

Activación de células T CD8⁺ tras la vacunación con esquema heterólogo SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus en niños de 5-11 años

Rocmira Pérez-Nicado^{1*} ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1657-6130>
Laura Marta Rodríguez-Noda¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0171-4681>
Rinaldo Puga-Gómez² ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-3352>
Yariset Ricardo-Delgado² ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-5310-4069>
Beatriz Paredes-Moreno¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2034-6773>
Meiby de la C. Rodríguez-González¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4205-0415>
Ilianet Palmero-Álvarez¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0543-7271>
Daniel García-Rivera³ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5538-1555>
Yury Valdés-Balbín¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0638-3896>
Vicente Verez-Bencomo¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5596-6847>
Dagmar García-Rivera¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2099-1791>

¹ Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

² Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”. La Habana, Cuba.

³ Laboratorio de Síntesis Química. Facultad de Química. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

Autor correspondiente: rpnicado@finlay.edu.cu

En los niños, la COVID-19 se manifiesta habitualmente en formas leves, sin embargo, se han descrito secuelas derivadas de la enfermedad y un impacto importante de las poblaciones pediátricas en la transmisión de la enfermedad. En este escenario, la vacunación sigue siendo la alternativa más prometedora y la respuesta vacunal debe ser caracterizada, no solo por la generación de anticuerpos neutralizantes, sino también por la capacidad de generar respuesta T citotóxica. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la polarización y activación de linfocitos T CD8⁺ tras la vacunación con el esquema heterólogo SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus en comparación con la respuesta natural en niños. Para ello se seleccionó un subgrupo de niños de 5-11 años (n = 15) vacunados y un grupo de niños recuperados de enfermedad COVID-19 leve o moderada (n = 10) como control. Muestras de sangre fueron tomadas 14 días después de la dosis con SOBERANA[®]Plus. Se evaluaron las subpoblaciones celulares Tc1, Tc2 y Tc17 mediante citometría de flujo multiparamétrica. Adicionalmente, se determinó la capacidad de activación de estas células y la frecuencia de células secretoras mediante ensayo de secreción de IFN- γ tras estimulación *in vitro*. Como resultado se observaron mayores valores en la frecuencia de células Tc1 (CCR4⁺CCR3⁺CCR6⁻) en vacunados, en comparación con los niños recuperados (p<0,0001). Las células Tc2 (CCR4⁺CCR3⁺CCR6⁻) y Tc17 (CCR4⁺CCR3⁺CCR6⁺) muestran los mayores valores en los sujetos controles recuperados en comparación con los vacunados (p = 0,0318) y (p = 0,0017), respectivamente. Tras el estímulo *in vitro* con péptidos de la proteína S1 no se observaron diferencias entre el grupo vacunado con respecto al control recuperado de COVID-19 en frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ activados (p = 0,0563). Con respecto al control, los niños vacunados mostraron mayores valores de células CD8⁺IFN- γ ⁺ (p = 0,0096). En conclusión, la vacunación con el esquema heterólogo SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus activa los linfocitos T CD8⁺ con polarización a células Tc1.

Palabras clave: coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo; COVID-19; vacunas; niños; linfocitos T CD8-positivos.

* Licenciada en Biología. Investigadora Auxiliar. Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

Introducción

A finales de 2019 una enfermedad respiratoria humana de etiología desconocida emergió en Wuhan, República Popular China; dicha enfermedad nombrada COVID-19 tiene como agente etiológico el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés).⁽¹⁾ La COVID-19 fue declarada pandemia en marzo del 2020 y hasta el momento continúa siendo una emergencia global responsable de más de 6 millones de decesos a nivel mundial.⁽²⁾

Mientras en adultos las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían desde una infección respiratoria alta leve, hasta el síndrome de distrés respiratorio, en la población pediátrica la enfermedad grave suele ser poco frecuente. Sin embargo, existen evidencias de complicaciones severas como son el síndrome inflamatorio multisistémico y secuelas a largo plazo de la enfermedad.⁽³⁾

Dentro de las plataformas y tecnologías utilizadas para el desarrollo de vacunas contra la COVID-19 destacan, sin dudas, las vacunas basadas en ARNm desarrolladas por Pfizer/Biotech y Moderna. Aunque se han aplicado millones de dosis en niños entre 5-11 años de edad, se han reportado eventos adversos poco frecuentes relacionados a seguridad como miocarditis.⁽⁴⁾ Dado su perfil de seguridad, el desarrollo y aplicación de vacunas basadas en subunidades proteicas se muestra como una alternativa prometedora.⁽⁵⁾

