIZADOS CON ENFERMEDAD POR CORONAVIRUS
(COVID-19). PANAMÁ 2020-2021.

por
RODERICK RAMÓN CHEN CAMAÑO

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025

DEDICATORIA

A mi amada esposa, Lissie, compañera incansable de este viaje. Tu amor, paciencia y apoyo constante fueron la luz que me sostuvo en las horas más largas y el refugio donde encontré fuerzas para seguir. Este logro es también tuyo, porque cada paso estuvo acompañado por tu voz y tu presencia.

A mis hijos, Camila, Abril y Miguel Ángel, por el tiempo que les robé para entregarlo a este sueño. Ustedes son mi inspiración y la razón de mi perseverancia; en cada página de este trabajo laten sus sonrisas y su inocencia. Este esfuerzo es una ofrenda a su futuro, porque todo lo que hago busca darles alas más firmes para volar.

A mis padres, Marisol y Ramón, quienes me enseñaron que la disciplina y la resiliencia son semillas que florecen en metas alcanzadas. Sus enseñanzas fueron la brújula silenciosa que me guió incluso en la oscuridad.

A mis hermanos, cuya presencia y apoyo a mi familia durante mis ausencias ayudaron a sostener el equilibrio y a suavizar el peso de este desafío.

RECONOCIMIENTOS

Quiero iniciar expresando mi más profundo agradecimiento a los pacientes que, en medio de la pandemia de COVID-19, aceptaron participar voluntariamente en este estudio. Muchos de ellos no sobrevivieron, y este trabajo se levanta también como un homenaje a su memoria y a su valentía.

A mis compañeros de mil batallas del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, quienes me acogieron con fraternidad y compartieron conmigo no solo su conocimiento y experiencia, sino también su apoyo incondicional en los momentos más arduos.

A mis tutores, la Dra. Sandra López-Vergès y el Dr. Rodrigo DeAntonio, por su guía incansable, su rigor científico y su compromiso con la excelencia. Su ejemplo me enseñó que la ciencia florece con disciplina, humildad y trabajo en equipo. En especial, a la Dra. Sandra, por su paciencia, comprensión y enseñanzas, que me acompañaron como un faro constante a lo largo de este camino.

A mi Maestro Clínico, Tony Suárez, por la oportunidad de ejercer Medicina Tropical en el marco del doctorado y por su confianza para desafiar mis propios límites.

A mi país, Panamá, la Universidad de Panamá – Facultad de Medicina y a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de formarme en la investigación científica, contribuyendo así a un futuro con más conocimiento y más posibilidades para nuestra gente.

Finalmente, a todas las personas e instituciones que, de una u otra manera, fueron parte de esta travesía: gracias. Este logro no es solo mío; es el reflejo de un esfuerzo colectivo y de la certeza de que, incluso en los tiempos más oscuros, la ciencia y la solidaridad pueden iluminar nuevos caminos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
CAPÍTULO UNO: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, FUNDAMENTO TEÓRICO	1
Planteamiento del Problema y Justificación	1
Fundamento Teórico	5
CAPÍTULO DOS: OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
General	15
Específicos	15
CAPÍTULO TRES: METODOLOGÍA	16
Diseño de estudio	16
Criterios de elegibilidad	17
Población y muestra de estudio	18
Del reclutamiento del paciente	21
De la severidad de la enfermedad	24
De los experimentos a realizar	25
Citometría de flujo	27
Procedimientos para la recolección de información, manejo de la confidencialidad y aspectos éticos	32
Análisis estadístico	34

CAPÍTULO CUATRO: RESULTADOS	36
Análisis Univariado -----	36
Análisis Bivariado -----	39
Análisis Multiparamétrico-----	42
CAPÍTULO CINCO: DISCUSIÓN	51
REFERENCIAS	59
ANEXOS	68
Anexo 1: Resumen de Estudio Primario EC-CNBI-2020-05-65-----	68
Anexo 2: Aprobación del Protocolo Primario EC-CNBI-2020-05-65 por parte del Comité Nacional de Bioética de la Investigación-----	70
Anexo 3: Autorización del Comité de Bioética de participación del Dr. RODERICK CHEN- CAMAÑO MD PhDc y del Dr. RODRIGO DeANTONIO en el estudio EC-CNBI-2020-05-65 -----	73
Anexo 5: Aprobación del Protocolo del sub-estudio EC-CNBI-2021-10-156 por parte del Comité Nacional de Bioética de la Investigación -----	74
Anexo 5: Escala de progresión clínica de la Organización Mundial de la Salud. -----	77
Anexo 6: Protocolo de Preparación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) y de Tinción Multiparámetrica para Citometría de Flujo Espectral (Protocolo para tinción de PBMCs en placas de 96 pozos)-----	78

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1	22
Tabla 2	25
Tabla 3	28
Tabla 4	31
Tabla 5	37
Tabla 6	38
Tabla 7	40
Tabla 8	41
Tabla 9	43
Tabla 10	43
Tabla 11	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	6
Figura 2	8
Figura 3	10
Figura 4	30
Figura 5	32
Figura 6	45
Figura 7	46
Figura 8	47
Figura 9	49
Figura 10	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1:	68
Anexo 2:	70
Anexo 3:	73
Anexo 4:	74
Anexo 5:	77
Anexo 6:	78

RESUMEN

Introducción: La pandemia por COVID-19 representó un desafío sin precedentes para los sistemas de salud. La infección por SARS-CoV-2 puede inducir una disfunción inmunológica significativa, especialmente en casos de COVID-19 severa. Esta se caracteriza por linfopenia, hiperinflamación y alteraciones funcionales en subpoblaciones de linfocitos T. Aunque se ha avanzado en la respuesta humoral, faltan estudios locales que integren inmunofenotipificación multiparamétrica en cohortes hospitalarias panameñas.

Objetivo: Caracterizar la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes hospitalizados con COVID-19, evaluando sus subpoblaciones y expresión fenotípica mediante citometría de flujo espectral, y determinar su asociación con la severidad clínica.

Métodos: Se realizó un estudio transversal con muestras de sangre periférica de 177 pacientes adultos hospitalizados con diagnóstico confirmado de COVID-19, clasificados en enfermedad moderada (n=129) y severa (n=48). Se aplicó citometría de flujo espectral multiparamétrica para analizar subpoblaciones de linfocitos T, usando un panel de 22 marcadores. Los datos fueron evaluados mediante análisis manual y herramientas de reducción de dimensionalidad (UMAP) y clustering no supervisado (FlowSOM). Se integraron datos clínicos y biomarcadores inflamatorios (IL-6, ferritina, dímero D) para establecer correlaciones inmuno-clínicas.

Resultados: La edad media fue de 51 años (RIC: 43–59), con predominio masculino (62.1%). El 27.1% (n=48) presentó enfermedad severa y el 72.9% (n=129) enfermedad moderada. La presencia de ≥ 2 comorbilidades se asoció significativamente con mayor

probabilidad de enfermedad severa ($p\ 0.0144$). Los casos severos mostraron niveles significativamente más elevados de IL-6, ferritina y dímero D ($p < 0.05$). A nivel inmunológico, se evidenció una pérdida significativa de subpoblaciones TEMRA CD4+ y Vírgen CD8+. Se identificaron clústeres específicos con alta expresión de PD-1, CD69 y CD38 asociados a fenotipos disfuncionales en los casos graves.

Conclusiones: En esta cohorte hospitalaria panameña, compuesta por adultos predominantemente varones de mediana edad, la presencia de múltiples comorbilidades y biomarcadores inflamatorios elevados se asoció con mayor severidad clínica. A nivel inmunológico, la COVID-19 severa se caracterizó por una profunda reestructuración del compartimento T, con pérdida de subpoblaciones clave para el control viral y expansión de perfiles disfuncionales. La integración de citometría espectral con parámetros clínicos y bioquímicos refuerza su utilidad como herramienta diagnóstica y pronóstica en el contexto de enfermedades infecciosas emergentes.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, respuesta inmune adaptativa, respuesta inmune celular, linfopenia, linfocitos T CD3+CD4+ auxiliares, linfocitos T CD3+CD8+ citotóxicos, memoria inmune, citometría de flujo

CAPÍTULO UNO: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, FUNDAMENTO TEÓRICO

Planteamiento del Problema y Justificación

A finales de diciembre de 2019, se notificó a la Organización Mundial de la Salud un conglomerado de casos de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, República Popular de China (WHO, 2020b). Para la segunda semana de enero de 2020, las autoridades de salud del país asiático identificaron al agente causal como un nuevo tipo de coronavirus, el 2019-nCoV (WHO, 2020c), que posteriormente fue nombrado como SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratorio Agudo Severo por Coronavirus 2) y la enfermedad relacionada como COVID-19, por el Comité Internacional de Taxonomía Viral y la Organización Mundial de la Salud, respectivamente (ICTV, 2020; WHO, 2020c). El virus se diseminó rápidamente a nivel mundial, alcanzando niveles pandémicos el 11 de marzo de 2020 (WHO, 2020d). Desde la notificación del primer caso en Panamá y luego de tres años de pandemia, se identificaron en el país poco más de un millón de casos confirmados y casi nueve mil muertes relacionadas (WHO, 2023).

La COVID-19 tiene un espectro clínico amplio, que va desde estados asintomáticos hasta falla multiorgánica y muerte (Chen et al., 2020; Guan et al., 2020; Huang et al., 2020; McIntosh et al., 2021; Wang et al., 2020; Wu & McGoogan, 2020). En un informe del Centro para el Control de Enfermedades de China (China-CDC), que incluyó a 44 mil pacientes con diagnóstico confirmado por laboratorio, se documentó que el 81.0% de los casos de COVID-19 presentó enfermedad leve, el 14.0% severa, el 5.0% crítica y el 2.3% falleció (Wu &

McGoogan, 2020). A pesar de que la letalidad global fue baja (2.2%) (WHO, 2020c), se documentaron letalidades entre el 20.0% y el 40.0% en pacientes hospitalizados (Cummings et al., 2020; Richardson et al., 2020), por lo que el estudio de esta subpoblación resulta clave para el desarrollo de intervenciones que busquen reducir la mortalidad intrahospitalaria por COVID-19 o a futuro por enfermedades virales similares.

Durante la pandemia de COVID-19, Panamá enfrentó múltiples olas epidémicas en las que la población estuvo expuesta a varias variantes del SARS-CoV-2, tal como lo demostraron diversos estudios (Diaz et al., 2021; Franco et al., 2021; Lezcano-Coba et al., 2025). Durante marzo–abril de 2020 se llevó a cabo un análisis molecular de 313 genomas casi completos derivados de 4,210 casos confirmados de COVID-19 en el país, lo que permitió caracterizar la diversidad temprana del SARS-CoV-2. Este estudio reveló la introducción simultánea del linaje global B.1 y de linajes de la rama 19B, como A.2.4 y sus sub-linajes emergentes como A.2.5, evidenciando una rápida diversificación viral local que coincidía con las cadenas de transmisión globales en esa fase inicial (Franco et al., 2021).

Entre 2020 y 2022, se registró un cambio sustancial en el panorama viral: grupos científicos en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), aislaron variantes de preocupación como Delta y Mu, además del linaje endémico A.2.5. Mediante ensayos in vitro en líneas celulares Vero-E6 y Calu-3, se evaluó la actividad antiviral de compuestos antimaláricos frente a estas variantes; demostrando que la susceptibilidad varió tanto según el linaje viral, como según el tipo de célula empleada (Quijada et al., 2025).

Ya en el primer semestre de 2024, la vigilancia genómica en Panamá integró monitoreo clínico y ambiental. Mediante secuenciación de aguas residuales, se detectó la sub-variante Ómicron JN.1.16.1 en áreas metropolitanas de la Ciudad de Panamá, antes de ser identificada en muestras clínicas, lo que puso en evidencia una transmisión oculta (críptica)

del virus, que escapaba a la vigilancia tradicional (Gaitan et al., 2024). De manera simultánea, en el muestreo clínico se identificaron diversos sub-linajes Ómicron (JN.1.13.1, JN.1.18, KP.1.1.1, LB.1.2.1 y LB.1.3), pero no JN.1.16.1, subrayando la relevancia de la vigilancia ambiental como herramienta complementaria y de detección temprana (Gaitan et al., 2024).

La estrategia nacional de inmunización contra SARS-CoV-2 en Panamá se inició el 20 de enero de 2021, convirtiéndose en uno de los primeros países de América Latina en implementar un plan de vacunación estructurado. La primera vacuna utilizada fue BNT162b2 (Pfizer-BioNTech, ARNm), tras un acuerdo bilateral con la farmacéutica que permitió recibir los primeros lotes en enero de 2021. Posteriormente, se incorporaron AZD1222 (Oxford-AstraZeneca, vector adenoviral) y, en menor escala, Sputnik V (Gamaleya, vector adenoviral); además de dosis recibidas a través del mecanismo COVAX (MINSA, 2021). La campaña siguió un esquema por fases, priorizando personal sanitario y adultos mayores, para luego extenderse progresivamente a la población general, alcanzando hacia finales de 2021 coberturas superiores al 70% con esquema completo, una de las más altas de la región en ese momento (MINSA, 2023; PAHO, 2021).

La rápida introducción y diversificación de plataformas vacunales en Panamá, permitió evaluar tanto la respuesta inmune inducida por vacunas de ARNm como por vectores adenovirales en una misma población, aportando evidencia relevante en el contexto regional. Estudios comparativos en América Latina han resaltado que la implementación simultánea de múltiples plataformas vacunales aumentó la resiliencia sanitaria y facilitó alcanzar coberturas amplias, a pesar de limitaciones logísticas (Hernandez-Pineda et al., 2024). En el caso panameño, la disponibilidad temprana de BNT162b2, seguida de la introducción de AstraZeneca y Sputnik V, se tradujo en una reducción marcada de la mortalidad y de las hospitalizaciones durante las olas epidémicas de 2021, efecto que se mantuvo en el tiempo

gracias a la posterior aplicación de dosis de refuerzo con vacunas ARNm a partir de fines de 2021 (MINSA, 2022).

En Panamá, los estudios locales sobre la respuesta inmune durante COVID-19 han sido limitados, y se han enfocado mayoritariamente en la respuesta humoral. Esto se debe en parte a la complejidad técnica que implica el estudio del componente celular, que requiere plataformas de citometría multiparamétrica y personal especializado. Esta brecha justifica la necesidad de generar evidencia nacional sobre el perfil celular de la respuesta inmune.

Este protocolo tiene como objetivo caracterizar la respuesta inmune mediada por linfocitos T en pacientes hospitalizados con diagnóstico de COVID-19. En particular, se busca describir y caracterizar el inmunofenotipo de los linfocitos T, así como su estado funcional (efector, regulador, de memoria) a lo largo de la evolución clínica, utilizando citometría de flujo multiparamétrica espectral, una tecnología recientemente incorporada al Centro de Citometría del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). Este trabajo constituye un sub-estudio basado en datos secundarios de-identificados del protocolo primario *“Estudio Prospectivo de la Respuesta Inmune de Pacientes Hospitalizados con Diagnóstico de COVID-19” (EC-CNBI-2020-05-65)*, en el cual la Dra. Sandra López-Vergès, asesora de tesis, funge como Investigadora Principal (Anexo 1 y 2), y el Dr. Rodrigo DeAntonio, co-asesor, como Co-investigador (Anexo 3). El sub-estudio fue aprobado por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación (EC-CNBI-2021-10-156)(Anexo 4) y se enmarca dentro del objetivo específico 7.2.7 del protocolo madre: *“Establecer factores de riesgo de la población e identificar posibles biomarcadores que inciden en la evolución del paciente”*. En este contexto, el presente trabajo pretende responder a las siguientes preguntas:

1. ¿Existe una respuesta linfocítica funcional global en pacientes con COVID-19 severa?

2. ¿Cómo varía el estado efector y de memoria de los linfocitos T durante la evolución clínica de los pacientes hospitalizados con COVID-19?
3. ¿Existen alteraciones fenotípicas en los linfocitos T o en biomarcadores que se relacionen o predigan la severidad de la enfermedad?

Fundamento Teórico

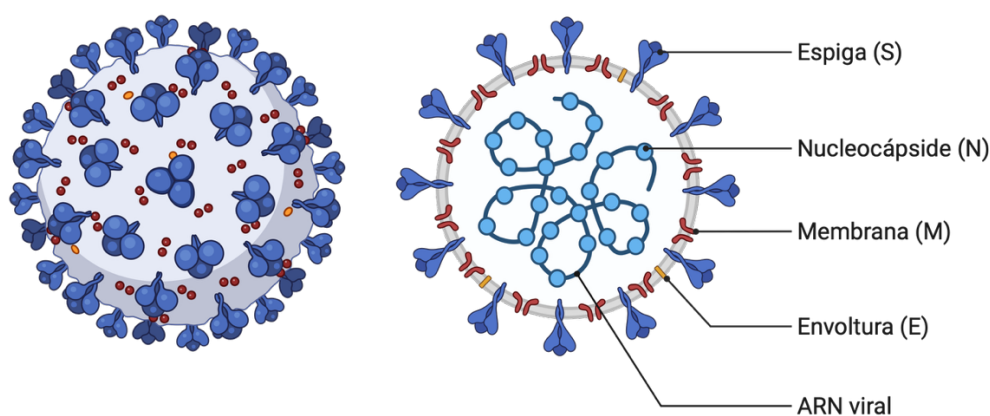
La pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), originada por el SARS-CoV-2 – un nuevo miembro del género *Betacoronavirus* –, impuso una carga sin precedentes sobre los sistemas de salud y la infraestructura científica a nivel global (Haldane et al., 2021). Como virosis emergente, la COVID-19 se asoció a manifestaciones clínicas e inmunopatológicas inicialmente desconocidas o solo parcialmente comprendidas (Mihaescu et al., 2020). Su irrupción demandó un esfuerzo científico sin precedentes, caracterizado por la aceleración de procesos editoriales, apertura de publicaciones y una expansión vertiginosa del volumen de investigación (Ioannidis et al., 2021; Nane et al., 2023), dirigido a caracterizar la estructura molecular del virus, su dinámica de transmisión, la fisiopatología de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas, con especial énfasis en la respuesta inmunológica, tanto innata como adaptativa, donde los linfocitos T desempeñan un papel central (Moss, 2022).

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, género *Betacoronavirus* (β CoV), subgénero *Sarbecovirus* (Diaz, 2020; ICTV, 2020). Cada virión mide aproximadamente ~80-120 nm, con un genoma de ARNm monocatenario no segmentado de sentido positivo [(+)ssRNA] de ~30 kb de tamaño (Zhu et al., 2020)(ver Figura 1), con diez marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés); que codifica cuatro proteínas estructurales (S, proteína de la espiga; E, proteína de la envoltura; M, proteína de la membrana; y N, proteína de la nucleocápside), dos poliproteínas (pp1a y pp1ab), procesadas

en 16 proteínas no estructurales (nsp1 – nsp16), y finalmente, ocho proteínas accesorias (orf3a, orf6, orf7a, orf7b, orf8, orf9b, orf9c y orf10) (Díaz, 2020; V'Kovski et al., 2021; F. Wu et al., 2020). La organización genómica sigue un patrón característico: los genes estructurales y accesorios se ubican en el extremo 3', mientras que los genes no estructurales se localizan en el extremo 5' (Ahmed et al., 2020; F. Wu et al., 2020).

Figura 1

Estructura molecular del SARS-CoV-2



Nota. Creado con Biorender

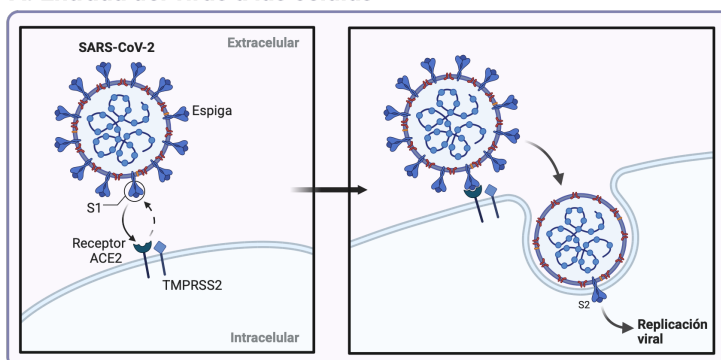
Las proteínas S, M y E se encuentran incrustadas en la membrana lipídica viral, que envuelve al ARN, a su vez rodeado por la proteína de la nucleocápside (Hoffmann et al., 2020; Kyrou et al., 2021; V'Kovski et al., 2021). Funcionalmente, la proteína S media la adhesión y la entrada viral a la célula, a través de su interacción con el receptor ACE2 y la proteasa TMPRSS2 (Hoffmann et al., 2020), la proteína M organiza el ensamblaje y define la morfología viral, la proteína E participa en la gemación y funciona como canal iónico, y la proteína N contribuye al empaquetamiento del genoma y a la regulación de la replicación y transcripción viral (Díaz, 2020; Gordon et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; V'Kovski et al., 2021) (Figura 2A).

La transmisión del SARS-CoV-2 ocurre principalmente a través de partículas respiratorias emitidas por individuos infectados al hablar, toser, estornudar o simplemente respirar, donde tanto gotas grandes como aerosoles ($< 5 \mu\text{m}$) contribuyen de manera significativa (Meyerowitz & Richterman, 2022; Zhou et al., 2021). En particular, los aerosoles pueden permanecer suspendidos en el aire durante períodos prolongados, favoreciendo la diseminación en espacios cerrados y mal ventilados e incluso sobre distancias superiores a un metro (Duval et al., 2022; Zhou et al., 2021)(Figura 2B). Si bien la transmisión por fómites – es decir, a través del contacto con superficies contaminadas seguida de la autoinoculación mucosa – es teóricamente viable, diversos estudios indican que es un mecanismo poco frecuente en condiciones reales, debido a la necesidad de múltiples pasos (contaminación, estabilidad del virus, transferencia eficiente) para que ocurra una infección (Kwon et al., 2023; Short & Cowling, 2023). Estudios experimentales en modelos animales como hámsters han demostrado que la exposición por aerosol provoca cargas virales significativamente más altas y una enfermedad más severa en comparación con la exposición por fómites, lo que refuerza la importancia del modo aéreo en la gravedad de la infección (Port et al., 2021).