La mayoría de los anticuerpos con alta capacidad neutralizante son generados contra el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) de la proteína espiga del SARS-CoV-2. En este sentido, SOBERANA[®]02 es un conjugado químico del RBD recombinante en forma monomérica con el toxoide tetánico como proteína portadora;⁽⁶⁾ mientras SOBERANA[®]Plus posee en su formulación el RBD recombinante en forma dimérica,⁽⁷⁾ adsorbidos ambos en hidróxido de aluminio como adyuvante vacunal. La inmunización heteróloga con dos dosis de SOBERANA[®]02 seguidas de una dosis de SOBERANA[®]Plus con 28 días de intervalo ha demostrado ser segura, inmunogénica y eficaz en adultos de 19-80 años⁽⁸⁾ y en niños de 3-18 años.⁽⁹⁾ Este esquema

previene formas graves sintomáticas de la enfermedad en adultos con una eficacia del 92 %.⁽⁸⁾

La respuesta inmune de memoria establecida después de la infección o la vacunación, proporciona al menos protección inmune parcial sobre la posible reinfección o la enfermedad. La memoria inmunológica tiene múltiples componentes como los anticuerpos circulantes, células B de memoria y células T CD4⁺ y CD8⁺.⁽¹⁰⁾ Dentro del compartimento de las células T, las células CD8⁺ citotóxicas son responsables de la eliminación de células infectadas y juegan un rol muy importante en el control de los virus. Las células T CD8⁺ con fenotipo efector liberan moléculas citotóxicas y son capaces de eliminar de forma específica las células infectadas.⁽¹¹⁾

En nuestro conocimiento SOBERANA[®]02 es la única vacuna conjugada contra la COVID-19 aplicada en población pediátrica. Con anterioridad se demostró la seguridad e inmunogenicidad de este candidato vacunal en niños de 3-18 años⁽⁹⁾ y se caracterizó en una subcohorte la respuesta de células B y T de memoria efectoras en comparación con la respuesta natural.⁽¹²⁾ Sin embargo, algunos aspectos de la activación y polarización de las células T CD8⁺ quedaron por elucidar, aspecto importante para la comprensión de los mecanismos inmunológicos de esta vacuna en la población pediátrica. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la polarización y activación de linfocitos T CD8⁺ tras la vacunación con el esquema heterólogo SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus en comparación con la respuesta natural en niños.

Materiales y Métodos

Descripción del estudio

Se seleccionó aleatoriamente un subgrupo de niños de entre 5 y 11 años (n = 15) entre los participantes en un ensayo clínico de fase I/II realizado en el Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez" de La Habana, Cuba⁽⁹⁾ (registro del ensayo: <https://rpcec.sld.cu/trials/RPCEC00000374>- En, consultado el 1 de julio de 2024).

Los niños fueron vacunados cada 28 días con el esquema heterólogo de dos dosis de SOBERANA[®]02 y

una tercera dosis con SOBERANA[®]Plus. El estudio se realizó en octubre de 2021 durante la prevalencia de la variante Delta y antes de la aparición de la variante Ómicron.⁽¹³⁾ Los criterios clave de inclusión fueron peso, talla, valoración nutricional, exploración física sin alteraciones y resultados de laboratorio clínico dentro del rango de valores de referencia. Los criterios claves de exclusión fueron cualquier infección aguda, una historia previa o actual de infección por SARS-CoV-2 y estar en contacto con un caso COVID-19 positivo. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para la detección del SARS-CoV-2 se realizó en todos los participantes al menos 72 h antes de cada dosis. Los detalles de los criterios de inclusión y exclusión fueron descritos con anterioridad por Puga-Gómez *et al.*, 2023.⁽⁹⁾

Además, como control de la inmunidad causada por la infección natural por SARS-CoV-2, 10 niños de entre 4 y 11 años, que habían sufrido COVID-19 con sintomatología leve, confirmada por RT-PCR 45-60 días antes de la extracción de sangre, fueron reclutados en una consulta médica de seguimiento para niños convalecientes en el hospital donde se realizó el ensayo clínico. Todos ellos se infectaron durante el predominio de la variante Delta. Estos sujetos informaron de una única infección previa confirmada por RT-PCR a SARS-CoV-2. Todos los padres firmaron un consentimiento informado para incluir a sus hijos en este estudio y se les comunicaron los resultados. Los investigadores médicos facilitaron a los padres toda la información sobre la vacunación y sus posibles riesgos y beneficios.

Extracción de células mononucleares de sangre periférica

La toma de muestras de sangre fue realizada por punción venosa en tubos con anticoagulante EDTA-K₃ Vacutainer[™] (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) 14 días después de la tercera dosis con SOBERANA[®] Plus. Las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas por gradiente diferencial de centrifugación utilizando Ficoll-Paque[™] Plus (GE-Healthcare, Uppsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Brevemente, la sangre anticoagulada fue cuidadosamente depositada sobre el Ficoll y centrifugada a 400 x g durante 25 min, a temperatura ambiente. La fracción rica en leucocitos fue

cuidadosamente extraída para posteriormente ser lavada y centrifugada tres veces a 300 x g por 5 min para remover plaquetas. Finalmente, las células fueron conservadas en nitrógeno líquido utilizando como medio de criopreservación suero fetal bovino inactivado (SFB, Gibco, Bleiswijk, Países Bajos) y 10 % de dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

Identificación de linfocitos T CD8⁺ mediante citometría de flujo multiparamétrica

Las células criopreservadas fueron descongeladas y resuspendidas en medio RPMI 1640 (Gibco, Bleiswijk, Países Bajos) suplementado con 10 % de SFB (Gibco, Bleiswijk, Países Bajos) y se ajustó la concentración celular a 1 x 10⁶ células/mL. Una vez lavadas las células dos veces a 300 x g durante 5 min con solución de citometría (solución salina tamponada con fosfato 1 X suplementado con seroalbúmina bovina 1 %, Sigma-Aldrich, EUA), se añadió la mezcla de anticuerpos con los marcadores de superficie. Para la identificación de polarización de células T citotóxicas se preparó una mezcla conteniendo anticuerpos anti-humano CD3 FITC (SK7, BD Biosciences), CD183 (CXCR3) PE (1C6/CXCR3, BD Pharmingen[™]), CD196 (CCR6) PE-Cy7 (G034E3, BioLegend), CD4 APC (RPA-T4, BD Pharmingen[™]), CD8 APC-H7 (SK1, BD Pharmingen[™]), CD45 V500 (HI30, BD Horizon[™]) y CD194 BV605 (CCR4)(1G1, BD Biosciences). La tinción se realizó durante 30 min a 4 °C y posterior al lavado, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences). Los datos fueron analizados con los softwares FACS Diva 8.0 y FlowJo X 10.0.7 (BD Biosciences).

Para la determinación de marcadores de activación y secreción de IFN- γ se realizó un ensayo de secreción, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Miltenyi-Biotec, Alemania). El ensayo fue descrito con anterioridad por Pérez-Nicado *et al.*⁽¹²⁾

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza para dos variables no relacionadas, con la prueba U de Mann Whitney. Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 9 para Windows (Versión 9.0.0, GraphPad Software, LLC). Valores

probabilísticos (p) inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Para examinar la respuesta de células T CD8⁺ en niños de 5-11 años vacunados con esquema heterólogo SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus en comparación con la respuesta natural se determinó la frecuencia de diferentes subpoblaciones de células T CD8⁺. La

estrategia de análisis para identificar subpoblaciones de células CD8⁺ en los grupos de estudio se muestra en la Figura 1.

Como se observa en la Figura 2 la frecuencia de las poblaciones tipo Tc1 (CD8⁺CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁻) mostró diferencias estadísticas entre los sujetos vacunados y los sujetos recuperados de COVID-19 (p < 0,0001) siendo los mayores porcentajes en los sujetos vacunados con el esquema heterólogo.

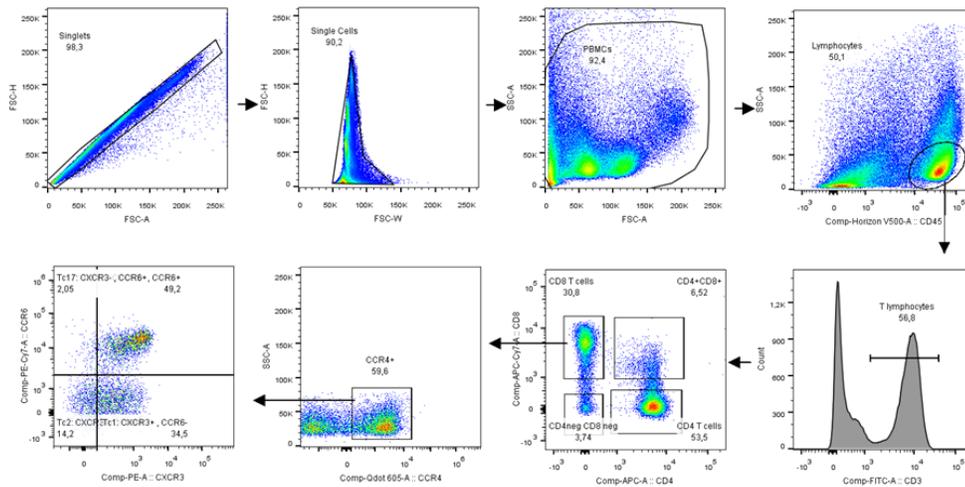


Fig. 1. Estrategia de análisis de la citometría de flujo multiparamétrica para el análisis de las subpoblaciones de células T CD8⁺ polarizadas.