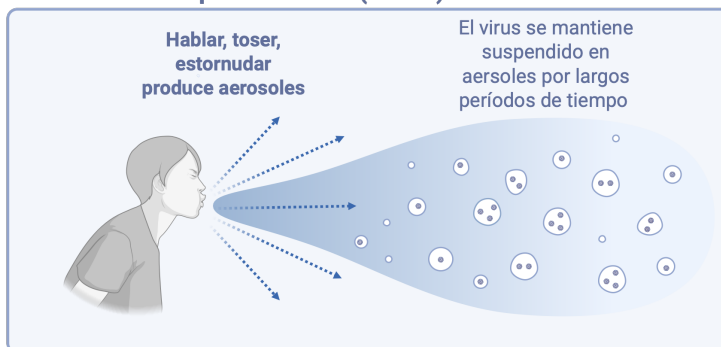
Figura 2

Invasión celular y diseminación viral

A. Entrada del virus a las células



B. Diseminación por aerosoles (<5 um)



Nota. Creado con Biorender

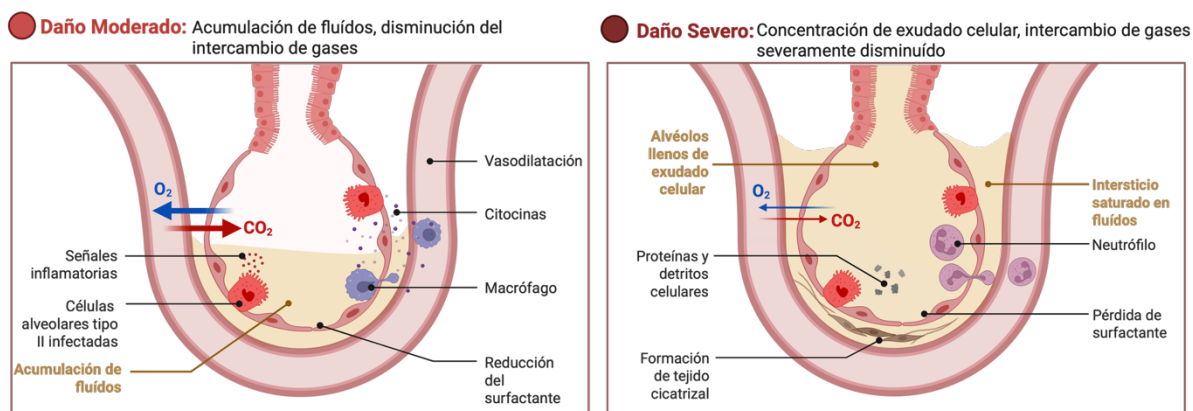
La COVID-19, presenta un espectro clínico muy amplio que va desde infecciones asintomáticas hasta cuadros críticos con falla multiorgánica y muerte (Blanco-Melo et al., 2020; Lucas et al., 2020; Sekine et al., 2020). Entre los síntomas iniciales más frecuentes se encuentran fiebre, tos seca, disnea, mialgias, cefalea, anosmia y ageusia, además de síntomas gastrointestinales como diarrea y náuseas (Chen et al., 2020). La mayoría de los casos (aproximadamente 80%) cursan con enfermedad leve o moderada, que puede manejarse de forma ambulatoria o con hospitalización sin soporte intensivo. Sin embargo, alrededor del 15% progresa a formas graves caracterizadas por neumonía severa, hipoxemia y necesidad de oxigenoterapia, mientras que hasta un 5% desarrolla enfermedad crítica, con síndrome de

distrés respiratorio agudo (SDRA), shock séptico o disfunción orgánica múltiple; condiciones que requieren ingreso en unidades de cuidados intensivos (Cummings et al., 2020; Guan et al., 2020; Huang et al., 2020; Wu & McGoogan, 2020). En pacientes hospitalizados, la mortalidad se ha reportado entre el 20 y el 40%, siendo mayor en adultos mayores, personas con comorbilidades como hipertensión, diabetes, obesidad o enfermedades cardiovasculares, y en pacientes inmunocomprometidos (Cummings et al., 2020; Richardson et al., 2020).

En los cuadros graves de COVID-19, la fisiopatología se asocia a una respuesta inmune exacerbada y descoordinada, caracterizada por hiperinflamación sistémica, elevación de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-10), linfopenia profunda y disfunción de linfocitos T, incluyendo fenómenos de activación excesiva, pérdida de diversidad funcional y agotamiento celular (Laing et al., 2020; Lucas et al., 2020; Mathew et al., 2020). Estos procesos contribuyen al daño alveolar difuso y al desarrollo del SDRA, principal causa de mortalidad en la fase crítica de la enfermedad (Figura 3). El reconocimiento temprano de biomarcadores clínicos y celulares asociados a severidad, como dímero-D, ferritina, IL-6, CD38 o HLA-DR, ha demostrado ser fundamental para guiar intervenciones terapéuticas y estratificar el riesgo de los pacientes (De Biasi et al., 2020; Del Valle et al., 2020; Tang et al., 2020).

Figura 3

Fisiopatología del daño pulmonar en COVID-19



Nota. Creado con Biorender

Por otra parte, tras la fase aguda de la infección, una proporción significativa de individuos desarrolla lo que se conoce como COVID prolongado o “long-COVID”, definido como la persistencia de síntomas más allá de las 12 semanas posteriores a la infección inicial, sin explicación alternativa. Entre los síntomas más frecuentes destacan fatiga, disnea, alteraciones cognitivas (“niebla mental”), disfunción autonómica, dolor musculoesquelético y trastornos del sueño. Estudios inmunológicos han sugerido que la activación sostenida de linfocitos T, junto con la persistencia de marcadores de agotamiento inmunológico, podría desempeñar un papel en la fisiopatología de este síndrome (Files et al., 2021; Santopaolo et al., 2023; Ueland et al., 2025). La heterogeneidad clínica y la posible implicación de mecanismos virales, inflamatorios y autoinmunes convierten al long-COVID en un desafío de salud pública, cuya comprensión es crucial para el desarrollo de estrategias de seguimiento y rehabilitación en los sobrevivientes de la infección.

Para generar intervenciones que impacten la morbi-mortalidad por COVID-19, tanto a nivel poblacional como individual, resulta imprescindible estudiar y comprender la respuesta del sistema inmune a las infecciones virales (Brodin & Davis, 2017; Punt et al., 2018;

Rydzynski Moderbacher et al., 2020). Todos los virus son patógenos intracelulares obligados que dependen de células hospedadoras para sobrevivir y replicarse. Por tanto, su eliminación requiere una respuesta coordinada del sistema inmune innato y adaptativo (Punt et al., 2018). Tras la penetración de las barreras mucosas, el SARS-CoV-2 induce la expresión de interferones tipo I (IFN- α/β) y III, así como otras citoquinas proinflamatorias, que activan las células asesinas naturales (NK) y desencadenan el ensamblaje del inflamasoma (Abbas et al., 2014; Combes et al., 2021; Punt et al., 2018). Estas citoquinas promueven la transcripción de genes estimulados por interferones (ISG), cuyas proteínas ejercen funciones antivirales, como la inhibición de la replicación viral, la modulación de la proliferación celular y la inducción de moléculas MHC-I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I) en células presentadoras de antígenos (APCs) (Abbas et al., 2014; Combes et al., 2021; Punt et al., 2018). Si estas defensas innatas no logran eliminar al patógeno, se desencadena una respuesta adaptativa robusta, orquestada por APCs, linfocitos T ayudadores (CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+) (Grifoni et al., 2020; Punt et al., 2018; Sette & Crotty, 2021; Stephenson et al., 2021).

En aproximadamente el 20.0% de los afectados, la COVID-19 desencadena una respuesta inmune aberrante y no coordinada (Cummings et al., 2020; Rydzynski Moderbacher et al., 2020; Wu & McGoogan, 2020; Zhou et al., 2020), respaldada por hallazgos como la ausencia sistemática de células que expresaban ISG (Combes et al., 2021), una dramática depleción de células plasmocitoides dendríticas (pDC) – fuente primaria de interferón tipo I – (Laing et al., 2020), y una significativa linfopenia con alteraciones fenotípicas del componente linfocitario (Laing et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020), que en conjunto comprometen la respuesta antiviral innata y adaptativa.

Desde el punto de vista clínico, el establecimiento temprano de un pronóstico de la enfermedad, a través de biomarcadores celulares y séricos, resulta imperativo para el manejo terapéutico. Marcadores de activación inmunológica como CD38, HLA-DR y NKG2A en linfocitos T y NK se han asociado con inflamación exacerbada y peor desenlace clínico, particularmente en pacientes hospitalizados con enfermedad severa (De Biasi et al., 2020; Moll-Bernardes et al., 2022; Rha et al., 2021; M. Zheng et al., 2020). De forma complementaria, biomarcadores clínicos como interleucina-6 (IL-6), ferritina sérica, dímero-D y lactato deshidrogenasa (LDH) se han consolidado como predictores tempranos de severidad, reflejando la intensidad de la tormenta inflamatoria y el riesgo de disfunción multiorgánica (Carubbi et al., 2021; Del Valle et al., 2020; Herold et al., 2020; Tang et al., 2020). En conjunto, la inmunofenotipificación multiparamétrica y la determinación de biomarcadores séricos han demostrado ser herramientas diagnósticas y pronósticas útiles en pacientes hospitalizados por COVID-19 (Bobcakova et al., 2022; Mathew et al., 2020).

Las manifestaciones graves de COVID-19 se sostienen en un entorno de hiper inflamación, con aumento de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-10, TNF- α), linfopenia y disfunción de linfocitos T, incluyendo activación excesiva, fenotipos de agotamiento y pérdida de diversidad funcional (Kuri-Cervantes et al., 2020; Mathew et al., 2020; Zhou et al., 2020).

En este contexto, Laing et al. (2020) encontraron que, en relación al desarrollo de COVID-19 severo, las alteraciones fueron más marcadas en los linfocitos T CD8+, donde las subpoblaciones de linfocitos T TEM (efector de memoria), TEMRA (efectora terminal) y TCM (memoria central) se observaron severamente depletadas. Adicionalmente, estudios de citometría de flujo multiparamétrica demostraron que, en los casos más graves, los linfocitos T CD8+ presentaron una sobreexpresión de marcadores de agotamiento como PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4, con una producción reducida de IFN- γ y TNF- α , lo cual sugiere un estado

de disfunción conocido como agotamiento celular (Kusnadi et al., 2021; Wherry, 2011; Wherry & Kurachi, 2015)

Con respecto a los linfocitos T CD4+, se han identificado alteraciones específicas en las subpoblaciones de los mismos (Kaneko et al., 2020). En pacientes con COVID-19 severo, se ha observado una reducción significativa de los linfocitos T helper tipo 1 (Th1) y Th17, junto con un aumento relativo de linfocitos Th2 activados, lo que sugiere un desbalance en la polarización inmunológica (Gil-Etayo et al., 2021). De la misma manera, un estudio empleando modelos regulatorios celulares sugirió que la severidad clínica se correlaciona con una marcada disminución del compartimento Th1 y un incremento de fenotipos Th17 anérgicos, aportando potenciales dianas terapéuticas como la modulación de IFN- γ , TGF- β o IL-10 (Martinez-Sanchez et al., 2022). Otros trabajos han destacado que los linfocitos CD4+ Th17 de memoria central (TCM) específicos a SARS-CoV-2 persisten tras la recuperación, aunque con funcionalidad reducida comparada con respuestas frente a otros virus respiratorios, lo cual podría tener implicaciones en la memoria inmunológica a largo plazo (Kudryavtsev et al., 2022).

De manera crucial, respuestas T robustas – especialmente las mediadas por linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL's) – desempeñan un papel central en el control de la replicación viral y en la eliminación de SARS-CoV-2 (Rydyznski Moderbacher et al., 2020). Sin embargo, en escenarios de estimulación antigénica prolongada, como en infecciones severas o persistentes, los linfocitos T muestran activación sostenida y fenotipos disfuncionales/exhaustos en sangre periférica y tejidos – incluida la regulación de receptores inhibitorios como PD-1 y NKG2A – que se asocian a peor evolución clínica (Bobcakova et al., 2022; De Biasi et al., 2020; Moll-Bernardes et al., 2022; M. Zheng et al., 2020). Estudios longitudinales e integrativos han delineado perfiles inmunológicos y transcriptómicos de “disparo inmunológico

descoordinado” en enfermedad severa que se correlacionan con progresión y desenlace (Lucas et al., 2020; Mathew et al., 2020).

Por otro lado, la memoria inmunológica posterior a la infección o la vacunación se ha mantenido como un campo activo de investigación. Se ha demostrado que los linfocitos T específicos contra SARS-CoV-2 persisten al menos 12 meses después de la infección o vacunación (Guo et al., 2022; Lu et al., 2021; Wang et al., 2023), con predominio de células CD4⁺ de memoria central y CD8⁺ efectores funcionales (Al Saihati et al., 2023; Guerrero et al., 2021; Lin et al., 2022; Wang et al., 2023). En individuos con COVID prolongado, estudios recientes sugieren que la activación sostenida de linfocitos T y la expresión persistente de marcadores de agotamiento, podrían contribuir a la fisiopatología (Files et al., 2021; Santopaolo et al., 2023; Ueland et al., 2025).

CAPÍTULO DOS: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

General

Caracterizar el componente adaptativo de linfocitos T en la respuesta inmune generada contra SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con COVID-19, en centros de tratamiento de la Ciudad de Panamá durante los años 2020 y 2021.

Específicos

1. Caracterizar el inmunofenotipo de los linfocitos T durante la evolución clínica de los sujetos hospitalizados con COVID-19.
2. Evaluar la función regulatoria y citotóxica de las distintas poblaciones de linfocitos T durante la evolución clínica de los sujetos participantes.
3. Relacionar potenciales biomarcadores y la actividad de las subpoblaciones de linfocitos T con la severidad clínica de la COVID-19 en la población participante.

Hipótesis de trabajo

Los pacientes hospitalizados con COVID-19 severa tienen una actividad linfocítica no funcional, en comparación con aquellos con enfermedad moderada.

CAPÍTULO TRES: METODOLOGÍA

Diseño de estudio

Este estudio corresponde a un análisis de datos secundarios derivados del protocolo EC-CNBI-2020-05-65 (Anexos 1 y 2), cuyo objetivo general es caracterizar el componente adaptativo de la respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados con COVID-19, con énfasis particular en el análisis del compartimento linfocitario T.

Los datos primarios fueron recolectados en el marco del estudio “*Estudio Prospectivo de la Respuesta Inmune de Pacientes Hospitalizados con Diagnóstico de COVID-19*” (código de aprobación EC-CNBI-2020-05-65, emitido por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá; Anexo 2), en el que la Dra. Sandra López-Vergès (Asesora de tesis) se desempeñó como Investigadora Principal y el Dr. Rodrigo DeAntonio (Co-asesor) como Coinvestigador (Anexo 3).

A partir de la base de datos generada en el estudio EC-CNBI-2020-05-65, tras un proceso riguroso de anonimización, se recopilaron variables demográficas y clínicas relevantes para la estratificación de la severidad de la enfermedad. Estas incluyeron necesidad de oxigenoterapia, intubación orotraqueal, ventilación mecánica invasiva, cociente pO_2/FiO_2 , uso de vasopresores, terapia de reemplazo renal (diálisis) y soporte con membrana de oxigenación extracorpórea (ECMO), de acuerdo con los criterios propuestos por el WHO (2020a).

Bajo el objetivo específico 7.2.7 del protocolo original, dentro del sub-estudio (EC-CNBI-2021-10-156, Anexo 4), se caracterizó y analizó la respuesta inmunológica celular

mediada por linfocitos T durante el curso clínico de la enfermedad. Para ello, se emplearon muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés), previamente recolectadas en el marco del estudio madre, a las cuales se les aplicó un panel de citometría de flujo multicolor. Este panel estuvo basado en la detección de antígenos de clúster de diferenciación (CD), que son proteínas de membrana diferencialmente expresadas en poblaciones celulares específicas, cuya expresión varía según el estado de activación, diferenciación o memoria celular (Punt et al., 2018).

El análisis estadístico incluyó estadísticos descriptivos de tendencia central y dispersión para caracterizar a la población de estudio. Se exploraron asociaciones bivariadas entre la severidad clínica y las variables demográficas, clínicas e inmunológicas. Para las variables categóricas se utilizó la prueba exacta de Fisher o la prueba chi-cuadrado, según correspondiera. Para variables continuas, se aplicaron pruebas *t* o *z* en casos de distribución paramétrica y la prueba de Wilcoxon para distribuciones no paramétricas.

Criterios de elegibilidad

Fueron considerados elegibles para este sub-estudio los sujetos previamente reclutados en el protocolo EC-CNBI-2020-05-65, que contaran con una muestra con un tiempo transcurrido igual o mayor a siete días desde la fecha de inicio de síntomas (FIS), con el objetivo de analizar la respuesta adaptativa de las células T en el momento en el cual estas tienen un rol primordial junto a la respuesta adaptativa humoral (Edmans et al., 2020; Kalimuddin et al., 2021; Koutsakos et al., 2023). Los criterios de inclusión para el estudio de la respuesta de las células T en pacientes hospitalizados fueron los siguientes:

1. paciente del estudio madre con suficiente información demográfica y clínica para poder clasificar la severidad de la enfermedad,

2. paciente del estudio madre con por lo menos una muestra de igual o mayor de 7 días de inicio de síntomas,
3. paciente del estudio madre con muestras de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) conservadas en nitrógeno líquido.

Se excluyeron aquellos participantes que no disponían de muestras de PBMCs suficientes para la ejecución de los paneles de citometría de flujo (menos de un millón de PBMCs viables).

Población y muestra de estudio

El análisis se realizó a partir de una muestra no probabilística, teniendo como universo de referencia la población reclutada en el estudio primario EC-CNBI-2020-05-65 (Anexo 1). Esta población incluyó pacientes hospitalizados con diagnóstico confirmado de COVID-19, provenientes de tres instituciones de salud en la Ciudad de Panamá: (1) el Hospital Santo Tomás (Ministerio de Salud), (2) el Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid (Caja de Seguro Social), y (3) el Hospital COVID-Ciudad de la Salud (Caja de Seguro Social).

Para el cálculo de la muestra, se utilizó la población de 880 individuos adultos a reclutar en el estudio primario (EC-CNBI-2020-05-65). De aquí, se empleó la fórmula para el cálculo del tamaño de muestra para poblaciones finitas, a saber:

$$n = \frac{z^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{(z^2 \cdot p \cdot q) + e^2(N - 1)} \rightarrow n_{adultos} \cong 187 \text{ sujetos}$$

Donde: “*n*” = tamaño de la muestra; “*z*” = estadístico *z* para un nivel de confianza de 95% (1.96 para pruebas de dos colas); “*p*” es la proporción en la población de la característica a evaluar, según la clasificación de Maucourant et

al. (2020) la proporción de pacientes severos (incluyendo severos y críticos), fue de 0.19; “ q ” = $1-p = 0.81$; “ N ” = población finita, en nuestro caso, 880 adultos; “ e ” = es el error alfa permitido, 0.05.

Reemplazando, obtenemos:

$$n = \frac{1.96^2 \cdot 0.19 \cdot 0.81 \cdot 880}{(1.96^2 \cdot 0.19 \cdot 0.81) + 0.05^2(880-1)} \rightarrow n = \frac{520.27}{2.7887} \rightarrow n = 186.6 \rightarrow n_{adultos} \cong 187 \text{ sujetos}$$

Para los análisis dentro de la población adulta (comparación de grupo con enfermedad severa vs no severa), se realizó un cálculo del tamaño muestral basados en la fórmula para la comparación de dos medias, que incluye la fórmula del cálculo muestral para cada grupo de comparación (n') y la fórmula del cálculo de la varianza (S^2), a saber:

$$n = \frac{2 \cdot S^2 \cdot (z_{\alpha} + z_{\beta})}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}$$

donde “ S^2 ” = varianza entre grupos; “ z_{α} ” = estadístico z para un nivel de confianza de 95% (1.96 para pruebas de dos colas); “ z_{β} ” = estadístico z correspondiente a un poder de 0.8 (0.84); “ $\bar{X}_1$; $\bar{X}_2$ ” = medias de grupos a comparar.

$$S^2 = \frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

donde “ s_1^2 ; s_2^2 ” = son las varianzas de cada grupo; “ n_1 ; n_2 ” = son los totales de observaciones en cada grupo

Basándonos en la disminución de linfocitos observada en pacientes con enfermedad severa (Guan et al., 2020; Wang et al., 2020; C. Wu et al., 2020) y considerando que la población de estudio son los linfocitos T, se realizó una búsqueda en la literatura de los estimados de referencia de linfocitos, con el objetivo de comparar poblaciones adultas. Se encontraron valores de mediana y rango intercuartil (IQR, por sus siglas en inglés) para pacientes con y sin enfermedad severa (C. Wu et al., 2020); por lo que se transformó cada IQR a desviación estándar (SD) y luego a varianza del grupo (s^2), para utilizar las fórmulas descritas. Para pacientes sin enfermedad severa, C. Wu et al. (2020) encontraron que la población media de linfocitos fue de $1.08 \times 10^9/L$ (IQR 0.72 – 1.45) y para pacientes severos fue de $0.67 \times 10^9/L$ (IQR 0.49 – 0.99), con diferencia estadísticamente significativa ($p 0.004$). Utilizando la regla de que una desviación estándar es aproximadamente $4/3$ del IQR, transformamos IQR a s^2 , así:

Para pacientes no severos:

$$IQR = (1.45 - 0.72) \rightarrow IQR = 0.73, \text{ convirtiendo a } SD \rightarrow SD = 0.73 / 1.33 \rightarrow SD = 0.54$$

$$\text{Luego, la varianza } (s^2) \text{ es calculada: } s^2 = SD^2 \rightarrow s_{NoSeveros}^2 = 0.2916$$

Para pacientes severos:

$$IQR = (0.99 - 0.49) \rightarrow IQR = 0.50, \text{ convirtiendo a } SD \rightarrow SD = 0.50 / 1.33 \rightarrow SD = 0.37$$

$$\text{Luego, la varianza } (s^2) \text{ es calculada: } s^2 = SD^2 \rightarrow s_{Severos}^2 = 0.1369$$

Utilizando la mediana de población de linfocitos de cada grupo (no severos: $1.08 \times 10^9/L$ [IQR 0.72 – 1.45] y severos $0.67 \times 10^9/L$ [IQR 0.49 – 0.99]), su IQR transformado a s^2 (no severos: 0.2916; severos: 0.1369) y el total de observaciones en cada grupo (no severos: 117; severos: 84), obtenemos:

$$S^2 = \frac{s_{noSevero}^2(n_{noSevero} - 1) + s_{Severo}^2(n_{Severo} - 1)}{(n_{noSevero} + n_{Severo} - 2)}$$

$$S^2 = \frac{0.2916(117-1)+0.1369(84-1)}{(117+84-2)} \rightarrow S^2 = 0.2271$$

Con la varianza calculada, se obtuvo el tamaño de muestra por grupo de comparación:

$$n' = \frac{2 \cdot S^2 \cdot (z_\alpha + z_\beta)^2}{(\bar{X}_{noSevero} - \bar{X}_{Severo})} \rightarrow n' = \frac{2 \cdot 0.2271 \cdot (1.96 + 0.84)^2}{(1.08 - 0.67)^2}$$

$$n' = 21.2 \rightarrow n' \cong 21 \text{ sujetos adultos por grupo}$$

De aquí entonces, la muestra total del estudio es de 187 sujetos para la caracterización general y para la comparación intragrupo, la muestra es de al menos 21 participantes por grupo.

Del reclutamiento del paciente

Dado que este estudio se basa en el análisis de datos secundarios, no se realizó contacto directo con los sujetos participantes. Todos los datos utilizados fueron previamente recolectados en el marco del protocolo EC-CNBI-2020-05-65, el cual incluyó el reclutamiento de 188 pacientes adultos hospitalizados con diagnóstico confirmado de COVID-19, con posterior exclusión de 11 sujetos, quedando 177, que fueron utilizados para la caracterización general de la cohorte.

La información fue extraída de la base de datos anonimizada del estudio primario, y comprendió las siguientes categorías de variables (Tabla 1):

1. Datos demográficos: edad, fecha de nacimiento y sexo biológico.
2. Datos clínicos al ingreso hospitalario: fecha de hospitalización, diagnósticos de ingreso, comorbilidades, fecha del primer síntoma, síntomas al momento del reclutamiento, hallazgos del examen físico inicial, así como exámenes de laboratorio pertinentes, y tratamiento recibido al ingreso.
3. Datos de evolución clínica intrahospitalaria: síntomas y signos presentados durante la hospitalización, hallazgos físicos relevantes, resultados sucesivos de laboratorio y gabinete, y modificaciones en el esquema terapéutico.
4. Recorrido intrahospitalario: movimientos entre salas o unidades de cuidado (sala general, cuidados intensivos, intermedios u otros servicios).
5. Desenlace clínico: condición al egreso (alta médica o fallecimiento), diagnósticos adquiridos durante la hospitalización, tratamientos recibidos al momento del desenlace, diagnósticos relacionados con dicho desenlace y estado clínico al egreso.

Tabla 1

Detalle de variables recolectadas para el estudio

Tipo de variable	Variable	Valores/Categorías
Demográfica	Edad	Años
Demográfica	Fecha de nacimiento	Fecha
Demográfica	Sexo biológico	Femenino, Masculino
Clínica	Fecha de hospitalización	Fecha
Clínica	Diagnósticos de ingreso,	Diagnósticos según CIE-10
Clínica	Comorbilidades	Asma, Bronquiectasias, Convulsiones, Cáncer, Demencia, Depresión, Desorden NeuroMusc, Diabetes Mellitus, Discapacidad, ECV, Embolia Pulmonar, Enf Cardiovasc, EnfHep , EnfPul Intersticial, EPOC, Fibrosis quística, Hemoglobiopatía, Hiperreactividad bronquial, HTA Pulmonar, Obesidad, VIH

Clínica	Fecha de inicio síntomas	Fecha
Clínica	Síntomas al momento del reclutamiento	Ageusia, Anosmia, Cefalea, Conjuntivitis, Diarrea, Disnea, Escalofríos, Fatiga, Fiebre, Hiporexia, Malestar general, Mialgias, Náuseas, Odinofagia, Otagia, Rinorrea, Taquipnea, Tos, Vómitos
Clínica	Laboratorios	Hemoglobina (g/dL), Hematocrito (%), Leucocitos ($\times 10^9/L$), Neutrófilos ($\times 10^9/L$ o %), Linfocitos ($\times 10^9/L$ o %), Eosinófilos ($\times 10^9/L$ o %), Plaquetas ($\times 10^9/L$), Nitrógeno de urea (mg/dL), Creatinina (mg/dL), Bilirrubina Directa (mg/dL), Bilirrubina Indirecta (mg/dL), Alanina Transaminasa (U/L), Aspartato Transaminasa (U/L), Fosfatasa Alcalina (U/L), Albúmina (g/dL), Proteína Total (g/dL), Tiempo de Protrombina (segundos, INR), Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (segundos), Dímero D ($\mu g/mL$ FEU), Ferritina (ng/mL), Proteína C Reactiva (mg/L), Velocidad de Eritrosedimentación (mm/h), Procalcitonina (ng/mL), Interleucina-6 (pg/mL), Glucosa (mg/dL).
Clínica	Tratamientos recibidos	Corticoides sistémicos (Dexametasona, Metilprednisolona, Prednisona), Inmunomoduladores anti-IL-6R (Tocilizumab, Sarilumab), Antivirales (Remdesivir), Anticoagulantes (Heparina sódica, Enoxaparina), Terapia de soporte (Oxigenoterapia: cánula nasal, mascarilla simple, alto flujo, VMNI, VMI), Antibióticos/antivirales experimentales (Azitromicina, Lopinavir/ritonavir, Hidroxicloroquina), Otros de uso local (Colchicina, Ivermectina).
Clínica	Hallazgos relevantes del examen físicos	Signos vitales (Fiebre, Taquicardia, Taquipnea, Hipotensión, Saturación de O_2), Manifestaciones respiratorias (Disnea, Uso de músculos accesorios, Cianosis, Tiraje intercostal), Parámetros de oxigenación ($PaO_2/FiO_2 < 300$ mmHg, $PaO_2/FiO_2 < 200$ mmHg), Manifestaciones neurológicas (Confusión, Somnolencia, Agitación), Manifestaciones hemodinámicas (Shock, Necesidad de vasopresores), Manifestaciones generales (Fatiga intensa, Astenia, Dolor torácico, Anorexia).
Clínica	Desenlace clínico	Egresado vivo, Egresado fallecido

Nota. Abreviaturas: CIE-10: Clasificación Internacional de Enfermedades, décima revisión, Desorden NeuroMusc: Desorden neuromuscular, ECV: Enfermedad cerebrovascular, Enf Cardiovasc: Enfermedad cardiovascular, EnfHep: Enfermedad hepática, EnfPul Intersticial: Enfermedad pulmonar intersticial, EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, HTA Pulmonar: Hipertensión arterial pulmonar, INR: International Normalized Ratio, O_2 : Oxígeno, PaO_2/FiO_2 : Relación entre presión arterial de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno, VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana, VMI: Ventilación mecánica invasiva, VMNI: Ventilación mecánica no invasiva.

De la severidad de la enfermedad

Para categorizar la severidad de la COVID-19 en los participantes y estudiar las relaciones con la actividad de los linfocitos T, se utilizó la Escala de Progresión Clínica de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020a), que refleja el curso clínico del paciente y el uso de recursos durante la enfermedad. La escala provee una medida de enfermedad que va desde “0” (no infectado) a “10” (fallecido), enfocándose en elementos que se obtienen rápidamente de los expedientes clínicos (oxigenoterapia, intubación y ventilación mecánica, cociente pO_2/FiO_2 , uso de vasopresores, diálisis o membrana de oxigenación extracorpórea); y reconoce que la ventilación mecánica provee soporte vital a un paciente críticamente enfermo, aunque la supervivencia se ve afectada por la severidad de la falla respiratoria y el desarrollo de falla orgánica. Así, la herramienta permite clasificar a los pacientes en: no infectado, enfermedad leve (ambulatorio), enfermedad moderada (hospitalizado), enfermedad severa (hospitalizado) y fallecido (Anexo 5).

En nuestro contexto, se segregaron los sujetos en dos grupos, “COVID-19 severo” y “COVID-19 moderado”. Se consideraron casos de “COVID-19 severo” aquellos que se clasificaron según la escala en “fallecido” y en “enfermedad severa”; y con “COVID-19 moderado”, aquellos que presentaron parámetros de “enfermedad moderada”, ya que “enfermedad leve” constituye pacientes ambulatorios, que no es el foco del estudio (Tabla 2).

Tabla 2

Adaptación utilizada de la Escala de Progresión Clínica de la Organización Mundial de la Salud

Estado clínico según OMS	Adaptación para el estudio
Ambulatorio: No infectado	No utilizado
Ambulatorio: Enfermedad leve	No utilizado
Hospitalizado: Enfermedad moderada	Enfermedad Moderada
Hospitalizado: Enfermedad severa	Enfermedad Severa
Hospitalizado: Fallecido	Enfermedad Severa

Nota. OMS: Organización Mundial de la Salud.

De los experimentos a realizar

Los experimentos fueron realizados utilizando muestras clínicas previamente recolectadas en el marco del estudio EC-CNBI-2020-05-65, específicamente células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) obtenidas de pacientes hospitalizados con diagnóstico confirmado de COVID-19.

Las actividades experimentales se diseñaron para dar cumplimiento a los objetivos del estudio, mediante la aplicación de técnicas de citometría de flujo multiparamétrica sobre PBMCs criopreservadas de los sujetos seleccionados, las cuales fueron procesadas bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio.

El desarrollo experimental siguió las siguientes etapas:

Estandarización de panel de citometría de flujo: Se seleccionó y optimizó el panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de superficie. Esta fase incluyó la ejecución de controles de compensación, controles de isotipos y curvas de titulación para cada anticuerpo utilizado. Los controles de isotipo se emplearon para titular individualmente cada anticuerpo del panel, permitiendo discriminar la señal específica de la inespecífica y detectar el ruido de fondo derivado del isotipo y del fluorocromo tanto en su propia huella espectral como en el resto de la señal en muestras negativas. Posteriormente, se utilizaron los controles

FMO (Fluorescence Minus One) que corresponde a teñir la muestras con todos los marcadores menos el marcador con su fluorocromo de interés, durante el proceso de tinción del panel, con el fin de identificar el ruido de fondo generado por la combinación de los demás anticuerpos sobre el fluorocromo de interés. En citometría espectral, este enfoque se interpreta en términos de huellas espectrales, lo que permite una resolución más precisa de la fluorescencia asociada a cada marcador.

Descongelamiento y preparación de PBMCs: Las muestras fueron descongeladas, lavadas y cuantificadas para verificar viabilidad celular. Se evaluó la recuperación celular y se excluyeron aquellas muestras que no alcanzaron el umbral mínimo de un millón de células viables (Anexo 6).

Tinción celular y adquisición de datos: Se aplicaron protocolos estandarizados para la tinción celular, que incluyeron el bloqueo de receptores Fc, la tinción de marcadores de superficie y la fijación celular (ver Anexo 6). La adquisición de eventos se realizó en un citómetro de flujo espectral Cytex Aurora Northern Lights (Cytex® Biosciences, Fremont, CA, USA), equipado con tres láseres (405 nm, 488 nm y 640 nm), filtros de dispersión lateral de alta sensibilidad y un sistema de detección espectral completo que permite la deconvolución de múltiples fluorocromos a partir de sus huellas de emisión. Este equipo permite la lectura de hasta 38 parámetros (36 de fluorocromos diferentes).

Análisis de datos: Los archivos generados fueron analizados mediante el software FlowJo™, estableciendo compuertas para las principales subpoblaciones de linfocitos T (T CD4+, T CD8+), sus perfiles funcionales y de diferenciación (virgen, memoria central, memoria efectora, TEMRA), de acuerdo con los objetivos específicos del estudio (Table 3).

Citometría de flujo

Para la caracterización inmunofenotípica de linfocitos T en pacientes hospitalizados con COVID-19, se empleó citometría de flujo espectral multiparamétrica utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) previamente criopreservadas (Kunz et al., 2018). Las muestras fueron descongeladas rápidamente en baño María a 37 °C, recuperadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina), y posteriormente lavadas para eliminar el crioprotector. La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de tripano, ajustándose la densidad celular únicamente con las células viables (Anexo 6).

Se implementaron múltiples controles de calidad experimental, incluyendo: controles de viabilidad (células sometidas a choque térmico $-80\text{ °C}/+42\text{ °C}$), controles de tinción única para el cálculo de las matrices de deconvolución espectral, controles no teñidos para establecer la autofluorescencia basal y controles FMO esenciales para definir con precisión los umbrales de positividad en cada marcador dentro de un panel multiparamétrico. Como marcador de viabilidad se utilizó el tinte ViaDye™ Red Fixable Viability Dye (Cytex Biosciences®).

El panel de inmunofenotipificación incluyó 22 anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (complejo AnticuerpoMonoclonal–Fluorocromo), dirigidos contra marcadores de superficie (o clústeres de diferenciación, CD); distribuidos en huellas espectrales específicas para cada fluorocromo para evaluar subpoblaciones celulares específicas de linfocitos T, células B, células NK y poblaciones mieloides (Tabla 3). Los CD's empleados (Tabla 3): CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD25/IL-2R α , CD27, CD38, CD45, CD45RA, CD56/NCAM, CD57, CD69, CD95/Fas, CD127/IL-7R α , CD183/CXCR3, CD197/CCR7, CD279/PD-1, CD303/BDCA-2, CD314/NKG2D. Los

detalles de los complejos AnticuerpoMonoclonal–Fluorocromo utilizados se detallan en el Anexo 6.

Tabla 3

Clústeres de diferenciación utilizados para definir subpoblaciones celulares de PBMC's

<i>Definición de poblaciones</i>	
CD45	Pan-Leucocitario
CD3	Linfocitos T (pan-T)
CD4	Linfocitos T colaboradores (Th)
CD8	Linfocitos T citotóxicos
CD14	Exclusión – Monocitos (exclusión de mieloides)
CD16	Exclusión – NK citotóxicas y monocitos
CD19	Exclusión – Linfocitos B
CD20	Exclusión – Linfocitos B maduros
CD56 / NCAM	Exclusión – Células NK, subset T-NK
CD303 / BDCA-2	Exclusión – Células dendríticas plasmocitoides
<i>Diferenciación y memoria</i>	
CD45RA	Linfocitos T Virgen
CD197 / CCR7	Memoria T Central
CD27	Memoria T / Diferenciación
CD95 / Fas	Memoria T / Diferenciación
<i>Activación</i>	
CD25 / IL-2R α	Activación T, Tregs
CD38	Activación T
CD69	Activación T temprana
<i>Inhibición, estado funcional</i>	
CD127 / IL-7R α	Homeostasis T; Tregs (CD25+CD127 ⁻)
CD183 / CXCR3	Migración T CD8 / Quimiotaxis Th1
CD279 / PD-1	Inhibición / Agotamiento T
CD314 / NKG2D	CD8 citotóxicos
<i>Senescencia, apoptosis</i>	
CD57	Senescencia / Agotamiento T
CD95 / Fas	Apoptosis

Nota. CD: clústed de diferenciación, PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

Para optimizar la tinción se emplearon soluciones tampones (buffers) específicas:

Solución tampón de tinción brillante (Brilliant Stain Solución tampón, BD Biosciences®) para prevenir agregación y TruStain FcX™ humano (solución de bloqueo de rFc, 4 °C,

Biolegend®), para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos con receptores Fc en las células inmunes. La incubación de anticuerpos se realizó a temperatura ambiente durante 20 minutos, protegida de la luz, seguida de lavados con solución tampón de tinción y fijación con paraformaldehído al 1%.

Finalmente, las células se resuspendieron en solución tampón de adquisición y fueron analizadas en un citómetro espectral Northern Lights™ (Cytek® Biosciences, Fremont, CA, USA), configurado con tres láseres (405 nm, 488 nm y 640 nm) y un sistema de detección espectral de resolución completa. La adquisición se realizó a flujo medio, dentro de las 48 horas posteriores a la tinción, registrando hasta 1×10^6 eventos por muestra según la disponibilidad celular. Esta estrategia permitió la resolución de alta dimensión para la identificación de linfocitos T virgen, memoria central (TCM), memoria efectora (TEM), poblaciones T activadas y exhaustas, así como células B, NK y mieloides.

Estrategia de exclusión secuencial

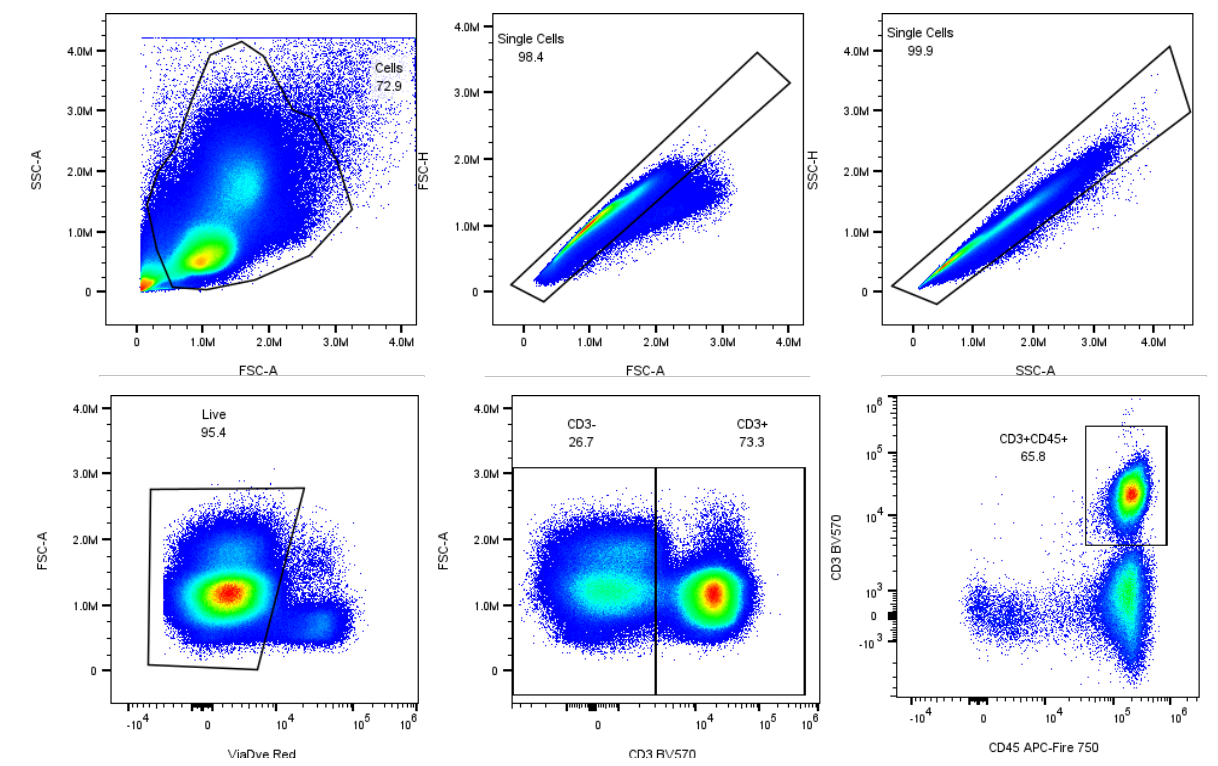
El análisis por citometría de flujo espectral fue realizado siguiendo una estrategia de exclusión secuencial (gating strategy) con el objetivo de identificar subpoblaciones específicas de linfocitos T a partir de PBMCs previamente teñidas. En la primera etapa, se seleccionaron eventos singletes mediante la comparación de parámetros de dispersión hacia adelante y lateral (FSC-A vs FSC-H y SSC-A vs SSC-H), lo que permitió excluir agregados celulares y dobles. Posteriormente, se aplicó un gate de viabilidad utilizando el colorante ViaDye™ Red Fixable Viability Dye (Cytek Biosciences®), seleccionándose únicamente los eventos negativos para este tinte, correspondientes a células vivas.

En la siguiente fase, se realizó la selección de leucocitos y linfocitos totales a través de marcadores panleucocitarios y panlinfocitarios. Se emplearon CD45 (marcador pan-leucocitario) y CD3 (marcador pan-T), definiéndose el gate en los eventos dobles positivos

CD45+CD3+. Esta estrategia inicial estableció la población de referencia sobre la cual se aplicaron los subsiguientes gates dirigidos a discriminar linfocitos T CD4+, CD8+ y sus subpoblaciones (Figura 4).

Figura 4

Estrategia de exclusión secuencial (Gating strategy) utilizada en el estudio.



Una vez identificadas las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, se aplicaron combinaciones de marcadores fenotípicos para evaluar su estado de activación, diferenciación y funcionalidad (Tabla 3). La memoria y diferenciación se analizaron mediante CD45RA, CD197, CD27 y CD95, definiendo los siguientes fenotipos: Virgen (CD45RA⁺, CD197⁺, CD27⁺, CD95^{-/+}), Memoria central o TCM (CD45RA⁻, CD197⁺, CD27⁺, CD95⁺), Memoria efectora o TEM (CD45RA⁻, CD197⁻, CD27^{+/-}, CD95⁺) y Efector terminal o TEMRA (CD45RA⁺, CD197⁻, CD27⁻, CD95⁺) (Tabla 4, Figura 5).

Tabla 4

Subpoblaciones de Linfocitos T definidas según CD's

Subpoblación	CD45RA	CD197/CCR7	CD27	CD95/Fas
Virgen (Naive)	+	+	+	−/+
Memoria Central (TCM)	−	+	+	+
Memoria Efectora (TEM)	−	−	+/−	+
Efector Terminal (TEMRA)	+	−	−	+

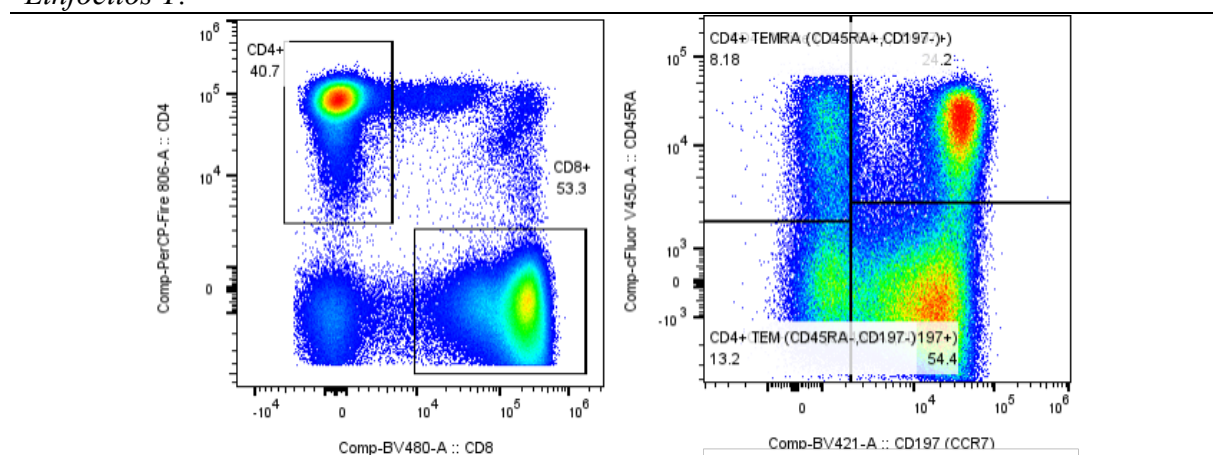
Hasta este punto, la definición de los gates fue realizada manualmente y validada por consenso entre tres expertos. Posteriormente, el análisis de la expresión de los diferentes marcadores dentro de cada subpoblación se efectuó de manera combinada, manual y automática, utilizando el software FlowJo™ (BD Biosciences). En este último, además de los análisis manuales, se aplicaron los algoritmos UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) y FlowSOM (Self-Organizing Maps), que permitieron la reducción de dimensionalidad y la identificación no supervisada de conglomerados celulares. El uso de UMAP facilitó la visualización global de la estructura de alta dimensión de las poblaciones linfocitarias en mapas bidimensionales. En el análisis no supervisado mediante FlowSOM, un clúster se define como un grupo de células con un perfil de expresión fenotípico similar para los marcadores incluidos en el panel de citometría. Estos conglomerados se agrupan posteriormente en metaclusters que representan poblaciones inmunológicamente reconocibles (naive, TCM, TEM, TEMRA, Treg, etc.), de acuerdo con la coexpresión de marcadores clásicos de diferenciación (CD45RA, CCR7, CD27, CD95).