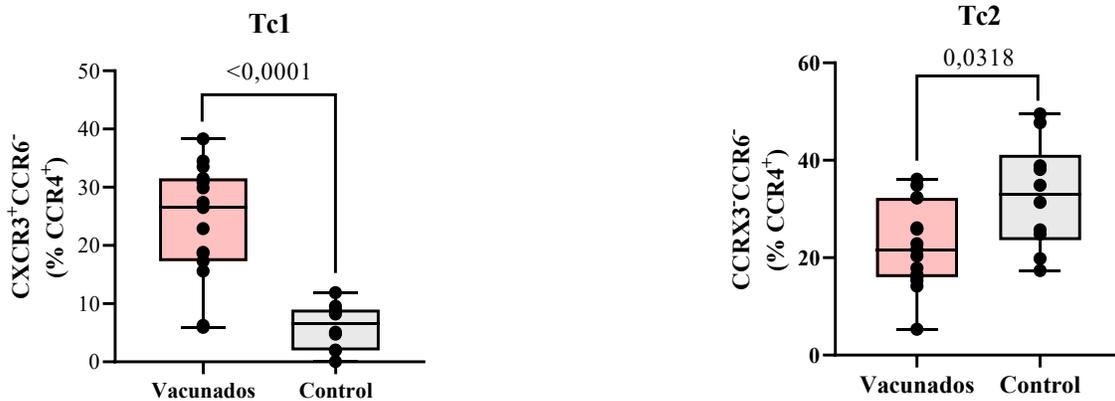


Fig. 2. Frecuencia de células T CD8⁺ Tc1 en sujetos (niños) vacunados en comparación con sujetos recuperados de COVID-19. Células mononucleares de sangre periférica de niños vacunados y recuperados de COVID-19 fueron separadas y teñidas con una mezcla de anticuerpos para detectar subpoblaciones de células T CD8⁺. Se muestra la frecuencia de células Tc1 (CD8⁺CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁻). Los datos se muestran como la media ± DEM y valores de p provenientes de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Fig. 3. Frecuencia de células T CD8⁺ Tc2 en sujetos (niños) vacunados en comparación con sujetos recuperados de COVID-19. Células mononucleares de sangre periférica de niños vacunados y niños recuperados de COVID-19 (control) fueron separadas y teñidas con una mezcla de anticuerpos para detectar subpoblaciones de células T CD8⁺. Se muestra la frecuencia de células T CD8⁺ Tc2 (CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁻). Los datos se muestran como la media ± DEM y valores de p provenientes de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

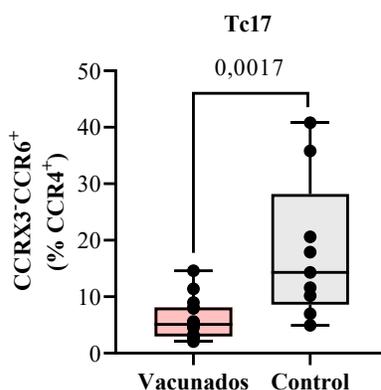


Fig. 4. Frecuencia de células T CD8⁺ Tc17 en sujetos (niños) vacunados en comparación con sujetos recuperados de COVID-19. Células mononucleares de sangre periférica de niños vacunados y niños recuperados de COVID-19 (control) fueron separadas y teñidas con una mezcla de anticuerpos para detectar subpoblaciones de células T CD8⁺. Se muestra la frecuencia de células Tc17 (CD8⁺CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁺). Los datos se muestran como la media ± DEM y valores de p provenientes de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

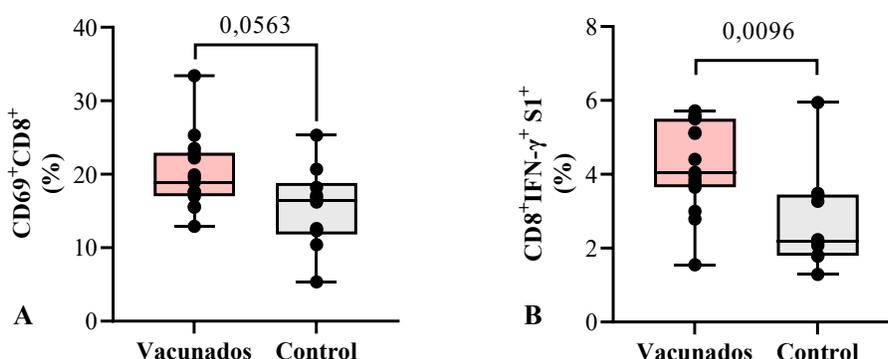


Fig. 5. Porcentaje de linfocitos T activados (CD8⁺CD69⁺) y secretoras de IFN-γ en sujetos vacunados y recuperados de COVID-19. Células mononucleares de sangre periférica de niños vacunados y niños recuperados de COVID-19 (control) fueron separadas estimuladas con péptidos de la proteína S1 y teñidas con una mezcla de anticuerpos para detectar células T CD8⁺ activadas y secretoras de IFN-γ. A. Frecuencia de células activadas CD8⁺CD69⁺ B. Frecuencia de células T CD8⁺ secretoras de IFN-γ. Los datos se muestran como la media ± DEM y valores de p provenientes de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

En contraste, en el análisis de las subpoblaciones de células T CD8⁺Tc2 (CCR4⁺CCRX3⁻CCR6⁻) se observan los mayores valores de frecuencia en el grupo control recuperado con respecto al grupo de niños vacunados con el esquema heterólogo, siendo las medias diferentes estadísticamente (p = 0,0318) (Fig. 3).

De forma similar en el compartimento de las células T CD8⁺ Tc17 (CCR4⁺ CCRX3⁻ CCR6⁺) se observa que los mayores valores de frecuencia relativa están en el grupo recuperado de la COVID-19 con respecto al grupo vacunado, siendo la diferencia estadísticamente significativa (p = 0,0017) (Fig. 4).

Para comparar las propiedades efectoras de la respuesta CD8⁺ tras la vacunación o tras la enfermedad, se estimularon células mononucleares de sangre periférica *in vitro* con péptidos de la proteína S1 del SARS-CoV-2 y se determinó la proporción de células T específicas CD8⁺ CD69⁺ activadas, así como la secreción de IFN-γ. Como se observa en la Figura 5A, aunque la media de los valores de proporción de células activadas CD8⁺ CD69⁺ es mayor en los sujetos vacunados en comparación con el control de niños recuperados, no se evidencia diferencia estadística (p = 0,0563). No obstante, el porcentaje de células secretoras de IFN-γ muestra valores superiores con respecto al control de

niños recuperados siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0357$) (Fig. 5B).

Discusión

El rápido desarrollo de las vacunas contra la COVID-19 marcó un hito en la vacunología mundial.⁽¹⁴⁾ Tras millones de dosis aplicadas contra enfermedades infecciosas como la meningitis y la neumonía, las vacunas basadas en subunidades proteicas han demostrado ser seguras y efectivas en poblaciones adultas y pediátricas.⁽⁵⁾ Aunque los anticuerpos neutralizantes se consideran un subrogado de protección, cada vez surgen más evidencias que apuntan al rol indispensable de la respuesta de células citotóxicas como complemento de la respuesta efectora contra el virus SARS-CoV-2.⁽¹⁵⁾

Diferentes plataformas y tecnologías fueron usadas destacando, sin dudas, las vacunas basadas en ARNm. Aunque los niños no fueron la población más afectada por la pandemia, el rol que juegan en la transmisión del virus, el reporte de complicaciones y secuelas a largo plazo y la aparición de variantes de preocupación marcaron el inicio del desarrollo e implementación de vacunas a esta población.⁽¹⁶⁾ En este sentido, Cuba introdujo a finales del 2021 el esquema heterólogo de vacunación con SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus en población pediátrica.⁽¹³⁾

Dentro de los mecanismos inmunológicos contra el virus SARS-CoV-2 no solo los anticuerpos neutralizantes juegan un papel importante, si bien son relevantes para evitar la infección de las células; una vez infectadas, se requiere de efectores citotóxicos como las células T CD8⁺. Estas, a su vez, se dividen en diferentes subgrupos, cuyo estudio permite profundizar en la complejidad de la respuesta inmunológica vacunal⁽¹⁷⁾ y trazar estrategias para el diseño racional de inmunoterapias o vacunas.

Las células T CD8⁺ Tc1 han sido relacionadas tradicionalmente con las enfermedades virales como hepatitis C y VIH. Estas células efectoras se caracterizan mayoritariamente por la producción de perforinas, granzimas, IFN- γ y TNF- α permitiendo mediar la eliminación de las células infectadas por diferentes vías.⁽¹⁷⁾ En nuestro estudio se encontraron niveles mayores de

células T CD8⁺ Tc1 (CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁻) en los sujetos vacunados con respecto a los sujetos controles recuperados de COVID-19 leve o moderado. Esto sugiere que la vacunación induce células efectoras con mayor potencial citotóxico que la infección natural leve o moderada. Este resultado está en correspondencia con reportes previos que señalan que los sujetos convalecientes presentan menores niveles de células T CD8⁺ Tc1 con respecto a sujetos sanos controles.⁽¹⁸⁾