Los marcadores de activación empleados incluyeron CD25/IL-2R α , CD38 y CD69, con el fin de diferenciar estados de activación temprana y tardía. El estado funcional e inhibitorio se evaluó mediante CD127/IL-7R α , CD183 (subpoblaciones con polarización tipo Th1), CD279/PD-1 (marcador de agotamiento) y CD314/NKG2D para identificar linfocitos T con potencial citotóxico. La senescencia y la susceptibilidad a apoptosis fueron determinadas

por la expresión de CD57 y CD95/Fas, respectivamente. Esta estrategia permitió una resolución de alta dimensión de subpoblaciones T funcionalmente relevantes, aportando información crítica para comprender la dinámica de la respuesta inmunitaria frente a la infección por SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados.

Figura 5

Estrategia de exclusión secuencial (Gating strategy) para determinar subpoblaciones de Linfocitos T.



Procedimientos para la recolección de información, manejo de la confidencialidad y aspectos éticos

Antes del inicio de este sub-estudio, se solicitó la aprobación al Comité Nacional de Bioética de la Investigación (CNBI) de la República de Panamá. Dado que se trató de un análisis retrospectivo de datos secundarios previamente recolectados y anonimizados, y que no implicó contacto directo con los sujetos participantes, se gestionó bajo la modalidad de revisión expedita, conforme a las disposiciones del propio comité y en apego a la Ley 68 del 20 de noviembre de 2003, que regula los derechos y deberes de los pacientes en cuanto a la información y toma de decisiones libres e informadas.

El estudio fue aprobado formalmente por el CNBI bajo el código EC-CNBI-2021-10-156 (Anexo 4), mientras que el protocolo primario que originó la base de datos fue aprobado

previamente bajo el código EC-CNBI-2020-05-65 (ver Anexo 2). Durante la ejecución del estudio primario, todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito, en el cual se incluía una cláusula específica que autorizaba el uso de sus datos con fines de investigación secundaria, siempre que esta contara con aprobación ética independiente y garantizara la anonimización total de la información.

En este sub-estudio, que corresponde al objetivo 2.7.2. del estudio primario, la recolección y manejo de datos se realizó con estrictas medidas de protección de la confidencialidad. Para cada expediente clínico, se registró únicamente el número de historia clínica, el cual fue inmediatamente reemplazado por un código numérico interno del estudio. Dicho código fue encriptado, protegido con contraseña y almacenado en la computadora personal del investigador principal, sin acceso a identificadores como nombres, cédula de identidad personal, número de seguro social o dirección. Esta computadora tuvo acceso restringido y fue utilizada exclusivamente para el análisis de este sub-estudio.

Dado que no existió ninguna interacción directa con los participantes y el único riesgo potencial fue una eventual violación de la privacidad (adecuadamente mitigada), este estudio fue clasificado como de riesgo mínimo para los sujetos incluidos.

Una vez finalizado el proceso de recopilación y análisis de datos, todos los archivos generados fueron encriptados, protegidos con contraseña y transferidos a una unidad de almacenamiento externa (unidad flash), desde la cual fueron eliminados de la computadora personal del investigador. Este dispositivo fue almacenado bajo llave en el Departamento de Virología y Biotecnología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de Salud, en los archivos correspondientes al protocolo EC-CNBI-2020-05-65, donde permanecerá archivado durante el mismo período establecido para el resguardo de los datos del estudio primario.

Este estudio fue conducido en cumplimiento de los principios éticos internacionales definidos por la Declaración de Helsinki, las Pautas Éticas Internacionales del CIOMS, y las normativas nacionales panameñas sobre investigación con sujetos humanos.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando un enfoque integral que incluyó métodos descriptivos e inferenciales, con el propósito de caracterizar a la población de estudio y explorar la asociación entre variables clínicas, demográficas e inmunológicas con la severidad de la COVID-19.

En una primera fase, se aplicaron estadísticos descriptivos para resumir las características basales de la cohorte. Para las variables continuas se calcularon medidas de tendencia central y dispersión (media, mediana, desviación estándar y rango intercuartílico, según la distribución de los datos), mientras que las variables categóricas se expresaron en frecuencias absolutas y relativas. Posteriormente, se realizaron análisis bivariados con el fin de identificar diferencias entre los grupos de comparación (COVID-19 severo vs. COVID-10 moderado). Para las variables categóricas se empleó la prueba exacta de Fisher o la prueba chi-cuadrado, de acuerdo con la distribución de frecuencias esperadas. En el caso de variables continuas, se utilizaron pruebas t de Student para datos con distribución paramétrica y varianzas homogéneas, y la prueba t de Welch cuando no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas. Para distribuciones no paramétricas se aplicó la prueba de Wilcoxon.

En cuanto a los datos derivados de citometría de flujo, se calcularon las frecuencias relativas de las principales subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y dichas

proporciones se compararon de acuerdo con la clasificación clínica de severidad (enfermedad moderada vs. severa), aplicando las pruebas estadísticas antes descritas según correspondiera.

En todos los análisis se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El procesamiento y análisis de los datos se realizó con software estadístico especializado, garantizando la validez y reproducibilidad de los resultados.

CAPÍTULO CUATRO: RESULTADOS

Análisis Univariado

La cohorte analizada incluyó un total de 177 pacientes hospitalizados con diagnóstico confirmado de COVID-19 (Tabla 5). La edad media de los participantes fue de 51 años (Rango Intercuartílico -RIC-: 43–59). En cuanto al sexo, el 62.1% correspondió a hombres (n = 110) y el 37.9% a mujeres (n = 67). La clasificación clínica de severidad mostró que el 72.9% (n = 129) presentó enfermedad moderada, mientras que el 27.1% (n = 48) desarrolló formas severas. En relación con las comorbilidades, el 32.8% de los sujetos no presentó ninguna, el 33.9% tenía una y el 33.3% presentaba dos o más. Específicamente, las comorbilidades más frecuentes fueron: obesidad (30.6%), hipertensión arterial (27.7%), diabetes mellitus (22.5%), asma (12.1%) y enfermedad cardiovascular no especificada (6.9%).

Respecto a la fase infecciosa al momento del ingreso, el 46.3% (n = 82) se encontraba en fase aguda (≤ 7 días desde la fecha de inicio de síntomas) y el 53.7% (n = 95) en fase convaleciente (> 7 días desde la fecha de inicio de síntomas); teniendo el tiempo transcurrido desde la fecha de inicio de síntomas hasta la inclusión en el estudio una mediana de 7 días (RIC: 5–9). En cuanto a los signos y síntomas clínicos más frecuentes al ingreso, predominó la tos (70.1%), seguida de disnea (67.2%), fiebre (64.4%) y malestar general (58.8%). Otros síntomas reportados fueron taquipnea (48.6%), cefalea (31.1%), fatiga (26.6%), mialgias (21.5%) y odinofagia (20.9%).

Tabla 5

Características basales de la población de estudio al ingreso

Característica	Valores
Edad, años; Mediana (RIC)	51 (43-59)
Sexo; n (%)	
Femenino	67 (37.9%)
Masculino	110 (62.1%)
Severidad de la enfermedad; n (%)	
Moderada	129 (72.9%)
Severa	48 (27.1%)
Días desde el inicio de síntomas; Mediana (RIC)	7 (5-9)
Fase infecciosa; n (%)	
Aguda (≤ 7 días)	82 (46.3%)
Convaleciente (> 7 días)	95 (53.7%)
Número de comorbilidades; n (%)	
Sin comorbilidades	58 (32.8%)
1 comorbilidad	60 (33.9%)
≥ 2 comorbilidades	59 (33.3%)
Comorbilidades; n (%)	
Obesidad	53 (30.6%)
Hipertensión Arterial	48 (27.7%)
Diabetes Mellitus	39 (22.5%)
Asma	21 (12.1%)
Enfermedad Cardiovascular no especificada	12 (6.9%)
Signos y síntomas clínicos; n (%)	
Tos	124 (70.1%)
Disnea	119 (67.2%)
Fiebre	114 (64.4%)
Malestar General	104 (58.8%)
Taquipnea	86 (48.6%)
Cefalea	55 (31.1%)
Fatiga	47 (26.6%)
Mialgias	38 (21.5%)
Odinofagia	37 (20.9%)

Nota. La cohorte inicial incluyó 188 sujetos; se excluyeron 10 por datos insuficientes para clasificación de severidad y 1 por infección por VIH, quedando 177 para el análisis final.

Con respecto a los marcadores hematológicos y serológicos (Tabla 6), la hemoglobina presentó una mediana de 13.8 g/dL (RIC: 12.4–14.5) y el hematocrito de 41.0% (RIC: 36.8–43.3), ambos dentro de los valores de referencia. El recuento total de leucocitos fue de 7.7

$\times 10^9/L$ (RIC: 6.1–10.8), con predominio de neutrófilos [$6.2 \times 10^9/L$ (RIC: 4.8–9.5)] y linfocitos dentro del rango normal [$1.03 \times 10^9/L$ (RIC: 0.7–1.5)], con tendencia al límite inferior. Los eosinófilos se encontraron marcadamente reducidos ($0.0 \times 10^9/L$), y las plaquetas mostraron valores de $234 \times 10^9/L$ (RIC: 185.8–310.5), en rangos normales. En cuanto a la coagulación, el tiempo de protrombina fue de 12.8 seg (RIC: 11.4–13.9) y el TTPA de 30.9 seg (RIC: 28.3–34.0), ambos dentro de los límites fisiológicos.

Entre los reactantes de fase aguda, se documentaron elevaciones a considerar: la proteína C reactiva (PCR) tuvo un valor de 15.9 mg/L (RIC: 0.5–42.7), la procalcitonina de 0.14 ng/mL (RIC: 0.06–0.28), la ferritina de 541.1 ng/mL (RIC: 223.1–1066.5), el dímero D de 685 $\mu g/mL$ FEU (RIC: 400–1085) y la interleucina-6 (IL-6) con valores de 7.6 pg/mL (RIC: 3.6–28.9). La VES no presentó alteraciones a considerar.

La glucosa se situó en 135.0 mg/dL (RIC: 114.0–184.5). En cuanto a función renal, el nitrógeno de urea fue de 14.4 mg/dL (RIC: 10.0–20.0) y la creatinina de 0.8 mg/dL (RIC: 0.63–1.0), ambos en rangos normales. Para la función hepática, se documentó elevación de transaminasas (ALT 47 U/L; AST 49 U/L), con bilirrubinas y fosfatasa alcalina en valores de referencia. Finalmente, el promedio de la albúmina y de las proteínas totales fueron de 3.7 ± 0.5 g/dL y 7.11 ± 0.69 g/dL, respectivamente, ambos, en límites normales.

Tabla 6

Biomarcadores hematológicos y bioquímicos de la población de estudio (n = 177)

Variable (unidades)	n'	Reporte Mediana (RIC)	Valores de referencia
Hb (g/dL)	173	13.8 (12.4–14.5)	H: 13.5–17.5 / M: 12.0–15.5
Hcto (%)	173	41.0 (36.8–43.3)	H: 41–53 / M: 36–46
Leucos ($\times 10^9/L$)	172	7.7 (6.1–10.8)	4.0–10.0
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	172	6.2 (4.8–9.5)	2.0–7.0
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	172	1.03 (0.7–1.5)	1.0–3.0
Eosinófilos ($\times 10^9/L$)	172	0.0 (0.0–0.0)	0.05–0.5
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	172	234.0 (185.8–310.5)	150–400

TTP (segundos)	120	12.8 (11.4–13.9)	11–14 / INR 0.8–1.2
TTPA (segundos)	120	30.9 (28.3–34.0)	25–35
VES (mm/h)	109	0.0 (0.0–41.0)	H < 15 / M < 20
PCR (mg/L)	132	15.9 (0.5–42.7)	< 5
Procalcitonina (ng/mL)	144	0.14 (0.06–0.28)	< 0.05
Ferritina (ng/mL)	132	541.1 (223.1–1066.5)	H: 30–400 / M: 15–150
Dímero D (μg/mL FEU)	144	685.0 (400.0–1085.0)	< 0.5
Interleucina-6 (pg/mL)	87	7.6 (3.6–28.9)	< 7
Glucosa (mg/dL)	162	135.0 (114.0–184.5)	70–100 (ayuno)
Nitrógeno de urea (mg/dL)	167	14.4 (10.0–20.0)	7–20
Creatinina (mg/dL)	169	0.8 (0.63–1.0)	H: 0.7–1.3 / M: 0.6–1.1
ALT (U/L)	155	47.0 (30.0–79.0)	< 40
AST (U/L)	155	49.0 (34.5–66.5)	< 40
Fosfatasa alcalina (U/L)	108	74.0 (56.5–106.25)	44–147
Bilirrubina directa (mg/dL)	149	0.1 (0.0–0.35)	0.0–0.3
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	148	0.0 (0.0–0.4)	0.2–1.0
Proteína total* (g/dL)	55	7.11 ± 0.69	6.0–8.0
Albumina* (g/dL)	86	3.68 ± 0.5	3.5–5.0

Nota. Datos correspondientes a 177 sujetos. Abreviaturas: n': número de sujetos con datos analizables, RIC: Rango intercuartílico, Hb: Hemoglobina, Hcto; Hematocrito, Leucos: Leucocitos, TTP: Tiempo de protrombina, TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada, VES: Velocidad de eritrosedimentación, PCR: Proteína C reactiva, ALT: Alanina transaminasa, AST: Aspartato transaminasa, H: Hombres, M: Mujeres. *Variables con distribución normal, por lo que sus valores representan Promedio y Desviación estándar.

Análisis Bivariado

Al comparar las características basales entre los pacientes con COVID-19 moderada (n = 129) y severa (n = 48) (Tabla 8), no se observaron diferencias significativas en la edad [51.0 años (RIC: 43.0–59.0) vs 49.0 años (RIC: 42.8–61.5); $p = 0.903$] ni en la proporción de hombres (63.6% vs 58.3% vs.; $p = 0.643$). De igual manera, el tiempo transcurrido desde el inicio de síntomas hasta la inclusión en el estudio fue similar en ambos grupos [7.0 días (RIC: 5.0–9.0) vs. 7.0 días (RIC: 5.0–9.0); $p = 0.435$]. En cuanto al número de comorbilidades, al

categorizar los sujetos en tres grupos (0, 1, y ≥ 2 comorbilidades), se observó una distribución diferencial de la severidad entre ellos. La prueba de chi-cuadrado reveló una asociación estadísticamente significativa entre el número de comorbilidades y la categoría de enfermedad (moderada vs severa) ($p 0.0144$), indicando que un mayor número de comorbilidades se asocia con una mayor proporción de casos severos.

Tabla 7

Características basales de la población según severidad clínica

Variable	Moderada (n=129)	Severa (n=48)	p	Dirección
Edad (años)	51.0 (43.0–59.0)	49.0 (42.8–61.5)	0.903	
Sexo Masculino (%)	82 (63.6)	28 (58.3)	0.643	
Días desde inicio de síntomas	7.0 (5.0–9.0)	7.0 (5.0–9.0)	0.435	
Número de comorbilidades; n (%)				↑ Severa
0 ^a	45 (34.8)	13 (27.1)	0.014*	
1	49 (37.9)	11 (22.9)		
≥ 2	35 (27.1)	24 (50.0)		

Nota. Valores expresados como mediana (RIC) para variables continuas. Se aplicó Mann–Whitney U para comparar edad, días desde inicio de síntomas y número de comorbilidades. Para la variable sexo se utilizó χ^2 . * $p < 0.05$ considerado significativo. ^aGrupo de referencia.

Al comparar los biomarcadores entre pacientes con COVID-19 moderada y severa (Tabla 7), se identificaron diferencias significativas en varios parámetros. Los pacientes con enfermedad severa presentaron valores más elevados de ferritina ($p 0.0185$, ↑ Severa), dímero D ($p 0.0084$, ↑ Severa), e interleucina-6 ($p 0.0003$, ↑ Severa). Al mismo tiempo, la AST aumentó de manera significativa en los pacientes severos ($p 0.0084$, ↑ Severa), mientras, las proteína totales y la albumina disminuyeron de manera significativa ($p 0.0439$, ↓ Severa; $p 0.0457$, ↓ Severa, respectivamente). En contraste, no se observaron diferencias significativas en parámetros clásicos como hemoglobina, hematocrito, plaquetas, función renal o hepática.

Tabla 8

Biomarcadores según severidad clínica (Moderada vs Severa) con pruebas de significancia

Variable	Moderada (n' / RIC)	Severa (n' / RIC)	p	Dirección
Hb (g/dL)	126 / 13.8 (12.4–14.5)	47 / 13.9 (12.5–14.5)	0.6254	
Hcto(%)	126 / 41.1 (36.4–43.3)	47 / 40.8 (37.7–42.7)	0.8377	
Leucos (×10 ⁹ /L)	126 / 7.70 (5.95–10.67)	46 / 7.75 (6.42–11.46)	0.4363	
Neutrófilos (×10 ⁹ /L)	126 / 6.00 (4.69–9.30)	46 / 6.46 (5.01–10.28)	0.3075	
Linfocitos (×10 ⁹ /L)	126 / 1.03 (0.71–1.55)	46 / 1.05 (0.69–1.39)	0.7939	
Eosinófilos (×10 ⁹ /L)	125 / 0.00 (0.00–0.01)	47 / 0.00 (0.00–0.00)	0.1148	
Plaquetas (×10 ⁹ /L)	126 / 234.00 (179.50–316.00)	46 / 235.50 (188.25–289.00)	0.989	
TTP (segundos)	87 / 12.67 ± 1.64	33 / 12.80 (11.40–14.70)	0.4189	
TTPA (segundos)	87 / 30.80 (27.75–33.65)	33 / 32.68 ± 8.28	0.2182	
VES (mm/h)	74 / 0.00 (0.00–42.50)	35 / 0.00 (0.00–35.00)	0.8994	
PCR (mg/L)	97 / 12.40 (0.00–36.20)	35 / 24.00 (3.60–92.65)	0.0843	
Procalcitonina (ng/mL)	105 / 0.12 (0.06–0.23)	39 / 0.19 (0.10–0.41)	0.0764	
Ferritina (ng/mL)	92 / 434.50 (217.70–886.40)	40 / 710.85 (418.05–1394.07)	0.0185*	↑ Severa
Dímero D (μg/mL FEU)	103 / 609.00 (344.50–964.50)	41 / 862.00 (534.0–1630.00)	0.0084*	↑ Severa
Interleucina-6 (pg/mL)	59 / 5.90 (3.05–14.90)	28 / 32.30 (15.15–112.30)	0.0003*	↑ Severa
Glucosa (mg/dL)	117 / 135.00 (114.00–198.00)	45 / 137.00 (114.00–166.00)	0.6863	
Nitrógeno de urea (mg/dL)	123 / 14.00 (10.10–19.35)	44 / 15.00 (10.00–22.50)	0.7149	
Creatinina (mg/dL)	124 / 0.77 (0.61–0.97)	45 / 0.81 (0.73–1.12)	0.1261	
ALT (U/L)	114 / 45.00 (28.00–74.50)	41 / 55.00 (36.00–92.00)	0.0803	
AST (U/L)	114 / 46.00 (31.50–62.75)	41 / 60.00 (38.00–95.00)	0.0084*	↑ Severa
Fosfatasa alcalina (U/L)	76 / 73.50 (54.00–93.50)	32 / 80.00 (63.00–122.00)	0.2271	

Bilirrubina directa (mg/dL)	107 / 0.08 (0.00–0.33)	42 / 0.15 (0.00–0.41)	0.1979	
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	106 / 0.00 (0.00–0.36)	42 / 0.11 (0.00–0.51)	0.1515	
Proteína total** (g/dL)	40 / 7.24 ± 0.62	15 / 6.77 ± 0.77	0.0439*	↓ Severa
Albumina** (g/dL)	67 / 3.74 ± 0.52	19 / 3.50 ± 0.43	0.0457*	↓ Severa

Nota. Datos correspondientes a 177 sujetos. Se aplicó t de Welch cuando ambos grupos siguieron distribución normal y prueba de Mann–Whitney U cuando no se cumple. * $p < 0.05$ considerada estadísticamente significativa. Dirección indica la tendencia del valor en pacientes con enfermedad Severa respecto a Moderada. Abreviaturas: n': número de sujetos con datos analizables, RIC: Rango intercuartílico, Hb: Hemoglobina, Hcto; Hematocrito, Leucos: Leucocitos, TTP: Tiempo de protrombina, TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada, VES: Velocidad de eritrosedimentación, PCR: Proteína C reactiva, ALT: Alanina transaminasa, AST: Aspartato transaminasa. ** Variables con distribución normal, por lo que sus valores representan Promedio y Desviación estándar.

Análisis Multiparamétrico

Para evaluar las diferencias en la distribución de subpoblaciones de linfocitos T según la severidad clínica de la COVID-19, igual que en análisis previos, se agruparon los sujetos en enfermedad moderada y enfermedad severa. Las frecuencias relativas de cada subpoblación fueron expresadas como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U, considerando un valor de $p < 0.05$ como criterio de significancia estadística.

En el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con COVID-19 moderada y severa (todas con $p > 0.05$, Tabla 8). Los casos severos presentaron valores de frecuencia relativa ligeramente menores en las células de memoria central (TCM: 69.4% vs 68.9% en moderados) y mayores en las poblaciones efectoras de memoria (TEM: 5.4% vs 4.8%) y TEMRA (0.5% vs 0.48%).

Tabla 9

Frecuencias relativas de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ según severidad clínica en pacientes hospitalizados con COVID-19

Frecuencia relativa de población parental (%)	Enf Moderada (mediana [RIC])	Enf Severa (mediana [RIC])	<i>p</i>
CD4+ (CD3+CD4+)	47.90 [29.15-61.02]	46.10 [32.48-58.92]	0.8697
CD4+Naive (CD45RA+, CD197+)	19.40 [10.60-32.33]	16.75 [9.21-35.77]	0.9256
CD4+TCM (CD45RA-, CD197+)	68.85 [53.70-80.90]	69.40 [46.78-80.50]	0.4675
CD4+TEM (CD45RA-, CD197-)	4.79 [2.17-12.20]	5.39 [2.00-11.48]	0.6735
CD4+TEMRA (CD45RA+, CD197-)	0.48 [0.00-1.97]	0.49 [0.20-2.70]	0.3115

Nota. Los valores se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre pacientes con enfermedad moderada y severa se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

En cuanto a los linfocitos T CD8⁺, las comparaciones tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas (todas con $p > 0.05$, Tabla 9). En este grupo, los pacientes con enfermedad severa presentaron frecuencias ligeramente mayores de células vírgenes (43.7% vs 39.4%) y TEMRA (25.0% vs 22.2%), junto con una menor proporción de células de memoria central (TCM: 13.9% vs 16.7%) en comparación con los moderados.

Tabla 10

Frecuencias relativas de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ según severidad clínica en pacientes hospitalizados con COVID-19

Frecuencia relativa de población parental (%)	Enf Moderada (mediana [RIC])	Enf Severa (mediana [RIC])	<i>p</i>
CD8+ (CD3+CD8+)	27.65 [18.30-39.05]	30.45 [19.80-44.17]	0.3486
CD8+Naive (CD45RA+, CD197+)	39.40 [26.48-56.35]	43.75 [29.48-58.60]	0.4966
CD8+TCM (CD45RA-, CD197+)	16.70 [5.04-29.07]	13.95 [6.44-21.80]	0.3258
CD8+TEM (CD45RA-, CD197-)	6.12 [3.09-13.93]	6.23 [3.09-13.67]	0.8352
CD8+TEMRA (CD45RA+, CD197-)	22.20 [7.65-45.25]	25.00 [13.93-37.98]	0.5119

Nota. Los valores se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre pacientes con enfermedad moderada y severa se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

El análisis multiparamétrico automatizado mediante UMAP y FlowSOM permitió una caracterización de alta resolución de las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los pacientes hospitalizados con COVID-19. En la caracterización general, utilizando los marcadores de diferenciación CD45RA, CD197 (CCR7), CD27 y CD95(Fas) se identificaron subpoblaciones celulares de interés.

En los linfocitos T CD4⁺ (Figura 6), se identificaron poblaciones vírgenes (clústeres 8, 12, 13), de memoria central (TCM) (clústeres 1, 3, 5, 6, 7), de memoria efectora (TEM) (clústeres 2, 9, 11), efectora terminal (TEMRA) (clústeres 10, 14, 15) y linfocitos T reguladores (Tregs) (clúster 4). Al comparar la distribución relativa de estas subpoblaciones entre pacientes con enfermedad moderada y severa, se observó una disminución global de todas las subpoblaciones CD4⁺ en los pacientes con enfermedad severa. Esta reducción incluyó tanto poblaciones indiferenciadas como las Vírgenes y TCM, como poblaciones más diferenciadas como TEM, TEMRA y Treg. La disminución de las poblaciones Vírgenes, TCM y TEMRA fue particularmente notable.

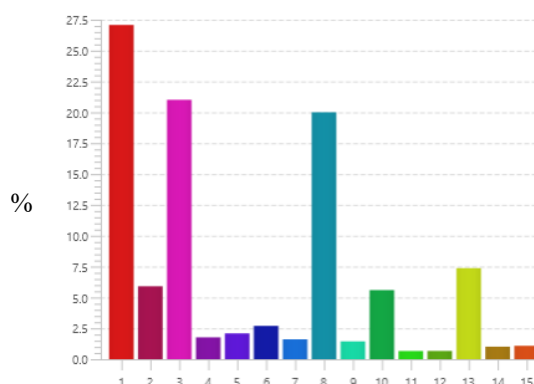
Dentro de las subpoblaciones TEMRA CD4⁺ (Figura 7), destacó la desaparición completa del clúster 15 en los pacientes con enfermedad severa. Este clúster mostró una alta expresión relativa de CD27, CD279 (PD-1), CD95 y CD127 en los individuos con enfermedad moderada. Los clústeres 10 y 14, también clasificados como TEMRA, se mantuvieron detectables en ambos grupos, aunque con gran reducción en enfermedad severa.

Figura 6

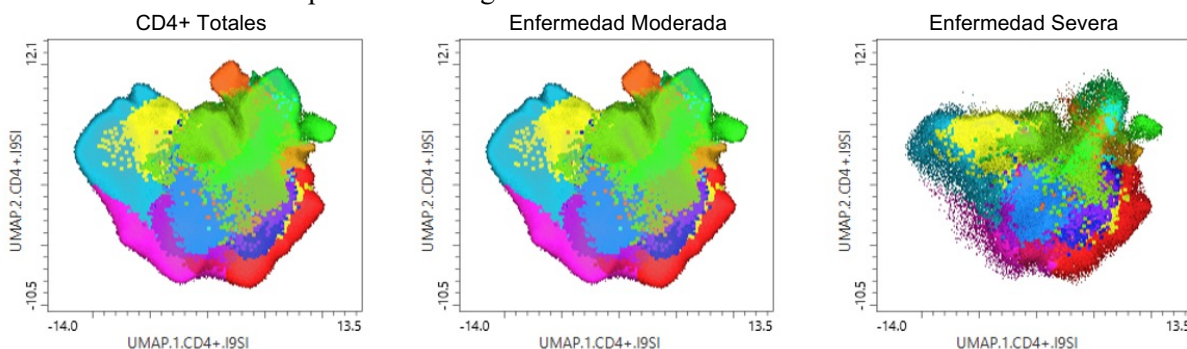
Análisis de Subpoblaciones de Linfocitos T CD4+ por UMAP y FlowSOM

A. Distribución relativa de clústeres identificados

CD4+ Virgen/Naive Clúster 8, 12, 13
CD4+ TCM Clústers 1, 3, 5, 6, 7
CD4+ TEM Clúster 2, 9, 11
CD4+ TEMRA Clúster 10, 14, 15
CD4+ Treg Clúster 4



B. Variación relativa de subpoblaciones según severidad de enfermedad



C. Expresión relativa de marcadores según clúster y severidad de enfermedad



Nota. Abreviaturas: TCM: Linfocitos T de Memoria Central, TEM: Linfocitos T de Efectores de Memoria, TEMRA: Linfocitos T de Efectores de Memoria de Reciente Activación, Treg: Linfocitos T Reguladores

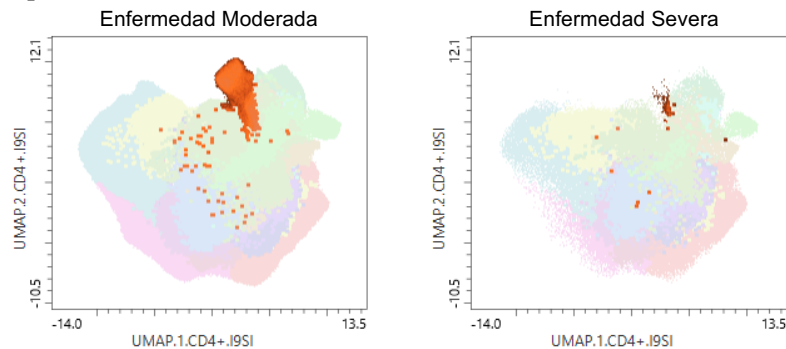
Además de las diferencias en la distribución de subpoblaciones, se evaluaron los patrones de expresión de varios marcadores funcionales clave (Figura 8). En enfermedad severa se observó una **disminución de la expresión de CD38** en las subpoblaciones CD4⁺

TEM y TEMRA, lo cual contrasta con los niveles observados en enfermedad moderada. La población CD4⁺ que desapareció completamente en el grupo severo no expresó **CD57**, lo que indica que no correspondía a una población senescente.

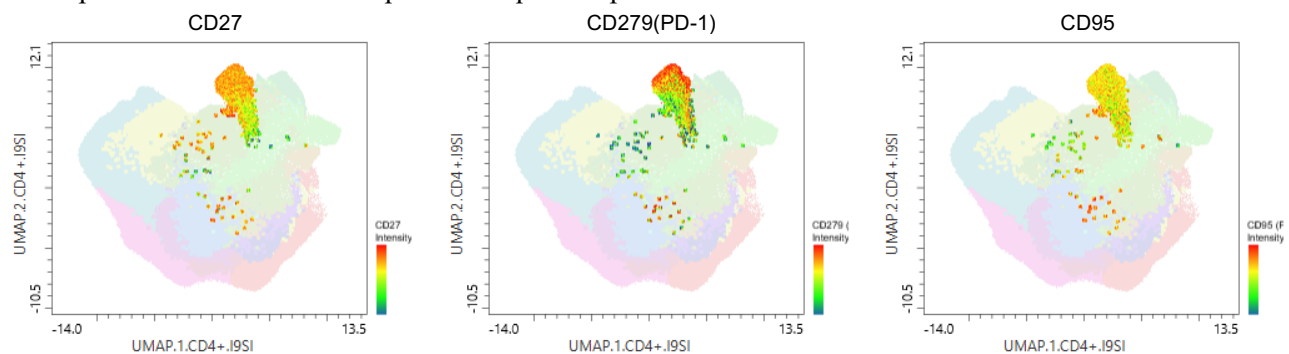
Figura 7

Subanálisis del Clúster 15 (TEMRA puros)

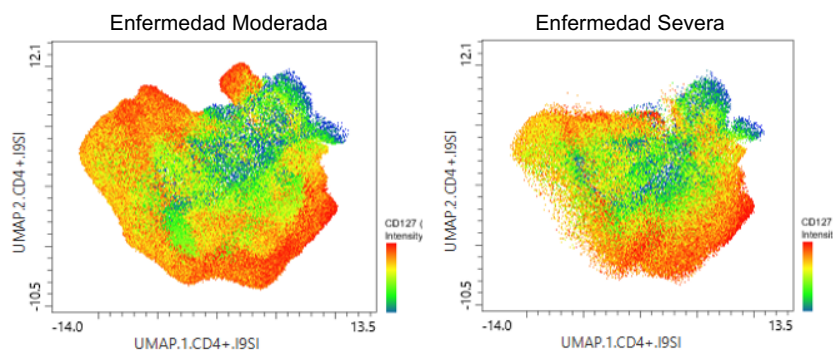
A. Desaparición completa del clúster 15



B. Expresión de marcadores en población que desaparece



C. Expresión de CD127



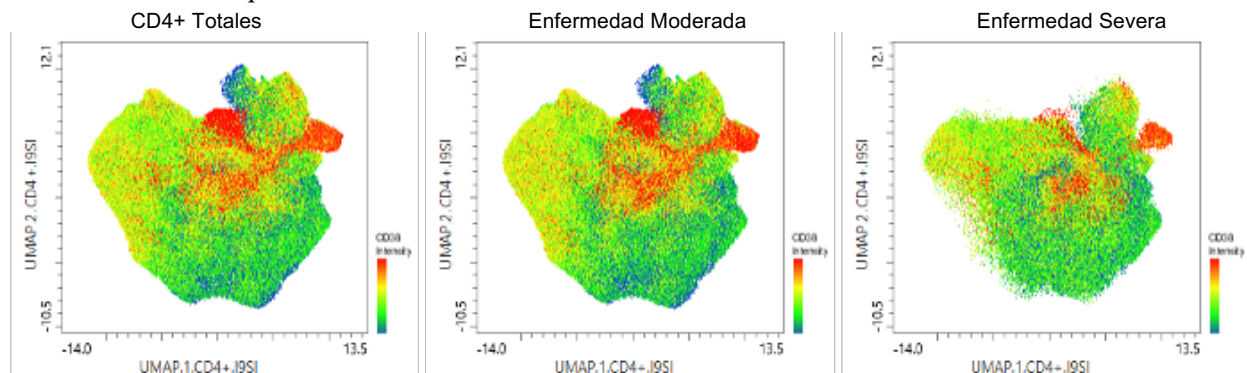
Nota. Abreviaturas: TEMRA: Linfocitos T de Efectores Terminales

También se evidenció una disminución de la expresión de CD69 y CD279 (PD-1) en las subpoblaciones TEM y TCM CD4⁺ en los pacientes con enfermedad severa. Estos cambios fueron consistentes con una reducción en la proporción de células activadas y potencialmente con afectación del compartimento de memoria funcional.

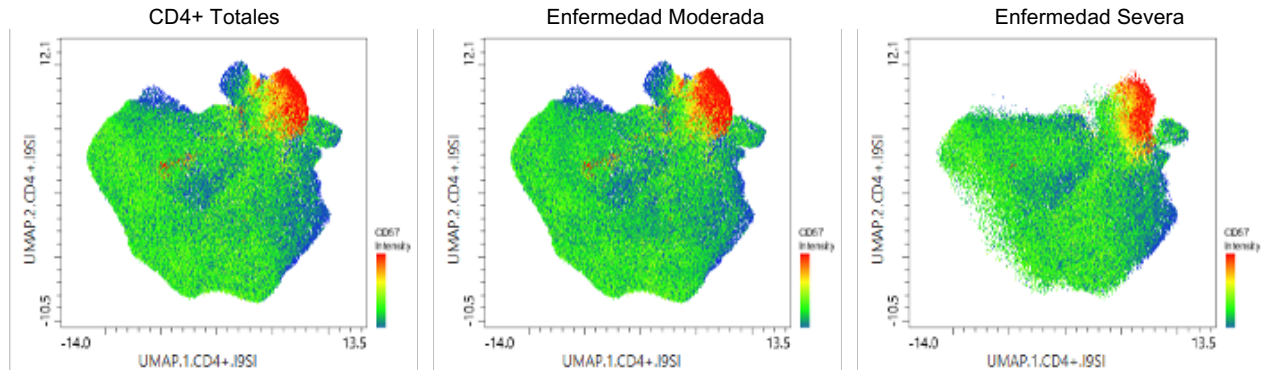
Figura 8

Expresión relativa de marcadores seleccionados en Linfocitos CD4⁺

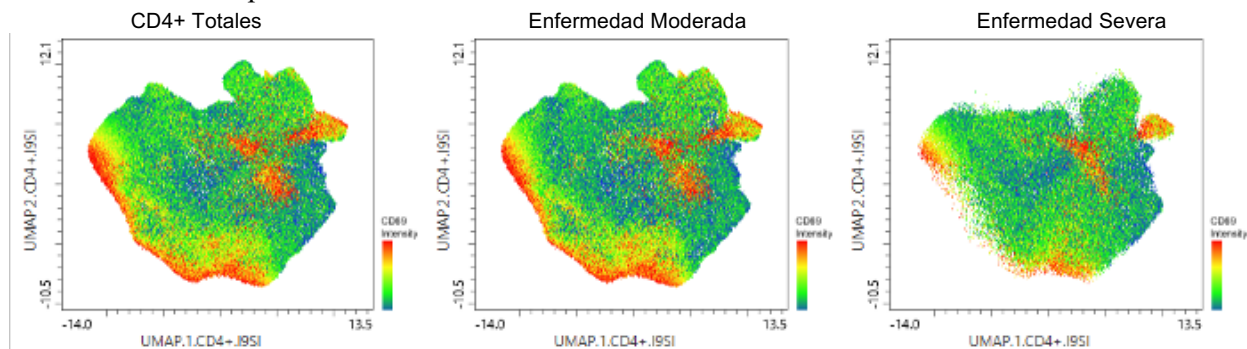
A. Disminución de expresión de CD38 en Enfermedad Severa en TEM/TEMRA



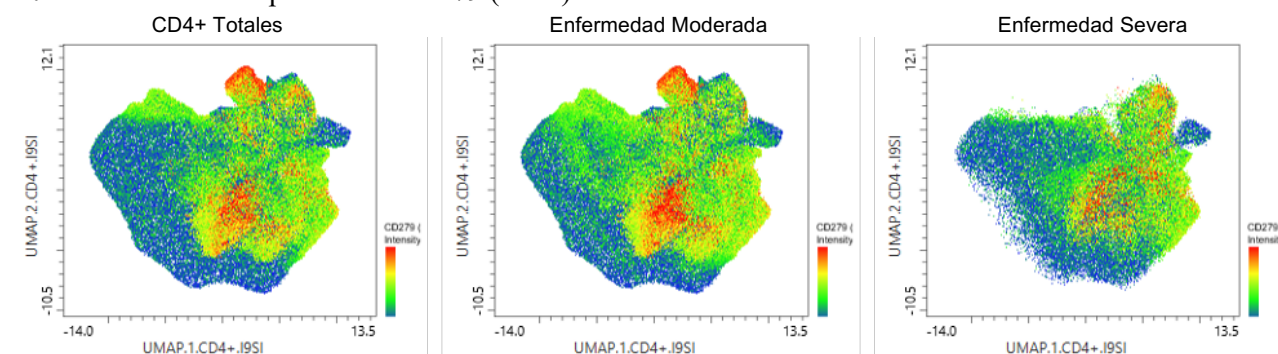
B. No expresión de CD57 en población que desaparece en Enfermedad Severa



C. Disminución de expresión de CD69 en Enfermedad Severa en TEM/TCM



D. Disminución de expresión de CD279 (PD-1) en Enfermedad Severa en TEM/TCM



Nota. Abreviaturas: TCM: Linfocitos T de Memoria Central, TEM: Linfocitos T de Efectores de Memoria, TEMRA: Linfocitos T de Efectores de Memoria de Reciente Activación

En conjunto, estos resultados describen un patrón de reducción cuantitativa y variación fenotípica de las subpoblaciones CD4⁺ según la severidad de la enfermedad por COVID-19, con pérdida relativa de poblaciones clave y disminución de la expresión de marcadores asociados a activación, diferenciación y regulación funcional.

Con respecto al análisis de los linfocitos T CD8⁺, el análisis mediante UMAP y FlowSOM permitió identificar las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺, agrupadas en clústeres según su perfil fenotípico: vírgenes (clústeres 4 y 7), memoria central (TCM) (clústeres 11 y 15), memoria efectora (TEM) (clústeres 12 y 14), y efectores terminales (TEMRA) (clústeres 1, 5 y 6) .

La comparación de las frecuencias relativas entre pacientes con enfermedad moderada y severa reveló una reducción global de las subpoblaciones CD8⁺ en enfermedad severa, observándose disminución en prácticamente todos los clústeres.

Se realizó un subanálisis específico de las subpoblaciones Vírgenes CD8⁺, correspondientes a los clústeres 4 y 7 (Figura 10). El clúster 7, identificado como Vírgen clásico, mostró una ausencia de expresión de CD183 (CXCR3), mientras que el clúster 4, clasificado como Vírgen migrante, presentó expresión positiva de CD183, lo cual sugiere una capacidad diferencial de migración hacia tejidos periféricos .

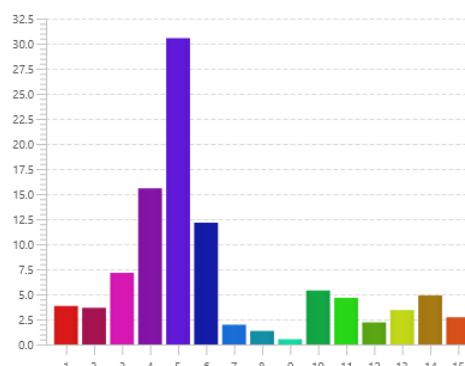
Figura 9

Análisis de Subpoblaciones de Linfocitos T CD8+ por UMAP y FlowSOM

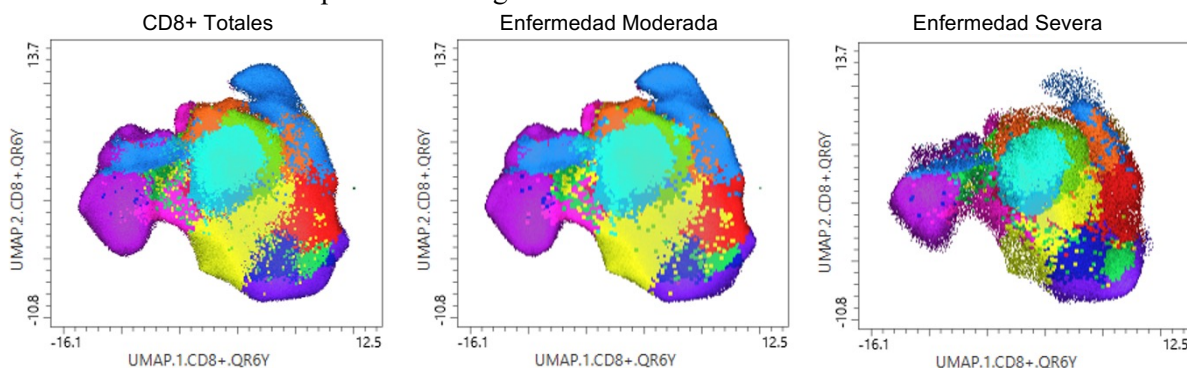
A. Distribución relativa de clústeres identificados

CD8+ Vírgen/Naïve Clústers 4, 7
CD8+ TCM Clústers 11, 15
CD8+ TEM Clúster 12, 14
CD8+ TEMRA Clúster 1, 5, 6

%



B. Variación relativa de subpoblaciones según severidad de enfermedad



C. Expresión relativa de marcadores según clúster y severidad de enfermedad



Nota. Abreviaturas: TCM: Linfocitos T de Memoria Central, TEM: Linfocitos T de Efectores de Memoria, TEMRA: Linfocitos T de Efectores de Memoria de Reciente Activación, Treg: Linfocitos T Reguladores

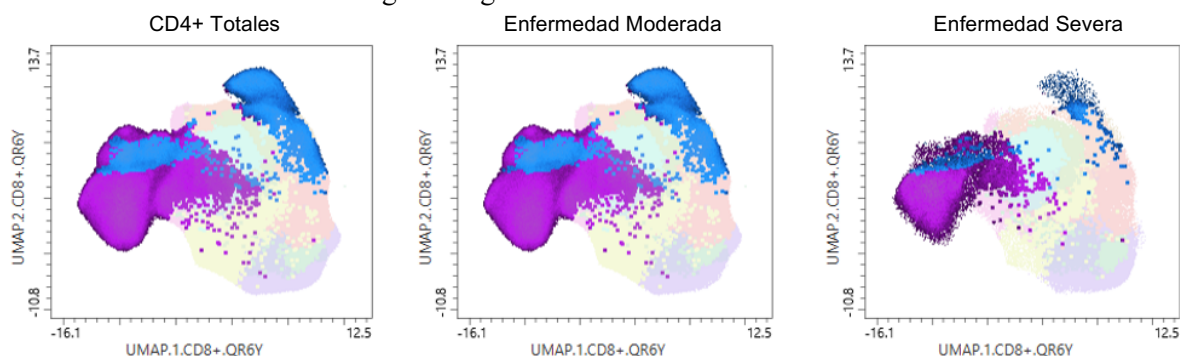
Ambas subpoblaciones vírgenes CD8+ presentaron una **reducción relativa en pacientes con enfermedad severa**, siendo más pronunciada en el clúster 7 (Vírgen clásico). Esta pérdida sugiere una afectación diferencial de las células T CD8+ menos diferenciadas según su perfil

funcional. En cuanto a la expresión de marcadores funcionales, el clúster 4 (migrante) mostró **expresión elevada de CD183**, junto con niveles detectables de **CD127** (marcador de supervivencia y homeostasis). El clúster 7 presentó niveles bajos de CD127 y escasa o nula expresión de **CD69** (activación), **CD57** (senescencia) y **CD314** (citotoxicidad), lo que sugiere un estado más indiferenciado y menos funcional.