A diferencia de las células Tc1, las células Tc2, productoras mayoritariamente de IL-4, carecen de la habilidad de producir gránulos citotóxicos y, por ende, de eliminar las células dianas.⁽¹⁹⁾ En nuestro estudio se encontraron mayores niveles de CD8⁺CCR4⁺CCRX3⁻CCR6⁻ (Tc2) en los niños recuperados de COVID-19 con respecto a aquellos vacunados. Este resultado está en correspondencia con reportes anteriores que señalan que pacientes recuperados de COVID-19 muestran mayor proporción de células T CD8⁺ Tc2,⁽²⁰⁾ aunque, en este caso, el resultado debe ser analizado cuidadosamente por no tener la contraparte de la medición de células CD8⁺IL-4⁺.

Por su parte las células T CD8⁺ Tc17 son definidas como células altas productoras de IL-17A, algunos autores señalan que estas células poseen limitada capacidad citolítica y expresan niveles mínimos de granzima B y perforina.⁽²¹⁾ En este estudio se encontraron mayores niveles de células Tc17 (CD8⁺CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁺) en niños recuperados de COVID-19 con respecto a niños vacunados. Al respecto se ha señalado que las células Tc17 se relacionan con el profundo efecto proinflamatorio que exacerba la inflamación durante la infección por SARS-CoV-2.⁽²²⁾

Existen muchos mecanismos potenciales por los cuales las células T CD4⁺ y CD8⁺ pueden contribuir a la respuesta protectora contra las enfermedades infecciosas. La producción de citoquinas como el IFN- γ puede actuar sobre las células infectadas e incrementar el estado antiviral intrínseco de las mismas, así como sobre el microambiente local del tejido y favorecer el reclutamiento de otras células efectoras al sitio de la infección. En el caso específico del SARS-CoV-2 se ha señalado que el IFN- γ participa en la profilaxis y resolución de la fibrosis pulmonar provocada por el virus, una de las mayores complicaciones de la COVID-

19.⁽¹⁵⁾ En nuestro trabajo se observa una marcada activación e incremento significativo de la producción de IFN- γ en células T CD8⁺ específicas tras la estimulación *in vitro* en correspondencia, además, con los niveles de células Tc1 circulantes. Con anterioridad se había demostrado que este esquema de vacunación inducía niveles de IFN- γ y que diferentes fenotipos de memoria eran responsables de esta secreción en el compartimento de las células CD8⁺,^(9,12) pero no se había analizado la activación de estas poblaciones y su capacidad de secreción con respecto a niños recuperados. Se ha señalado recientemente que aunque las vacunas basadas en ARNm inducen respuesta celular T específica en adultos, esta respuesta se ve marcadamente disminuida en poblaciones de 5-11 años,⁽²³⁾ lo que sugiere la necesidad de implementar o combinar otras plataformas vacunales que induzcan respuesta T citotóxica. En conclusión, la vacunación con el esquema heterólogo SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus activa los linfocitos T CD8⁺ con polarización a células Tc1.

Conflicto de intereses

El Instituto Finlay de Vacunas (IFV) es titular del Registro Médico Sanitario de las vacunas SOBERANA[®]02 y SOBERANA[®]Plus. Rocmira Pérez-Nicado, Laura Marta Rodríguez-Noda, Beatriz Paredes-Moreno, Meiby de la C. Rodríguez-González, Ilianet Palmero-Álvarez, Yury Valdés-Balbín, Vicente Verez-Bencomo y Dagmar García-Rivera son investigadores del IFV.

Los otros autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Rocmira Pérez-Nicado: conceptualización, toma de muestras, inmunofenotipaje de células T y ensayos de secreción, análisis de los resultados y escritura del manuscrito.

Laura Marta Rodríguez-Noda: conceptualización, análisis de los resultados y escritura del manuscrito.

Rinaldo Puga-Gómez: reclutamiento, seguimiento de los sujetos y toma de muestras.

Yarisset Ricardo-Delgado: reclutamiento, seguimiento de los sujetos y toma de muestras.

Beatriz Paredes-Moreno: reclutamiento, seguimiento de los sujetos y toma de muestras.

Meiby de la C. Rodríguez-González: reclutamiento, seguimiento de los sujetos y toma de muestras.

Ilianet Palmero-Álvarez: inmunofenotipaje de células T y ensayos de secreción.

Daniel García-Rivera: supervisión, adquisición de fondos y administración del proyecto.

Yury Valdés-Balbín: supervisión, adquisición de fondos y administración del proyecto.

Vicente Verez-Bencomo: supervisión, adquisición de fondos y administración del proyecto.