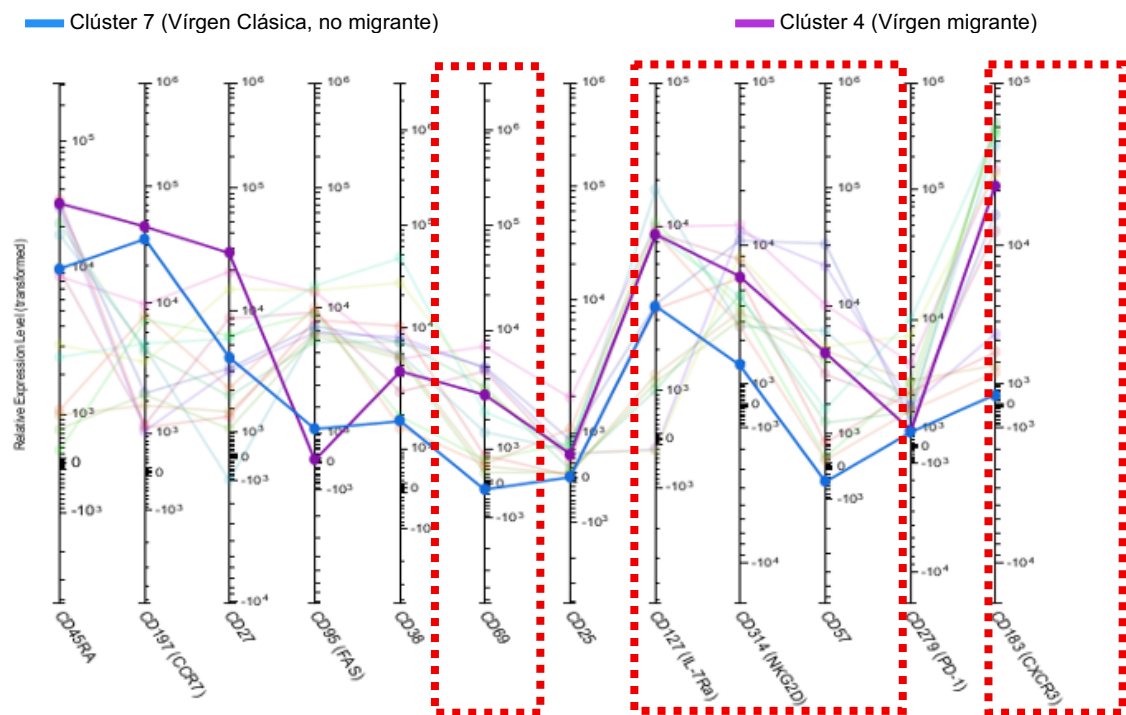
Figura 10

Subanálisis de los Clústeres 4 y 7 (CD8+ Vírgenes)

A. Variación relativa de CD8+ Vírgenes según severidad de enfermedad



B. Variación de expresión de marcadores seleccionados (CD69, CD127, CD314, CD57, CD183)



CAPÍTULO CINCO: DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio reflejan el perfil clínico e inmunoinflamatorio de una cohorte hospitalaria de pacientes con COVID-19 en Panamá y aportan evidencia sobre los factores asociados con la progresión hacia formas severas de la enfermedad. En nuestra cohorte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos moderado y severo en cuanto a edad, sexo o tiempo desde el inicio de síntomas, lo que sugiere que estos factores demográficos y temporales, por sí solos, no explican la progresión clínica en esta población hospitalaria homogénea. Este hallazgo concuerda parcialmente con lo reportado por Zhou et al. (2020), quienes no encontraron una asociación consistente entre sexo masculino y gravedad clínica en todos los subgrupos evaluados, aunque sí lo vincularon con mortalidad. Asimismo, contrasta con estudios como el de Ogawa et al. (2022), quienes reportaron que un mayor intervalo desde el inicio de síntomas hasta la hospitalización se asociaba con mayor severidad clínica en pacientes infectados. La diferencia podría deberse a que, en nuestra población, ambos grupos fueron incluidos en una ventana clínica relativamente similar (mediana de 7 días desde el inicio de síntomas).

No obstante, el número de comorbilidades mostró una asociación significativa con la severidad clínica, lo cual concuerda con múltiples estudios que han demostrado un efecto sinérgico entre enfermedades crónicas y desregulación inmune en COVID-19 grave (Guan et al., 2020; Richardson et al., 2020). Esta relación podría estar mediada por mecanismos inflamatorios crónicos preexistentes, predisposición a tormenta de citoquinas y menor reserva

funcional en sistemas clave como el endotelio, el metabolismo hepatorenal y el eje inflamación-coagulación.

Desde el punto de vista bioquímico, los pacientes con enfermedad severa presentaron niveles significativamente más altos de biomarcadores proinflamatorios como ferritina, dímero D e interleucina-6 (IL-6), todos con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En particular, la IL-6 mostró una elevación marcada en los pacientes severos (mediana: 32.3 pg/mL vs 5.9 pg/mL; $p = 0.0003$), respaldando su valor como indicador de disfunción inmune y predictor de complicaciones, como lo documentan Del Valle et al. (2020) y Herold et al. (2020). Estos hallazgos también validan el papel de la IL-6 como blanco terapéutico potencial, como lo demuestran estudios clínicos con tocilizumab y otros bloqueadores de la vía JAK/STAT.

Asimismo, se observó una elevación significativa de la aspartato transaminasa (AST), sin cambios notables en ALT o bilirrubinas, lo cual sugiere un patrón de daño hepático no colestásico, posiblemente relacionado con hipoxia, inflamación sistémica o incluso miopatía viral. Por otro lado, tanto la albúmina como las proteínas totales se encontraron significativamente reducidas en el grupo severo, lo que podría reflejar un estado de fase aguda con escape capilar, reducción en la síntesis hepática o consumo proteico acelerado en el contexto hipermetabólico de la COVID-19 severa.

En conjunto, estos resultados sugieren que la progresión hacia formas severas de COVID-19 en esta cohorte estuvo más asociada a la carga de comorbilidades y a la activación de ejes inflamatorios, más que a diferencias sociodemográficas o temporales, reafirmando la hipótesis de que el perfil inmunobiológico basal y la respuesta inflamatoria condicionan el desenlace clínico en pacientes hospitalizados.

Con la citometría de flujo espectral, el análisis de alta resolución mediante UMAP y FlowSOM permitió detectar una disminución global de las frecuencias relativas de todas las subpoblaciones CD4⁺ en los pacientes con enfermedad severa, incluyendo una pérdida notable de poblaciones vírgenes, TCM y TEMRA. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que documentan linfopenia profunda y desregulación del compartimento T en formas graves de COVID-19 (Laing et al., 2020; Wang et al., 2023; Zhou et al., 2020).

Dentro de las subpoblaciones de efectores terminales (TEMRA), destaca la desaparición completa del clúster 15 en enfermedad severa, una población presente en pacientes con enfermedad moderada. Este clúster fue caracterizado por una alta expresión de PD-1 (CD279), CD27, CD95 y CD127, lo que sugiere que estas células podrían encontrarse en un estado de activación funcional avanzada o transición hacia agotamiento. La coexpresión de PD-1 y CD27 podría corresponder a un estado intermedio entre activación funcional y disfunción progresiva en CD4⁺, aunque hasta ahora los estudios no han definido claramente este fenotipo como “pre-agotado” (Sekine et al., 2020; H. Y. Zheng et al., 2020; M. Zheng et al., 2020). La presencia simultánea de un marcador inhibitorio (PD-1) y un marcador de supervivencia/diferenciación (CD27) justifica interpretar esa población como potencialmente vulnerable a disfunción futura.

Además, la expresión mantenida de CD127 (receptor de IL-7) en esta subpoblación indicaría un posible intento del sistema inmunológico por preservar la homeostasis y la supervivencia, antes de la eventual pérdida funcional. La desaparición específica de esta población en los pacientes severos sugiere que estas células podrían haber sido eliminadas por mecanismos de apoptosis inducida por activación, agotamiento irreversible o migración masiva hacia tejidos periféricos, como el tracto respiratorio inferior, donde podrían ejercer funciones efectoras antes de su eliminación.

Adicionalmente, se observó una reducción marcada en la expresión de CD38 en las subpoblaciones TEM/TEMRA CD4⁺ en enfermedad severa, lo cual podría representar una pérdida de capacidad activadora o una señal de desregulación funcional. Este patrón se acompaña de la no expresión de CD57 en la población CD4⁺ que desaparece en enfermedad severa, indicando que no se trata de una población senescente clásica, sino posiblemente de células aún activas funcionalmente que no lograron consolidar una respuesta duradera. En paralelo, la disminución de la expresión de CD69 y PD-1 (CD279) en las subpoblaciones TEM y TCM sugiere una afectación del equilibrio entre activación temprana y diferenciación hacia memoria funcional, lo cual podría comprometer la formación de respuestas inmunológicas protectoras de largo plazo.

Estos hallazgos, en conjunto, respaldan la hipótesis de que la progresión hacia formas severas de COVID-19 implica no solo una linfopenia cuantitativa, sino también una reconfiguración cualitativa profunda del compartimento CD4⁺, con desaparición selectiva de subpoblaciones clave en la defensa antiviral, como los TEMRA CD4⁺ con fenotipo funcional activo. La pérdida de estas poblaciones podría tener consecuencias clínicas relevantes, ya que se relaciona con la incapacidad del sistema inmune para contener la infección, promover la resolución del proceso inflamatorio o establecer memoria inmunológica efectiva.

Este patrón de desregulación es consistente con lo descrito por Cummings et al. (2020) y Laing et al. (2020), quienes reportaron una profunda desorganización del eje T en pacientes críticamente enfermos, y refuerza la necesidad de evaluar marcadores fenotípicos avanzados como potenciales biomarcadores pronósticos en el contexto de COVID-19. Además, estos resultados abren la posibilidad de explorar estrategias terapéuticas dirigidas a preservar o restaurar subpoblaciones funcionales clave, como los TEMRA CD4⁺, particularmente en fases tempranas de la enfermedad.

Con respecto a los linfocitos T CD8⁺, al igual que lo observado en el compartimento CD4⁺, se documentó una disminución global en la frecuencia relativa de todas las subpoblaciones CD8⁺, incluyendo células vírgenes, TCM, TEM y TEMRA. Estos hallazgos se alinean con estudios previos que han descrito desregulación funcional del compartimento CD8⁺ en infecciones virales graves, incluyendo SARS-CoV-2 (Laing et al., 2020; Sekine et al., 2020; H. Y. Zheng et al., 2020).

La pérdida de células CD8⁺ vírgenes fue particularmente marcada, lo cual sugiere un impacto directo sobre el reservorio de células indiferenciadas, esenciales para la generación de nuevas respuestas adaptativas frente a variantes virales o co-infecciones. Esta depleción es consistente con fenómenos previamente descritos en contextos de inflamación sostenida (Zhou et al., 2020). El análisis detallado de los clústeres vírgenes reveló dos subpoblaciones fenotípicamente distintas: una población vírgen clásica (clúster 7), con ausencia de CD183 (CXCR3), y una población vírgen migrante (clúster 4), con expresión positiva de este receptor. La mayor pérdida del fenotipo clásico en enfermedad severa sugiere que las células menos especializadas y con menor capacidad de tráfico tisular son más susceptibles a desaparición en fases avanzadas de la enfermedad.

Por otro lado, las subpoblaciones TCM, TEM y TEMRA CD8⁺ también mostraron una reducción significativa en enfermedad severa. Esta afectación transversal en todos los niveles de diferenciación CD8⁺ podría reflejar tanto una respuesta antiviral excesiva no controlada, como un fenómeno de agotamiento o reclutamiento masivo hacia tejidos periféricos, particularmente el pulmón. Estudios previos han demostrado que, durante la fase aguda de COVID-19, las células CD8⁺ altamente diferenciadas pueden migrar a sitios de infección y sufrir apoptosis posterior a la activación (Mathew et al., 2020; H. Y. Zheng et al., 2020; M. Zheng et al., 2020).

La expresión más alta de CD69, CD314 y CD57 observada en la subpoblación vírgen migrante (clúster 4, CD183+), en comparación con la vírgen clásica (clúster 7), sugiere que esas células podrían estar más preparadas para activación, migración o vigilancia funcional inmediata, mientras que el clúster clásico mantendría un fenotipo más “quiescente”. Sin embargo, ambas poblaciones disminuyen en pacientes con enfermedad severa, lo que sugiere que esta desaparición no puede atribuirse únicamente a activación excesiva o senescencia convencional (CD57+), sino que es más plausible que obedezca a mecanismos relacionados con estrés homeostático prolongado, agotamiento del nicho inmunológico o señales de supervivencia insuficientes.

En conjunto, los resultados presentados confirman una reorganización profunda del compartimento CD8⁺ durante COVID-19 severo, con pérdida de subpoblaciones clave en la respuesta adaptativa, incluyendo tanto células vírgenes como efectores terminales. Esta disrupción cuantitativa y cualitativa podría tener implicaciones importantes en la capacidad de control antiviral, la generación de memoria inmunológica y la respuesta a la vacunación o reinfección posterior, aspectos que han sido enfatizados en estudios longitudinales recientes (Breton et al., 2021; Dan et al., 2021)(Dan et al., 2021; Breton et al., 2021).

Una de las principales fortalezas de este estudio radica en el uso de una cohorte bien caracterizada de pacientes hospitalizados durante la primera fase de la pandemia de COVID-19 en Panamá, lo que permitió generar evidencia inédita en el ámbito nacional y regional. En un contexto en el que la mayoría de los estudios latinoamericanos se enfocaron en la respuesta humoral, este trabajo aporta datos sólidos sobre la inmunidad celular, ofreciendo un panorama más completo de los mecanismos implicados en la severidad de la enfermedad.

El empleo de citometría espectral multiparamétrica y de herramientas avanzadas de análisis no supervisado (UMAP y FlowSOM) constituye otra fortaleza metodológica

significativa. Esta aproximación de alta resolución permitió identificar y caracterizar subpoblaciones de linfocitos T con precisión, más allá de los análisis convencionales, capturando fenómenos de activación, agotamiento, memoria y regulación inmunológica que aportan información valiosa para la comprensión de la fisiopatología de la COVID-19.

Asimismo, el estudio integró de manera sistemática los biomarcadores séricos con los perfiles inmunofenotípicos T, lo que proporcionó una visión amplia e integrada de la respuesta inmune en pacientes hospitalizados. Este enfoque multimodal refuerza la interpretación de los hallazgos y abre la posibilidad de establecer correlaciones clínicas útiles para la estratificación de pacientes y el diseño de estrategias terapéuticas.

Entre las limitaciones, debe señalarse que el tamaño muestral reducido, particularmente en el subgrupo de pacientes con enfermedad severa, pudo afectar el poder estadístico de las comparaciones. No obstante, los hallazgos mantienen relevancia desde un punto de vista descriptivo y generan hipótesis que servirán de base para estudios posteriores con mayor número de participantes y diseño prospectivo. Otra limitación inherente es el diseño transversal del estudio, que restringe la capacidad de establecer inferencias causales o de evaluar la dinámica temporal de la respuesta inmunológica. Esto adquiere especial importancia en el contexto de la pandemia, dado que la emergencia de nuevas variantes virales, las reinfecciones y la introducción de la vacunación masiva pudieron modificar la respuesta inmune adaptativa en formas no capturadas por el presente análisis.

En conjunto, los resultados refuerzan la hipótesis planteada en este trabajo: los pacientes con COVID-19 severa presentan una actividad linfocitaria no funcional. Además, este estudio representa la primera caracterización integral en Panamá que combina citometría espectral multiparamétrica con análisis de reducción de dimensionalidad (UMAP) y clustering no supervisado (FlowSOM).

Estos hallazgos abren la puerta a la validación de un panel inmunológico pronóstico que combine biomarcadores séricos con perfiles celulares de agotamiento, susceptible de ser implementado en hospitales de referencia durante futuras epidemias virales.

REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Ahmed, S., Paramasivam, P., Raj, K., Kumar, V., Murugesan, R., & Ramakrishnan, V. (2020). Regulatory Cross Talk Between SARS-CoV-2 Receptor Binding and Replication Machinery in the Human Host. *Front Physiol*, 11, 802. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00802>
- Al Saihati, H. A., Hussein, H. A. M., Thabet, A. A., Wardany, A. A., Mahmoud, S. Y., Farrag, E. S., Mohamed, T. I. A., Fathy, S. M., Elnosary, M. E., Sobhy, A., Ahmed, A. E., El-Adly, A. M., El-Shenawy, F. S., Elsadek, A. A., Rayan, A., Zahran, Z. A. M., El-Badawy, O., El-Naggar, M. G. M., Afifi, M. M., & Zahran, A. M. (2023). Memory T Cells Discrepancies in COVID-19 Patients. *Microorganisms*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112737>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Moller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045 e1039. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Bobcakova, A., Barnova, M., Vysehradsky, R., Petriskova, J., Kocan, I., Diamant, Z., & Jesenak, M. (2022). Activated CD8(+)CD38(+) Cells Are Associated With Worse Clinical Outcome in Hospitalized COVID-19 Patients. *Front Immunol*, 13, 861666. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.861666>
- Breton, G., Mendoza, P., Hagglof, T., Oliveira, T. Y., Schaefer-Babajew, D., Gaebler, C., Turroja, M., Hurley, A., Caskey, M., & Nussenzweig, M. C. (2021). Persistent cellular immunity to SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med*, 218(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20202515>
- Brodin, P., & Davis, M. M. (2017). Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*, 17(1), 21-29. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.125>
- Carubbi, F., Salvati, L., Alunno, A., Maggi, F., Borghi, E., Mariani, R., Mai, F., Paoloni, M., Ferri, C., Desideri, G., Cicogna, S., & Grassi, D. (2021). Ferritin is associated with the severity of lung involvement but not with worse prognosis in patients with COVID-19: data from two Italian COVID-19 units. *Sci Rep*, 11(1), 4863. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83831-8>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 395(10223), 507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Combes, A. J., Courau, T., Kuhn, N. F., Hu, K. H., Ray, A., Chen, W. S., Chew, N. W., Cleary, S. J., Kushnoor, D., Reeder, G. C., Shen, A., Tsui, J., Hiam-Galvez, K. J., Munoz-Sandoval, P., Zhu, W. S., Lee, D. S., Sun, Y., You, R., Magnen, M., . . .

- Krummel, M. F. (2021). Global absence and targeting of protective immune states in severe COVID-19. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03234-7>
- Cummings, M. J., Baldwin, M. R., Abrams, D., Jacobson, S. D., Meyer, B. J., Balough, E. M., Aaron, J. G., Claassen, J., Rabbani, L. E., Hastie, J., Hochman, B. R., Salazar-Schicchi, J., Yip, N. H., Brodie, D., & O'Donnell, M. R. (2020). Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet*, 395(10239), 1763-1770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31189-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31189-2)
- Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., . . . Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 371(6529). <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
- De Biasi, S., Meschiari, M., Gibellini, L., Bellinazzi, C., Borella, R., Fidanza, L., Gozzi, L., Iannone, A., Lo Tartaro, D., Mattioli, M., Paolini, A., Menozzi, M., Milic, J., Franceschi, G., Fantini, R., Tonelli, R., Sita, M., Sarti, M., Trenti, T., . . . Cossarizza, A. (2020). Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun*, 11(1), 3434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
- Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H. H., Beckmann, N. D., Nirenberg, S., Wang, B., Lavin, Y., Swartz, T. H., Madduri, D., Stock, A., Marron, T. U., Xie, H., Patel, M., Tuballes, K., Van Oekelen, O., Rahman, A., Kovatch, P., Aberg, J. A., Schadt, E., . . . Gnajatic, S. (2020). An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*, 26(10), 1636-1643. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
- Diaz, J. (2020). SARS-CoV-2 Molecular Network Structure. *Front Physiol*, 11, 870. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00870>
- Diaz, Y., Ortiz, A., Weeden, A., Castillo, D., Gonzalez, C., Moreno, B., Martinez-Montero, M., Castillo, M., Vasquez, G., Saenz, L., Franco, D., Pitti, Y., Chavarria, O., Gondola, J., Moreno, A. M., Abrego, L., Beltran, D., Guerra, I., Chang, J., . . . Gorgas, C. T. (2021). SARS-CoV-2 reinfection with a virus harboring mutation in the Spike and the Nucleocapsid proteins in Panama. *Int J Infect Dis*, 108, 588-591. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.004>
- Duval, D., Palmer, J. C., Tudge, I., Pearce-Smith, N., O'Connell, E., Bennett, A., & Clark, R. (2022). Long distance airborne transmission of SARS-CoV-2: rapid systematic review. *BMJ*, 377, e068743. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-068743>
- Edmans, M., McNee, A., Porter, E., Vatzia, E., Paudyal, B., Martini, V., Gubbins, S., Francis, O., Harley, R., Thomas, A., Burt, R., Morgan, S., Fuller, A., Sewell, A., Charleston, B., Bailey, M., & Tchilian, E. (2020). Magnitude and Kinetics of T Cell and Antibody Responses During H1N1pdm09 Infection in Inbred Babraham Pigs and Outbred Pigs. *Front Immunol*, 11, 604913. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604913>
- Files, J. K., Sarkar, S., Fram, T. R., Boppana, S., Sterrett, S., Qin, K., Bansal, A., Long, D. M., Sabbaj, S., Kobie, J. J., Goepfert, P. A., & Erdmann, N. (2021). Duration of post-COVID-19 symptoms is associated with sustained SARS-CoV-2-specific immune responses. *JCI Insight*, 6(15). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151544>
- Franco, D., Gonzalez, C., Abrego, L. E., Carrera, J. P., Diaz, Y., Caicedo, Y., Moreno, A., Chavarria, O., Gondola, J., Castillo, M., Valdespino, E., Gaitan, M., Martinez-Mandiche, J., Hayer, L., Gonzalez, P., Lange, C., Molto, Y., Mojica, D., Ramos, R., . . .

- . Panama, C. L. N. (2021). Early Transmission Dynamics, Spread, and Genomic Characterization of SARS-CoV-2 in Panama. *Emerg Infect Dis*, 27(2), 612-615. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203767>
- Gaitan, M., Zaldivar, Y., Hernandez, M., Gondola, J., Chavarria, O., Moreno, B., Franco, D., DeAntonio, R., Mirazo, S., Cancela, F., Barnett, M. E., Martinez, A. A., Pascale, J. M., & Lopez-Verges, S. (2024). Cryptic transmission of a SARS-CoV-2 variant detected by wastewater surveillance in Panama. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, 1467484. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1467484>
- Gil-Etayo, F. J., Suarez-Fernandez, P., Cabrera-Marante, O., Arroyo, D., Garcinuno, S., Naranjo, L., Pleguezuelo, D. E., Allende, L. M., Mancebo, E., Lalueza, A., Diaz-Simon, R., Paz-Artal, E., & Serrano, A. (2021). T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 624483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.624483>
- Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Huttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., . . . Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., de Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 181(7), 1489-1501 e1415. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S., Du, B., Li, L. J., Zeng, G., Yuen, K. Y., Chen, R. C., Tang, C. L., Wang, T., Chen, P. Y., Xiang, J., . . . Zhong, N. S. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109013/>
- Guerrera, G., Picozza, M., D'Orso, S., Placido, R., Pirronello, M., Verdiani, A., Termine, A., Fabrizio, C., Giannessi, F., Sambucci, M., Balice, M. P., Caltagirone, C., Salvia, A., Rossini, A., Battistini, L., & Borsellino, G. (2021). BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype. *Sci Immunol*, 6(66), eabl5344. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl5344>
- Guo, L., Wang, G., Wang, Y., Zhang, Q., Ren, L., Gu, X., Huang, T., Zhong, J., Wang, Y., Wang, X., Huang, L., Xu, L., Wang, C., Chen, L., Xiao, X., Peng, Y., Knight, J. C., Dong, T., Cao, B., & Wang, J. (2022). SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study. *Lancet Microbe*, 3(5), e348-e356. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00036-2)
- Haldane, V., De Foo, C., Abdalla, S. M., Jung, A. S., Tan, M., Wu, S., Chua, A., Verma, M., Shrestha, P., Singh, S., Perez, T., Tan, S. M., Bartos, M., Mabuchi, S., Bonk, M., McNab, C., Werner, G. K., Panjabi, R., Nordstrom, A., & Legido-Quigley, H. (2021). Health systems resilience in managing the COVID-19 pandemic: lessons from 28 countries. *Nat Med*, 27(6), 964-980. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01381-y>

- Hernandez-Pineda, E., Amaya, C. A., Gonzalez-Uribe, C., Herrera, A., & Velasco, N. (2024). Covid-19 vaccination: a mixed methods analysis of health system resilience in Latin America. *Int J Equity Health*, 23(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12939-023-02073-4>
- Herold, T., Jurinovic, V., Arnreich, C., Lipworth, B. J., Hellmuth, J. C., von Bergwelt-Baildon, M., Klein, M., & Weinberger, T. (2020). Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*, 146(1), 128-136 e124. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.008>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Muller, M. A., Drosten, C., & Pohlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280 e278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., . . . Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- ICTV, I. C. o. T. o. V. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 5(4), 536.
- Ioannidis, J. P. A., Salholz-Hillel, M., Boyack, K. W., & Baas, J. (2021). The rapid, massive growth of COVID-19 authors in the scientific literature. *R Soc Open Sci*, 8(9), 210389. <https://doi.org/10.1098/rsos.210389>
- Kalimuddin, S., Tham, C. Y. L., Qui, M., de Alwis, R., Sim, J. X. Y., Lim, J. M. E., Tan, H. C., Syenina, A., Zhang, S. L., Le Bert, N., Tan, A. T., Leong, Y. S., Yee, J. X., Ong, E. Z., Ooi, E. E., Bertoletti, A., & Low, J. G. (2021). Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med*, 2(6), 682-688 e684. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.04.003>
- Kaneko, N., Kuo, H. H., Boucau, J., Farmer, J. R., Allard-Chamard, H., Mahajan, V. S., Piechocka-Trocha, A., Lefteri, K., Osborn, M., Bals, J., Bartsch, Y. C., Bonheur, N., Caradonna, T. M., Chevalier, J., Chowdhury, F., Diefenbach, T. J., Einkauf, K., Fallon, J., Feldman, J., . . . Massachusetts Consortium on Pathogen Readiness Specimen Working, G. (2020). Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell*, 183(1), 143-157 e113. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.025>
- Koutsakos, M., Reynaldi, A., Lee, W. S., Nguyen, J., Amarasena, T., Taiaroa, G., Kinsella, P., Liew, K. C., Tran, T., Kent, H. E., Tan, H. X., Rowntree, L. C., Nguyen, T. H. O., Thomas, P. G., Kedzierska, K., Petersen, J., Rossjohn, J., Williamson, D. A., Khoury, D., . . . Juno, J. A. (2023). SARS-CoV-2 breakthrough infection induces rapid memory and de novo T cell responses. *Immunity*, 56(4), 879-892 e874. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.017>
- Kudryavtsev, I., Matyushenko, V., Stepanova, E., Vasilyev, K., Rudenko, L., & Isakova-Sivak, I. (2022). In Vitro Stimulation with Live SARS-CoV-2 Suggests Th17 Dominance In Virus-Specific CD4+ T Cell Response after COVID-19. *Vaccines (Basel)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/vaccines10091544>
- Kunz, D. J., Gomes, T., & James, K. R. (2018). Immune Cell Dynamics Unfolded by Single-Cell Technologies. *Front Immunol*, 9, 1435. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01435>

- Kuri-Cervantes, L., Pampena, M. B., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Ittner, C. A. G., Weisman, A. R., Agyekum, R. S., Mathew, D., Baxter, A. E., Vella, L. A., Kuthuru, O., Apostolidis, S. A., Bershaw, L., Dougherty, J., Greenplate, A. R., Pattekar, A., Kim, J., Han, N., Gouma, S., . . . Betts, M. R. (2020). Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*, 5(49).
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd7114>
- Kusnadi, A., Ramirez-Suastegui, C., Fajardo, V., Chee, S. J., Meckiff, B. J., Simon, H., Pelosi, E., Seumoio, G., Ay, F., Vijayanand, P., & Ottensmeier, C. H. (2021). Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8(+) T cells. *Sci Immunol*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe4782>
- Kwon, T., Osterrieder, N., Gaudreault, N. N., & Richt, J. A. (2023). Fomite Transmission of SARS-CoV-2 and Its Contributing Factors. *Pathogens*, 12(3).
<https://doi.org/10.3390/pathogens12030364>
- Kyrou, I., Randeva, H. S., Spandidos, D. A., & Karteris, E. (2021). Not only ACE2-the quest for additional host cell mediators of SARS-CoV-2 infection: Neuropilin-1 (NRP1) as a novel SARS-CoV-2 host cell entry mediator implicated in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00460-9>
- Laing, A. G., Lorenc, A., Del Molino Del Barrio, I., Das, A., Fish, M., Monin, L., Munoz-Ruiz, M., McKenzie, D. R., Hayday, T. S., Francos-Quijorna, I., Kamdar, S., Joseph, M., Davies, D., Davis, R., Jennings, A., Zlatareva, I., Vantourout, P., Wu, Y., Sofra, V., . . . Hayday, A. C. (2020). A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med*, 26(10), 1623-1635.
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6>
- Lezcano-Coba, C., Galue, J., Whittaker, C., Mills, C., deAntonio, R., Saenz-llorens, X., Rivera, L., Rodriguez, X., Franco, D., Rebolón, A., Espinosa, E., Castillo-Castillo, C., Martínez, A., Martínez, M., León, X., Ríos, A., Arauz, J., Gonzalez, P., Dominguez, C., . . . Carrera, J. P. (2025). SARS-CoV-2 sero-surveillance after the first and second waves of the epidemic in Panama. Preprint. [Original Research]. *medrxiv*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2025.07.20.25331847>
- Lin, J., Law, R., Korosec, C. S., Zhou, C., Koh, W. H., Ghaemi, M. S., Samaan, P., Ooi, H. K., Matveev, V., Yue, F., Gingras, A. C., Estacio, A., Buchholz, M., Cheatley, P. L., Mohammadi, A., Kaul, R., Pavinski, K., Mubareka, S., McGeer, A. J., . . . Ostrowski, M. (2022). Longitudinal Assessment of SARS-CoV-2-Specific T Cell Cytokine-Producing Responses for 1 Year Reveals Persistence of Multicytokine Proliferative Responses, with Greater Immunity Associated with Disease Severity. *J Virol*, 96(13), e0050922. <https://doi.org/10.1128/jvi.00509-22>
- Lu, Z., Laing, E. D., Pena DaMata, J., Pohida, K., Tso, M. S., Samuels, E. C., Epsi, N. J., Dorjbal, B., Lake, C., Richard, S. A., Maves, R. C., Lindholm, D. A., Rozman, J. S., English, C., Huprikar, N., Mende, K., Colombo, R. E., Colombo, C. J., Broder, C. C., . . . Group, E. C.-C. S. (2021). Durability of SARS-CoV-2-Specific T-Cell Responses at 12 Months Postinfection. *J Infect Dis*, 224(12), 2010-2019.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiab543>
- Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T. B. R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M. K., Mao, T., Oh, J. E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A. L., Vogels, C. B. F., . . . Iwasaki, A. (2020). Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, 584(7821), 463-469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>

- Martinez-Sanchez, M. E., Choreno-Parra, J. A., Alvarez-Buylla, E. R., Zuniga, J., & Balderas-Martinez, Y. I. (2022). CD4+ T Cell Regulatory Network Underlies the Decrease in Th1 and the Increase in Anergic and Th17 Subsets in Severe COVID-19. *Pathogens*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens12010018>
- Mathew, D., Giles, J. R., Baxter, A. E., Oldridge, D. A., Greenplate, A. R., Wu, J. E., Alanio, C., Kuri-Cervantes, L., Pampana, M. B., D'Andrea, K., Manne, S., Chen, Z., Huang, Y. J., Reilly, J. P., Weisman, A. R., Ittner, C. A. G., Kuthuru, O., Dougherty, J., Nzingha, K., . . . Wherry, E. J. (2020). Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 369(6508). <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
- Maucourant, C., Filipovic, I., Ponzetta, A., Aleman, S., Cornillet, M., Hertwig, L., Strunz, B., Lentini, A., Reinius, B., Brownlie, D., Cuapio, A., Ask, E. H., Hull, R. M., Haroun-Izquierdo, A., Schaffer, M., Klingstrom, J., Folkesson, E., Buggert, M., Sandberg, J. K., . . . Karolinska, C.-S. G. (2020). Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol*, 5(50). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd6832>
- McIntosh, K., Hirsch, M. S., & Bloom, A. (2021). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Clinical features. Retrieved Feb 22, 2021., from www.uptodate.com
- Meyerowitz, E. A., & Richterman, A. (2022). SARS-CoV-2 Transmission and Prevention in the Era of the Delta Variant. *Infect Dis Clin North Am*, 36(2), 267-293. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.01.007>
- Mihaescu, G., Chifiriuc, M. C., Iliescu, C., Vrancianu, C. O., Ditu, L. M., Marutescu, L. G., Grigore, R., Bertesteanu, S., Constantin, M., & Gradisteanu Pircalabioru, G. (2020). SARS-CoV-2: From Structure to Pathology, Host Immune Response and Therapeutic Management. *Microorganisms*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101468>
- MINSa. (2021). Ministerio de Salud de Panamá. Plan Nacional de Vacunación COVID-19. Ciudad de Panamá.
- MINSa. (2022). Ministerio de Salud. Informe de avance de la estrategia de vacunación COVID-19. Panamá.
- MINSa. (2023). 654 casos confirmados con Covid-19 durante la semana epidemiológica No. 18 https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/informe_covid_semana_no_18_co.pdf
- Moll-Bernardes, R., Fortier, S. C., Sousa, A. S., Lopes, R. D., Vera, N., Conde, L., Feldman, A., Arruda, G., Cabral-Castro, M., Albuquerque, D. C., Paula, T. C., Furquim, T., Loures, V. A., Giusti, K., Oliveira, N., Macedo, A., Barros, E. S. P., De Luca, F., Kotsugai, M., . . . Medei, E. (2022). NKG2A Expression among CD8 Cells Is Associated with COVID-19 Progression in Hypertensive Patients: Insights from the BRACE CORONA Randomized Trial. *J Clin Med*, 11(13). <https://doi.org/10.3390/jcm11133713>
- Moss, P. (2022). The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*, 23(2), 186-193. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>
- Nane, G. F., Robinson-Garcia, N., van Schalkwyk, F., & Torres-Salinas, D. (2023). COVID-19 and the scientific publishing system: growth, open access and scientific fields. *Scientometrics*, 128(1), 345-362. <https://doi.org/10.1007/s11192-022-04536-x>
- Ogawa, F., Oi, Y., Honzawa, H., Misawa, N., Takeda, T., Kikuchi, Y., Fukui, R., Tanaka, K., Kano, D., Kato, H., Abe, T., & Takeuchi, I. (2022). Severity predictors of COVID-19

- in SARS-CoV-2 variant, delta and omicron period; single center study. *PLoS One*, 17(10), e0273134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273134>
- PAHO. (2021). Pan American Health Organization. COVID-19 vaccination in the Americas: Coverage data.
- Port, J. R., Yinda, C. K., Owusu, I. O., Holbrook, M., Fischer, R., Bushmaker, T., Avanzato, V. A., Schulz, J. E., Martens, C., van Doremalen, N., Clancy, C. S., & Munster, V. J. (2021). SARS-CoV-2 disease severity and transmission efficiency is increased for airborne compared to fomite exposure in Syrian hamsters. *Nat Commun*, 12(1), 4985. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25156-8>
- Punt, J., Stranford, S., Jobes, P., & Owen, J. (2018). *Kuby Immunology* (8th edition ed.). WH Freeman, Macmillan Learning.
- Quijada, M., Castillo-Bultron, M., Diaz, Y., Pitti, Y., Franco, D., De La Guardia, C., Campos, D., Cornejo, E., Nunez, M., Mendoza, L., Lopez-Verges, S., Magallon-Tejada, A. H., & Obaldia, N., 3rd. (2025). Antimalarial compounds exhibit variant- and cell-type-specific activity against SARS-CoV-2 isolated in Panama. *Front Pharmacol*, 16, 1537053. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1537053>
- Rha, M. S., Jeong, H. W., Ko, J. H., Choi, S. J., Seo, I. H., Lee, J. S., Sa, M., Kim, A. R., Joo, E. J., Ahn, J. Y., Kim, J. H., Song, K. H., Kim, E. S., Oh, D. H., Ahn, M. Y., Choi, H. K., Jeon, J. H., Choi, J. P., Kim, H. B., . . . Shin, E. C. (2021). PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8(+) T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity*, 54(1), 44-52 e43. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.002>
- Richardson, S., Hirsch, J. S., Narasimhan, M., Crawford, J. M., McGinn, T., Davidson, K. W., the Northwell, C.-R. C., Barnaby, D. P., Becker, L. B., Chelico, J. D., Cohen, S. L., Cookingham, J., Coppa, K., Diefenbach, M. A., Dominello, A. J., Duer-Hefele, J., Falzon, L., Gitlin, J., Hajizadeh, N., . . . Zanos, T. P. (2020). Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*, 323(20), 2052-2059. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
- Rydzynski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., Weiskopf, D., Belanger, S., Abbott, R. K., Kim, C., Choi, J., Kato, Y., Crotty, E. G., Kim, C., Rawlings, S. A., Mateus, J., Tse, L. P. V., Frazier, A., Baric, R., Peters, B., . . . Crotty, S. (2020). Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 183(4), 996-1012 e1019. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
- Santopaolo, M., Gregorova, M., Hamilton, F., Arnold, D., Long, A., Lacey, A., Oliver, E., Halliday, A., Baum, H., Hamilton, K., Milligan, R., Pearce, O., Knezevic, L., Morales Aza, B., Milne, A., Milodowski, E., Jones, E., Lazarus, R., Goenka, A., . . . Rivino, L. (2023). Prolonged T-cell activation and long COVID symptoms independently associate with severe COVID-19 at 3 months. *Elife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.85009>
- Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O., Stralin, K., Gorin, J. B., Olsson, A., Llewellyn-Lacey, S., Kamal, H., Bogdanovic, G., Muschiol, S., Wullimann, D. J., Kammann, T., Emgard, J., Parrot, T., Folkesson, E., Karolinska, C.-S. G., Rooyackers, O., Eriksson, L. I., Henter, J. I., . . . Buggert, M. (2020). Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 183(1), 158-168 e114. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>

- Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861-880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
- Short, K. R., & Cowling, B. J. (2023). Assessing the potential for fomite transmission of SARS-CoV-2. *Lancet Microbe*, 4(6), e380-e381. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00099-X)
- Stephenson, E., Reynolds, G., Botting, R. A., Calero-Nieto, F. J., Morgan, M. D., Tuong, Z. K., Bach, K., Sungnak, W., Worlock, K. B., Yoshida, M., Kumasaka, N., Kania, K., Engelbert, J., Olabi, B., Spegarova, J. S., Wilson, N. K., Mende, N., Jardine, L., Gardner, L. C. S., . . . Infectious Disease-National Institute of Health Research, C.-B. C. (2021). Single-cell multi-omics analysis of the immune response in COVID-19. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01329-2>
- Tang, N., Li, D., Wang, X., & Sun, Z. (2020). Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*, 18(4), 844-847. <https://doi.org/10.1111/jth.14768>
- Ueland, T., Cox, R. J., Michelsen, A. E., Fjelltveit, E. B., Otterdal, K., Dahl, T., Zhou, F., Elyanow, R., Aukrust, P., Blomberg, B., Halvorsen, B. E., & Langeland, N. (2025). Markers of T cell activation and exhaustion in plasma are associated with persistent symptoms up to 18 months following mild SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*, 16, 1578208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1578208>
- V'Kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*, 19(3), 155-170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), 1061-1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, L., Nicols, A., Turtle, L., Richter, A., Duncan, C. J., Dunachie, S. J., Klenerman, P., & Payne, R. P. (2023). T cell immune memory after covid-19 and vaccination. *BMJ Med*, 2(1), e000468. <https://doi.org/10.1136/bmjmed-2022-000468>
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6), 492-499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 486-499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- WHO. (2020a). A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. WHO Working Group on the Clinical Characterisation and Management of Covid-infection. *Lancet Infect Dis*, 20(8), e192-e197. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30483-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30483-7)
- WHO. (2020b). World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 01 - 21Jan2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf?sfvrsn=20a99c10_4
- WHO. (2020c). World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 22 - 11Feb2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2
- WHO. (2020d). World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 51 - 11Mar2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-2019-ncov.pdf?sfvrsn=319b2727_2

- [source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2](https://source.coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2).
- WHO. (2023). *World Health Organization. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Panama country profile*. <https://covid19.who.int/region/amro/country/pa>
- Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Xia, J., Zhou, X., Xu, S., Huang, H., Zhang, L., Zhou, X., Du, C., Zhang, Y., Song, J., Wang, S., Chao, Y., Yang, Z., Xu, J., Zhou, X., Chen, D., Xiong, W., . . . Song, Y. (2020). Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*, 180(7), 934-943. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 323(13), 1239-1242.
- Zheng, H. Y., Zhang, M., Yang, C. X., Zhang, N., Wang, X. C., Yang, X. P., Dong, X. Q., & Zheng, Y. T. (2020). Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*, 17(5), 541-543. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0401-3>
- Zheng, M., Gao, Y., Wang, G., Song, G., Liu, S., Sun, D., Xu, Y., & Tian, Z. (2020). Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*, 17(5), 533-535. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- Zhou, L., Aych, S. K., Chidambaram, V., & Karakousis, P. C. (2021). Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions. *BMC Infect Dis*, 21(1), 496. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06222-4>
- Zhou, R., To, K. K., Wong, Y. C., Liu, L., Zhou, B., Li, X., Huang, H., Mo, Y., Luk, T. Y., Lau, T. T., Yeung, P., Chan, W. M., Wu, A. K., Lung, K. C., Tsang, O. T., Leung, W. S., Hung, I. F., Yuen, K. Y., & Chen, Z. (2020). Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity*, 53(4), 864-877 e865. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.026>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., China Novel Coronavirus, I., & Research, T. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 382(8), 727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

ANEXOS

Anexo 1: Resumen de Estudio Primario EC-CNBI-2020-05-65

Título del Estudio

Estudio prospectivo de la respuesta inmune de pacientes hospitalizados con diagnóstico de COVID-19.

Objetivo General

Evaluar la asociación entre la respuesta inmune innata inducida por la infección por COVID19 en pacientes hospitalizados con la severidad de la enfermedad.

Diseño y Ámbito de Estudio

Estudio multicéntrico, de cohorte, analítico, prospectivo. Se realizarán pruebas biomoleculares de RT-qPCR y serológicas con las muestras de los pacientes.

Enfermedad o Trastorno en Estudio

COVID-19

Población en Estudio

Pacientes positivos por COVID-19 mayores de 18 años.

Financiamiento

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud – Convocatoria Pública de Investigación-Desarrollo-Innovación de Respuesta Rápida al COVID 19 – Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (SENACYT).

Resumen del Protocolo

A finales del 2019 se identificó un nuevo coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) en Wuhan, China. El SARS-CoV-2 ha demostrado ser un virus altamente contagioso, causando estragos económicos, sociales y en la salud pública de varios países. El mismo es el responsable de la pandemia del COVID-19, que a la fecha ha logrado infectar a casi 2.5 millones de personas (17 abril 2020). El virus SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19 aún no tiene cura o tratamiento eficaz, a pesar de que varios tratamientos estén en estudio. La enfermedad se puede presentar en distintos grados de severidad. Al igual que SARS-CoV-1 y MERS, SARS-CoV-2 induce una excesiva respuesta inmune asociada con la patología severa en los pulmones. Las heridas en el tejido pulmonar son más evidentes en pacientes que padecieron de un COVID-19 severo; éstos están asociados a las tormentas de citocinas. La presencia de altos niveles de citocinas proinflamatorias, como IL- 6, y ferritina han sido identificadas en los no-sobrevivientes de COVID-19. Varios estudios han sugerido el uso de corticosteroides como tratamiento para inmunosuprimir la respuesta agresiva del sistema inmune y evitar daños a los tejidos. Se reporta que los pacientes críticos con COVID-19 estudiados presentaron linfopenia y altos niveles lactato deshidrogenasa como posibles biomarcadores de pacientes críticos. No obstante, aún no se han identificado biomarcadores que permitan definir un manejo clínico para mejorar el pronóstico de un paciente con COVID-19 y evitar llegar a desarrollar un cuadro severo.

Nuestro estudio tiene como objetivo general **caracterizar la respuesta inmune de los pacientes positivos hospitalizados con COVID-19 e identificar biomarcadores de severidad**. La hipótesis es que, una respuesta inflamatoria exacerbada no controlada es asociada a una enfermedad más severa, aunado a un factor de riesgo como la edad superior a 65 años, afectando la calidad de la respuesta. Para

probar esta hipótesis, se tomarán muestras respiratorias y sanguíneas de los participantes para poder caracterizar el virus responsable de la infección y analizar el perfil de respuesta inmune a medida que la enfermedad va avanzando. Los objetivos específicos de este estudio son: Determinar la carga viral del virus COVID-19 en las muestras de los pacientes participantes en el estudio; Identificar por secuenciación de genoma completo el virus COVID-19 en las muestras de pacientes; Determinar si existen co-infecciones con otros virus respiratorios u otros patógenos respiratorios; Caracterizar la respuesta inmune innata, principalmente de citocinas pro y anti inflamatorias, especialmente IL-6 e IL-1 β ; Caracterizar la respuesta inmune innata celular; Buscar posible asociación entre la presencia de las citocinas y otros posibles biomarcadores (como los factores de coagulación) y la severidad de la enfermedad, asociado al factor de riesgo edad; Establecer factores de riesgo de la población e identificar posibles biomarcadores que inciden en la evolución del paciente; Evaluar la efectividad del tratamiento temprano anti-IL-6 u otro tratamiento antiinflamatorio para prevenir la admisión en cuidados intensivos, y Caracterizar la respuesta inmune adaptativa de anticuerpos y su asociación con la respuesta inmune innata.