Dagmar García-Rivera: conceptualización, diseño y discusión del ensayo, supervisión y revisión del manuscrito.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363-74. doi: <https://10.1038/s41577-020-0311-8>.
2. McVernon J, Liberman J. WHO keeps covid-19 a public health emergency of international concern. *BMJ.* 2023;380:504. doi: <https://10.1136/bmj.p504>.
3. Martin B, DeWitt PE, Russell S, Anand A, Bradwell KR, Bremer C, et al. Characteristics, Outcomes, and Severity Risk Factors Associated With SARS-CoV-2 Infection Among Children in the US National COVID Cohort Collaborative. *JAMA Netw Open.* 2022;5(2):e2143151. doi: <https://10.1001/jamanetworkopen.2021.43151>.
4. Offit PA. COVID-19 Vaccines in Young Children-Reassuring Evidence for Parents. *JAMA Pediatr.* 2023;177(4):333-4. doi: <https://10.1001/jamapediatrics.2022.6251>.
5. Frenkel LD. The global burden of vaccine-preventable infectious diseases in children less than 5 years of age: Implications for COVID-19 vaccination. How can we do better? *Allergy Asthma Proc.* 2021;42(5):378-85. doi: <https://10.2500/aap.2021.42.210065>.
6. Valdes-Balbin Y, Santana-Mederos D, Quintero L, Fernández S, Rodriguez L, Sanchez Ramirez B, et al. SARS-CoV-2 RBD-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Induces a Strong Neutralizing Immunity in Preclinical Studies. *ACS*

- Chem Biol. 2021;16(7):1223-33. doi: <https://10.1021/acscchembio.1c00272>.
7. Ochoa-Azze R, Chang-Monteagudo A, Climent-Ruiz Y, Macías-Abraham C, Valenzuela-Silva C, de los Ángeles García-García M, et al. Safety and immunogenicity of the FINLAY-FR-1A vaccine in COVID-19 convalescent participants: an open-label phase 2a and double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b, seamless, clinical trial. *Lancet Respir Med.* 2022;10(8):785-95. doi: [https://10.1016/S2213-2600\(22\)00100-X](https://10.1016/S2213-2600(22)00100-X).
 8. Toledo-Romaní ME, García-Carmenate M, Valenzuela-Silva C, Baldoquín-Rodríguez W, Martínez-Pérez M, Rodríguez-González M, et al. Safety and efficacy of the two doses conjugated protein-based SOBERANA-02 COVID-19 vaccine and of a heterologous three-dose combination with SOBERANA-Plus: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 clinical trial. *Lancet Reg Health Am.* 2023;18:100423. doi: <https://10.1016/j.lana.2022.100423>.
 9. Puga-Gómez R, Ricardo-Delgado Y, Rojas-Iriarte C, Céspedes-Henriquez L, Piedra-Bello M, Vega-Mendoza D, et al. Open-label phase I/II clinical trial of SARS-CoV-2 receptor binding domain-tetanus toxoid conjugate vaccine (FINLAY-FR-2) in combination with receptor binding domain-protein vaccine (FINLAY-FR-1A) in children. *Int J Infect Dis.* 2023;126:164-73. doi: <https://10.1016/j.ijid.2022.11.016>.
 10. Kent SJ, Khoury DS, Reynaldi A, Juno JA, Wheatley AK, Stadler E, et al. Disentangling the relative importance of T cell responses in COVID-19: leading actors or supporting cast? *Nat Rev Immunol.* 2022;22(6):387-97. doi: <https://10.1038/s41577-022-00716-1>.
 11. Westmeier J, Paniskaki K, Karaköse Z, Werner T, Sutter K, Dolff S, et al. Impaired Cytotoxic CD8+ T Cell Response in Elderly COVID-19 Patients. *mBio.* 2020;11(5):e02243-20. doi: <https://10.1128/mbio.02243-20>.
 12. Pérez-Nicado R, Massa C, Rodríguez-Noda LM, Müller A, Puga-Gómez R, Ricardo-Delgado Y, et al. Comparative Immune Response after Vaccination with SOBERANA 02® and SOBERANA® plus Heterologous Scheme and Natural Infection in Young Children. *Vaccines.* 2023;11:1636. doi: <https://10.3390/vaccines11111636>.
 13. Toledo-Romaní ME, Valenzuela-Silva C, Montero-Díaz M, Iñiguez-Rojas L, Rodríguez-González M, Martínez-Cabrera M, et al. Real-world effectiveness of the heterologous SOBERANA-02 and SOBERANA-Plus vaccine scheme in 2-11 years-old children during the SARS-CoV-2 Omicron wave in Cuba: a longitudinal case-population study. *Lancet Reg Health Am.* 2024;34:100750. doi: <https://10.1016/j.lana.2024.100750>.
 14. Fauci AS. The story behind COVID-19 vaccines. *Science.* 2021;372(6538):109. doi: <https://10.1126/science.abi8397>.
 15. Goldblatt D, Alter G, Crotty S, Plotkin SA. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunol Rev.* 2022;310(1):6-26. doi: <https://10.1111/imr.13091>.
 16. Nathanielsz J, Toh ZQ, Do LAH, Mulholland K, Licciardi PV. SARS-CoV-2 infection in children and implications for vaccination. *Pediatr Res.* 2023;93:1177-87. doi: <https://10.1038/s41390-022-02254-x>.
 17. Koh CH, Lee S, Kwak M, Kim BS, Chung Y. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Exp Mol Med.* 2023;55(11):2287-99. doi: <https://10.1038/s12276-023-01105-x>.
 18. Yang J, Zhong M, Zhang E, Hong K, Yang Q, Zhou D, et al. Broad phenotypic alterations and potential dysfunction of lymphocytes in individuals clinically recovered from COVID-19. *J Mol Cell Biol.* 2021;13(3):197-209. doi: <https://10.1093/jmcb/mjab014>.
 19. Do JS, Choi YH, Shin SH, Yi HK, Hwang PH, Nam SY. Committed memory effector type 2 cytotoxic T (Tc2) cells are ineffective in protective anti-tumor immunity. *Immunol Lett.* 2004;95(1):77-84. doi: <https://10.1016/j.imlet.2004.06.006>.
 20. Saris A, Reijnders TDY, Reijm M, Hollander JC, de Buck K, Schuurman AR, et al. Enrichment of CCR6+ CD8+ T cells and CCL20 in the lungs of mechanically ventilated patients with COVID-19. *Eur J Immunol.* 2021;51(6):1535-38. doi: <https://10.1002/eji.202049046>.
 21. Hamada H, Garcia-Hernandez MdIL, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, et al. Tc17, a Unique Subset of CD8 T Cells That Can Protect against Lethal Influenza Challenge. *J Immunol.* 2009;182(6):3469-81. doi: <https://10.4049/jimmunol.0801814>.
 22. Martonik D, Parfieniuk-Kowerda A, Rogalska M, Flisiak R. The Role of Th17 Response in COVID-19. *Cells.* 2021;10(6):1550. doi: <https://10.3390/cells10061550>.
 23. Philpott JD, Miller J, Boribong BP, Charles S, Davis JP, Kazimierczyk S, et al. Antigen-specific T cell responses in SARS-CoV-2 mRNA-vaccinated children. *Cell Rep Med.* 2023;4(12):101298. doi: <https://10.1016/j.xcrm.2023.101298>.

CD8⁺ T-cell activation after vaccination with SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus heterologous schedule in children aged 5-11 years

Abstract

In children, COVID-19 usually manifests in mild forms, but sequelae of the disease and a significant impact of pediatric populations on disease transmission have been described. In this scenario, vaccination remains the most promising alternative and the vaccine response should be characterized not only by the generation of neutralizing antibodies, but also by the ability to induce a cytotoxic T response. The aim of this study was to determine the activation of CD8⁺ T cells after vaccination with the heterologous schedule of two doses of SOBERANA[®]02 and one dose of SOBERANA[®]Plus in children. For this purpose, a subgroup of vaccinated children aged 5-11 years (n = 15) and a group of children recovering from moderate COVID-19 disease (n = 10) were selected as controls. Blood samples were taken 14 days after administration of SOBERANA[®]Plus. Tc1, Tc2 and Tc17 subpopulations were assessed by multiparametric flow cytometry. In addition, the activation capacity of these cells and the frequency of secreting cells were determined by IFN- γ secretion assay after *in vitro* stimulation. As a result, higher values for the frequency of Tc1 cells (CCR4⁺CCRX3⁺CCR6⁻) were observed in vaccinated compared to recovered children (p < 0.0001). Tc2 (CCR4⁺CCRX3⁻CCR6⁻) and Tc17 (CCR4⁺CCRX3⁻CCR6⁺) cells show the highest values in recovered controls compared to vaccinated (p = 0.0318) and (p = 0.0017), respectively. After *in vitro* stimulation with S1 protein peptides, no differences in the frequency of activated CD8⁺CD69⁺ T lymphocytes were observed between the vaccinated group and the COVID-19 recovered control (p = 0.0563). Compared to the control group, vaccinated children showed higher levels of CD8⁺IFN- γ ⁺ cells (p=0.0096). In conclusion, vaccination with the heterologous SOBERANA[®]02/SOBERANA[®]Plus regimen activates CD8⁺ T lymphocytes with polarization to Tc1 cells.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; vaccines; children; lymphocytes T CD8+.

Recibido: 30 de julio de 2024

Aceptado: 19 de febrero de 2025