Para esto, además de la descripción de los signos y síntomas de la enfermedad y del análisis de los exámenes de laboratorio requeridos para el manejo clínico, durante el estudio se determinará la carga viral a través del tiempo, se estudiará la respuesta inmune innata principalmente de citocinas, así como la respuesta adaptativa, principalmente de anticuerpos. Se harán pruebas de PCR en tiempo real y pruebas de ELISA para identificar la presencia de ciertas citocinas durante la infección.

Los resultados del estudio nos brindarán una mejor visión de la respuesta inmune de los pacientes de COVID-19 para relacionarlo con el desarrollo de los síntomas y severidad. Es crucial diferenciar la fase en la cual la patogenicidad viral es dominante y cuando la respuesta inflamatoria del sistema inmune sobrelleva la patogenicidad. Los sistemas de salud necesitan conocer el progreso de la enfermedad para saber exactamente cómo tratar cada etapa de esta. En síntesis, este estudio proporcionará información para desarrollar un tratamiento eficiente dependiendo del paciente.

Anexo 2: Aprobación del Protocolo Primario EC-CNBI-2020-05-65 por parte del Comité Nacional de Bioética de la Investigación

	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código del PT: PT-023	Título: Aprobación de Protocolo
Versión: 1.3	Fecha: Agosto 2018

Aprobación de protocolo

Por este medio informamos que, en reunión de este Comité, realizada el 1 de junio de 2020 luego de revisión se decidió **APROBAR** el protocolo en referencia.

No. Interno de Seguimiento:	EC-CNBI-2020-05-65
Número del Protocolo:	
Título de Protocolo:	Estudio Prospectivo de la Respuesta Inmune de Pacientes Hospitalizados con Diagnóstico de COVID19
Patrocinador:	SENACYT
Investigador Principal:	Dra. Sandra López
Nombre y Dirección del Sitio de Investigación aprobado:	ICGES Hospital Santo Tomás CSS-CHDRAAM
Fecha de aprobación:	1 de junio de 2020
Fecha de vencimiento de aprobación:	

Se revisaron y aprobaron los siguientes documentos			
Nombre	Versión	Fecha	Idioma
Protocolo	2	26 de mayo de 2020	Español
Formulario de Consentimiento Informado	2	28 de mayo de 2020	Español

Por este medio se hace constar que los siguientes miembros del CNBI estuvieron presentes en la sesión en la cual se APROBO el protocolo	
Nombre	Institución a la que representa
Argentina Ying	Universidad de Panamá
Luis Coronado	Hospital del Niño

 COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN PANAMÁ	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código del PT: PT-023	Título: Aprobación de Protocolo
Versión: 1.3	Fecha: Agosto 2018

Rita Trujillo	Caja de Seguro Social
Sulgeis Lasso	MINSA
Marisin Pecchio	INDICASAT AIP
María E. Barnett	ICGES
Lynn Marie Chambonnet	SENACYT
Aida Libia Moreno de Rivera	ABIOPAN

La aprobación está sujeta al cumplimiento de las siguientes responsabilidades del Investigador Principal, quien deberá velar y garantizar su cumplimiento durante el desarrollo del estudio en el sitio de investigación a su cargo:

- Conducir la investigación de acuerdo al protocolo aprobado.
- Conducir la investigación en observancia a las Buenas Prácticas Clínicas, regulaciones locales e internacionales aplicables.
- Conducir la investigación en observancia a los acuerdos y condiciones establecidas durante el proceso de revisión y aprobación.
- Delegar las funciones del estudio a personal calificado, con la experiencia y educación que respalden su capacidad para desempeñar las funciones delegadas.
- Desarrollar y supervisar personalmente la investigación.
- Obtener aprobación del CNBI previo a incorporar cambios en el protocolo; exceptuando aquellos casos en que sea necesario para proteger la vida y seguridad del sujeto, estos casos deberán notificarse inmediatamente al CNBI.
- Obtener y documentar adecuadamente el consentimiento informado de cada sujeto participante o potencialmente participando, haciendo uso de las formas vigentes aprobadas por el CNBI.
- Reportar dentro de las 24 horas de conocimiento todo evento adverso serio ocurrido a los sujetos participantes en el sitio de investigación.
- Reportar dentro de 30 días toda información de seguridad recibida del patrocinador.
- Presentar oportunamente los reportes continuos y final del desarrollo de la investigación.
- Recibir y atender las visitas del CNBI al sitio de investigación cuando lo solicite.
- Atender los requerimientos del CNBI relacionados al desarrollo de la investigación u otros aplicables a la conducción de estudios clínicos en sitios de investigación.

	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código del PT: PT-023	Título: Aprobación de Protocolo
Versión: 1.3	Fecha: Agosto 2018

Por este medio se certifica que la información arriba descrita es fiel y verdadera según se refleja en los archivos y documentación del Comité Nacional de Ética de la Investigación de Panamá.


Argentina Ying
Presidenta del CNBI

Anexo 3: Autorización del Comité de Bioética de participación del Dr. RODERICK CHEN-CAMAÑO MD PhD y del Dr. RODRIGO DeANTONIO en el estudio EC-CNBI-2020-05-65

	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código: PT-031	Título: Aprobación de enmiendas
Versión: 1.1	Fecha: Julio 2018

Aprobación de enmiendas

Por este medio informamos que, en reunión de este Comité, realizada el 12 de enero de 2021 luego de revisión se decidió **APROBAR** la enmienda presentada para el protocolo en referencia, según se describe a continuación.

No. Interno de Seguimiento:	EC-CNBI-2020-05-65
Número del Protocolo:	-
Título de Protocolo:	Estudio Prospectivo de la Respuesta Inmune de Pacientes Hospitalizados con Diagnóstico de COVID19
Patrocinador:	SENACYT
Investigador Principal:	Dra. Sandra López

Se revisaron y aprobaron los siguientes documentos			
Nombre	Versión	Fecha	Idioma
Incorporación de nuevos investigadores: 1. Dr. Roderick Chen 2. Dr. Juan Batista 3. Dr. Rodrigo De Antonio 4. Dr. José Domingo De Obaldía	N/A	6 de enero de 2021	Español

Por este medio se certifica que la información arriba descrita es fiel y verdadera según se refleja en los archivos y documentación del Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá.


Argentina Ying
Presidenta del CNBI

Anexo 4: Aprobación del Protocolo del sub-estudio EC-CNBI-2021-10-156 por parte del Comité Nacional de Bioética de la Investigación

	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código del PT: PT-023	Título: Aprobación de Protocolo
Versión: 1.4	Fecha: Marzo 2021

Aprobación de protocolo

Por este medio informamos que, en reunión de este Comité, realizada el día 26 de octubre de 2021 luego de revisión, se decide: **Solicitud de modificaciones mínimas para aprobación** del protocolo en referencia, mismas que fueron subsanadas y **Aprobado** por los revisores el día 15 de noviembre de 2021.

No. Interno de Seguimiento:	EC-CNBI-2021-10-156
Número del Protocolo:	
Título de Protocolo:	CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR LINFOCITOS T EN PACIENTES HOSPITALIZADOS CON ENFERMEDAD POR CORONAVIRUS (COVID-19). PANAMÁ 2020-2021.
Patrocinador:	
Investigador Principal:	Dr. Roderick Chen
Nombre y Dirección del Sitio de Investigación aprobado:	ICGES
Fecha de aprobación:	15 de noviembre de 2021
Fecha de vencimiento de aprobación:	

Se revisaron y aprobaron los siguientes documentos			
Nombre	Versión	Fecha	Idioma
Protocolo	v.6	15 octubre 2021	Español

 COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN PANAMÁ	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código del PT: PT-023	Título: Aprobación de Protocolo
Versión: 1.4	Fecha: Marzo 2021

Por este medio se hace constar que los siguientes miembros del CNBI estuvieron presentes en la sesión en la cual se APROBO el protocolo	
Nombre	Institución a la que representa
Argentina Ying	Universidad de Panamá
Luis Coronado	Hospital del Niño
Rita Trujillo	Caja de Seguro Social
Marisin Pecchio	INDICASAT AIP
Jessica Candanedo	MINSA
Nydia Flores	Caja de Seguro Social
Lynn Chambonet	SENACYT
Fernando Díaz	Hospitales Privados

La aprobación está sujeta al cumplimiento de las siguientes responsabilidades del Investigador Principal, quien deberá velar y garantizar su cumplimiento durante el desarrollo del estudio en el sitio de investigación a su cargo:

- *Conducir la investigación de acuerdo al protocolo aprobado.*
- *Conducir la investigación en observancia a las Buenas Prácticas Clínicas, regulaciones locales e internacionales aplicables.*
- *Conducir la investigación en observancia a los acuerdos y condiciones establecidas durante el proceso de revisión y aprobación.*
- *Delegar las funciones del estudio a personal calificado, con la experiencia y educación que respalden su capacidad para desempeñar las funciones delegadas.*
- *Desarrollar y supervisar personalmente la investigación.*
- *Obtener aprobación del CNBI previo a incorporar cambios en el protocolo; exceptuando aquellos casos en que sea necesario para proteger la vida y seguridad del sujeto, estos casos deberán notificarse inmediatamente al CNBI.*

	Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá Plantilla de Trabajo
Código del PT: PT-023	Título: Aprobación de Protocolo
Versión: 1.4	Fecha: Marzo 2021

- *Obtener y documentar adecuadamente el consentimiento informado de cada sujeto participante o potencialmente participando, haciendo uso de las formas vigentes aprobadas por el CNBI.*
- *Reportar dentro de las 24 horas de conocimiento todo evento adverso serio ocurrido a los sujetos participantes en el sitio de investigación.*
- *Reportar dentro de 30 días toda información de seguridad recibida del patrocinador.*
- *Presentar oportunamente los reportes continuos y final del desarrollo de la investigación.*
- *Recibir y atender las visitas del CNBI al sitio de investigación cuando lo solicite.*
- *Atender los requerimientos del CNBI relacionados al desarrollo de la investigación u otros aplicables a la conducción de estudios clínicos en sitios de investigación.*

Nota: Únicamente puede utilizar el material para reclutamiento del estudio aprobado por el CNBI, debe advertir a los posibles participantes que no deben divulgar información sobre el estudio con fines del enrolamiento de otros participantes.

Por este medio se certifica que la información arriba descrita es fiel y verdadera según se refleja en los archivos y documentación del Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá.


Argentina Ying
Presidenta del CNBI

Anexo 5: Escala de progresión clínica de la Organización Mundial de la Salud.

Tabla 11

Escala de Progresión Clínica de la Organización Mundial de la Salud

Estado clínico	Descriptor	Puntaje
No infectado	No infectado, ARN viral no detectado	0
Ambulatorio: Enfermedad leve	Asintomático, ARN viral detectado	1
	Sintomático, independiente	2
	Sintomático, requiere asistencia	3
Hospitalizado: Enfermedad moderada	Hospitalizado, sin oxigenoterapia*	4
	Hospitalizado, oxígeno por máscara facial o puntas nasales	5
Hospitalizado: Enfermedad severa	Hospitalizado, oxígeno por VNI o alto flujo	6
	Ventilación mecánica, $pO_2/FiO_2 \geq 150$ ó $SpO_2/FiO_2 \geq 200$	7
	Ventilación mecánica $pO_2/FiO_2 < 150$ ($SpO_2/FiO_2 < 200$) o vasopresores	8
	Ventilación mecánica $pO_2/FiO_2 < 150$ y vasopresores, diálisis i ECMO	9
Fallecido	Fallecido	10

ECMO, Membrana de oxigenación extracorpórea. FiO_2 , Fracción inspirada de oxígeno. VNI, Ventilación no invasiva. pO_2 , Presión parcial de oxígeno. SpO_2 , saturación de oxígeno. *Si está hospitalizado solo por aislamiento, se debe documentar como paciente ambulatorio.

Anexo 6: Protocolo de Preparación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) y de Tinción Multiparámetrica para Citometría de Flujo Espectral (Protocolo para tinción de PBMCs en placas de 96 pozos)

Generalidades

- Preparar el cóctel de anticuerpos antes de la preparación de la muestra (opcional si solo trabaja un usuario).
- Preparar el diseño para un plato de 96 pocillos.
- Para panel multicolor se recomienda: ~3.5 millones de células. Muestra No Teñida: 400,000 células. Si hay menos de 2.5 millones, usar 200,000 células para Muestra No Teñida.
- Para controles se recomienda: 280,000–400,000 células por control de referencia de tinción simple (22 controles de fluorescencia, uno de viabilidad y un “No Teñido”) y ~1 millón para muestra multicolor.
- Incluir muestra multicolor como control de teñido y como referencia de tinción. Etiquetar la muestra control como LSR2.

Materiales

- PBMCs congeladas
- Corning®, Solución salina amortiguada con fosfato (PBS), 1X sin calcio ni magnesio, pH $7,4 \pm 0,1$, 21-040-CM
- BD Pharmingen™, Solución tampón de tinción (BSA), 554657
- BD Biosciences®, Solución tampón de tinción brillante (BSB), 566385
- Biolegend®, TruStain FcX™ humano (solución de bloqueo de rFc, 4 °C), 422301
- Solución tampón de fijación: diluir Paraformaldehído (PFA, 4.2 %) en PBS para preparar solución al 1 %
- Cyttek Biosciences®, ViaDye™ Red, Tinte de viabilidad, –20 °C, R7-60008
- Anticuerpos con fluorocromos
- Platos de 96 pozos
- Tubos cónicos de 50 mL
- Toallas de papel para secado

Descongelamiento muestras de PBMCs

1. Precalentar ~50 mL de RPMI (10 % SueroFetalBovino -FBS-, 1 % Penicilina/ Estreptomycin) a 37 °C por al menos 30 minutos.
2. Retirar el vial del tanque de N₂ líquido y colocarlo en hielo.
3. Descongelar rápidamente el vial en baño de agua a 37 °C hasta que el núcleo se suelte.
4. Transferir las células del vial al tubo cónico de 50 mL.
5. Añadir lentamente, gota a gota, 10 mL de medio tibio a las células en el tubo cónico de 50 mL, mientras agita suavemente el tubo.
6. Añadir 1 mL de medio tibio al vial vacío para recuperar células remanentes. Déjelo reposar.
7. Añadir el contenido del vial del paso 5, en el tubo cónico de 50 mL.
8. Añadir medio tibio adicional hasta completar un volumen final de 20 mL.
9. Centrifugar a 300 g por 8 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).

10. Decantar el sobrenadante.
11. Resuspender gentilmente el pellet en 10 mL de medio tibio usando pipeta serológica.
12. Resuspender volumen adecuado de 10 mL de medio tibio para conteo celular-
13. Contar células y calcular viabilidad con azul tripano.
14. Anotar el porcentaje de viabilidad y concentración (cells/mL).
15. Aflojar la tapa del tubo y colocar en incubadora hasta su uso posterior.
16. Calcular suspensión celular para cada muestra y sembrar en los pozos a la concentración requerida.

Preparación de tinte de viabilidad ViaDye™Red

1. Descongelar completamente el Dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Añadir 100 µL de DMSO al vial liofilizado ViaDye™Red (solución madre 1 mM).
3. Vórtex hasta mezclar completamente.
4. Alicuotar y congelar a -20 °C hasta su uso.
5. Descongelar la alícuota a temperatura ambiente, protegido de la luz, antes de cada uso. No recongelar, no reutilizar.
6. Diluir la solución madre a 1:500 en PBS (solución de trabajo 2 µM).
7. Utilizar la solución de trabajo a 5 µL por prueba para un volumen de 100 µL. Para plato, usar 2.5 µL para un volumen total de 50 µL por pozo.

TINCIÓN

Controles de referencia de viabilidad

1. Descongelar y verter un aproximado de 280,000 células de un donante de PBMC's en un tubo de 10 mL. Utilizar para controles de viabilidad y dividir el contenido en dos: "Control Vivo" y "Control Muerto".
2. Matar las células (control "muertas") mediante ciclos de congelación (-80 °C, 5 min) y choque térmico (42 °C, 3 min), repetir 2 veces.
3. Rotular un plato de 96 pocillos para controles de referencia de viabilidad
4. Añadir 280,000 células a cada pocillo, luego, añadir PBS hasta completar un volumen final de 200µL.
5. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7-9), a temperatura ambiente (20-23 °C).
6. Decantar sobrenadante y dar vórtex suficiente.
7. Repetir pasos 4 a 6, sin dar vórtex.
8. Añadir 2.5 µL de la solución de trabajo de ViaDye™Red al pellet de células con 50 µL de PBS (1/20).
9. Mezclar con la micropipeta e incubar por 15 min, protegido de luz.
10. Agregar 150 µL de BSA,
11. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7-9), a temperatura ambiente (20-23 °C).
12. Decantar sobrenadante.
13. Repetir pasos de 10 a 13.
14. Fije las células con 100 µL de solución tampón de fijación y dé vórtex exhaustivamente.
15. Mezclar con la micropipeta.
16. Incube por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
17. Agregar 150 µL de BSA,
18. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7-9), a temperatura ambiente (20-23 °C).
19. Decantar sobrenadante.
20. Resuspenda en 200 µL de BSA, mezcle con la micropipeta.

Controles de referencia de tinción celular única

1. Rotular un plato de 96 pocillos para controles de tinción única (incluyendo controles “no teñido”).
2. Añadir 280,000–400,000 células a cada pocillo (50 µL de volumen final). Asegurar mayor concentración para los marcadores CD95, CD197 (CCR7) y CD183 (CXCR3)
3. Añadir BSA hasta completar un volumen final de 200 µL.
4. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
5. Decantar sobrenadante.
6. Repetir pasos 3 a 6.
7. Resuspender en BSA con el volumen apropiado para que a añadir cada anticuerpo monoclonal, finalice con un volumen de tinción de 50 µL.
8. Mezclar con la micropipeta.
9. Incubar por 20 min a temperatura ambiente, protegido de la luz.
10. Agregar 150 µL de BSA a cada control.
11. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
12. Decantar sobrenadante.
13. Repetir pasos 10 a 12.
14. Fije las células: añadir 100 µL de solución tampón de fijación (PFA 1%) y de vórtex exhaustivamente.
15. Incubar por 20 min a temperatura ambiente, protegido de la luz.
16. Agregar 100 µL de BSA a cada control.
17. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
18. Decantar sobrenadante.
19. Resuspender en 200 µL de BSA y mezclar con la micropipeta.

Muestra multicolor

1. Rotular un plato de 96 pocillos para muestras multicolor
2. Preparar cóctel de anticuerpos en un vial de 1.5 mL. Para una muestra multicolor, primero añadir 20 µL de BSB, luego añadir los conjugados anticuerpos-fluorocromo uno por uno, excepto por CD95, CCR7 y CXCR3 que se añadirán aparte. Calcule la preparación de un cóctel multicolor adicional por cualquier pérdida en el proceso. Prepare los cocteles al momento de hacer la tinción.
3. Añadir ~2 millones de células en 50 µL de medio tibio, a la muestra multicolor.
4. Añadir 150 µL de PBS para completar un volumen final de 200 µL.
5. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
6. Decantar sobrenadante.
7. Mezclar con la micropipeta.
8. Añadir 2.5 µL de la solución de trabajo de ViaDye™Red al pellet de células con 50 µL de BSA.
9. Mezclar con la micropipeta e incubar por 15 min, a temperatura ambiente (20–23 °C), protegido de luz.
10. Agregar 150 µL de BSA,
11. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
12. Decantar sobrenadante.
13. Mezclar con la micropipeta.

14. Añadir 5 µL de BSB, 2.5 µL de TruStain FcX™ y 2.5 µL de CD95 al pellet celular. Incube por 5 min a temperatura ambiente (20–23 °C), protegido de la luz.
15. Añadir 2.5 µL de CD197 (CCR7), 2.5 µL de CD183 (CXCR3). Incube por 10 min a temperatura ambiente (20–23 °C), protegido de la luz.
16. Añade el cóctel (41.0 µL) preparado en el paso 2 y dé vórtex exhaustivamente.
17. Incube por 20 minutos a temperatura ambiente (20–23 °C), protegido de la luz.
18. Agregar 150 µL de BSA,
19. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
20. Decantar sobrenadante.
21. Repetir pasos 18 a 20.
22. Fije las células: añadir 100 µL de solución tampón de fijación (PFA 1%) y de vórtex exhaustivamente.
23. Mezclar con la micropipeta.
24. Incube por 20 minutos a temperatura ambiente (20–23 °C), protegido de la luz.
25. Agregar 100 µL de BSA,
26. Centrifugar a 400 g por 5 min, freno normal (7–9), a temperatura ambiente (20–23 °C).
27. Decantar sobrenadante.
28. Resuspenda en 200 µL de BSA, mezcle con la micropipeta.
29. Adquiera las muestras a flujo medio o almacene las células para ser leídas antes de cumplidas 48 horas de la tinción.

Detalle de los complejos AnticuerpoMonoclonal-Fluorocromo utilizados para panel de citometría espectral

CD / Nombre alterno	Fluorocromo	Clon	Volumen (uL)
CD3	BV570	UCHT1	2.5
CD4	PerCP-Fire 806	SK3	0.5
CD8	BV480	SK1	1.25
CD14	cFluor B548	63D3	2.5
CD16	BV650	3G8	2.5
CD19	Spark NIR 685	HIB19	0.6
CD20	cFluor V547	2H7	2.5
CD25 / IL-2Rα	PE-Fire 700	M-A251	2.5
CD27	APC-Fire 810	QA17A18	2.5
CD38	BV711	HIT2	2.5
CD45	APC-Fire 750	2D1	1.25
CD45RA	cFluor V450	HI100	2.5
CD56 / NCAM	BV750	5.1H11	2.5
CD57	FITC	HNK-1	0.6
CD69	PE-Dazzle 594	FN50	2.5
CD95 / Fas	R718	DX2	2.5
CD127 / IL-7Rα	APC	A019D5	2.5
CD183 / CXCR3	PE-Cy7	G025H7	2.5
CD197 / CCR7	BV421	G043H7	2.5
CD279 / PD-1	BV785	EH12.2H7	2.5
CD303 / BDCA-2	PE	201A	0.55
CD314 / NKG2D	Alexa Fluor 647	1D11	1.25

Distribución de los fluorocromos por longitud de onda de emisión

Longitud de onda de emisión (nm)	Láser Violeta	Láser Azul	Láser Rojo
387			
395			
420	CCR7 BV421		
440			
450	CD45RA V450		
480	CD8 BV480		
500			
520		CD57 FITC	
520		CD14 B548	
550	CD20 V547		
570	CD3 BV570	CD303 PE	
580			
600		CD69 PE-Dazzle 594	
660	CD16 BV650		CD127 APC
680			CD314 AF647
690			CD19 Spark NIR 685
700	CD38 BV711	CD25 PEFire700	CD95 R718
750	CD56 BV750		CD45 APC-Fire 750
780	PD-1 BV785	CXCR3 PECy7	ViaDye Red
800		CD4 PerCPF806	CD27 APC-Fire 810