

El legado de la infección materna por SARS-CoV-2 en la inmunología del neonato

Sarah Gee

Nature Immunology, DOI <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01049-2>, 06 de octubre de 2021

A pesar de la pandemia en curso de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), el efecto de la infección materna por SARS-CoV-2 en la inmunología del recién nacido en desarrollo no está claro. Se ha informado que la infección por SARS-CoV-2 durante el embarazo da lugar a resultados variables para la madre. La mayoría de las mujeres embarazadas infectadas son asintomáticas o experimentan síntomas leves [1](#). No obstante, las mujeres embarazadas con SARS-CoV-2, particularmente en el tercer trimestre, tienen un mayor riesgo de hospitalización y cuidados intensivos [2](#), y la evidencia existente demuestra que las tasas de infección materna aumentaron en la segunda ola [3](#). Aunque las tasas de parto prematuro no parecían ser elevadas en los informes iniciales, los datos sugieren que las mujeres embarazadas tienen un mayor riesgo de parto prematuro posterior, aunque este efecto se debe principalmente a la intervención clínica basada en la enfermedad materna más que a la aparición espontánea de trabajo de parto prematuro [4](#).

Con respecto al recién nacido, un estudio de vigilancia nacional del Reino Unido sugirió que la infección neonatal por SARS-CoV-2 es poco común incluso en recién nacidos de madres con infección perinatal [5](#). De manera similar, un estudio de los Estados Unidos de 116 madres con infección perinatal confirmada por SARS-CoV-2 no identificó ningún caso neonatal [6](#). Ahora existen criterios claros para definir la transmisión maternoinfantil del SARS-CoV-2 (<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-mother-to-child-transmission-2021.1/>), y una pequeña cantidad de informes de casos individuales tienen evidencia documentada de transmisión vertical [7](#)·[8](#)·[9](#). Los resultados de estos y otros estudios sugieren que la transmisión vertical es posible, pero poco frecuente.

Aunque la transmisión vertical del SARS-CoV-2 es poco frecuente, las posibles perturbaciones inmunológicas inducidas en la madre embarazada [10](#) podrían dejar un legado inmunológico en el recién nacido con consecuencias de gran alcance. De hecho, existe evidencia de que la inflamación perinatal puede modular el sistema inmunológico en desarrollo de los recién nacidos prematuros [11](#). El sistema inmunológico del feto puede verse alterado por la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la hepatitis C (VHC) en las madres, con o sin transmisión vertical [12](#)·[13](#); los metabolitos derivados de la microbiota intestinal materna pueden moldear el sistema inmunológico de la descendencia [14](#); y que la modulación del sistema inmunológico neonatal se asocia con enfermedades en la vejez [15](#). En los pocos estudios que evalúan el estado inmunológico de los recién nacidos de madres infectadas con SARS-CoV-2, ha habido poca evidencia de efecto en la inmunidad celular y humoral del recién nacido [16](#). De manera similar, un pequeño estudio de la infección por SARS-CoV-2 durante el embarazo se ha asociado con una respuesta de citocinas en la circulación fetal (es decir, sangre del cordón umbilical) sin efecto sobre el repertorio inmunológico celular [17](#). Sin embargo, hasta donde sabemos, ninguno de estos estudios ha incluido un análisis completo del perfil inmunológico celular de los recién nacidos de madres

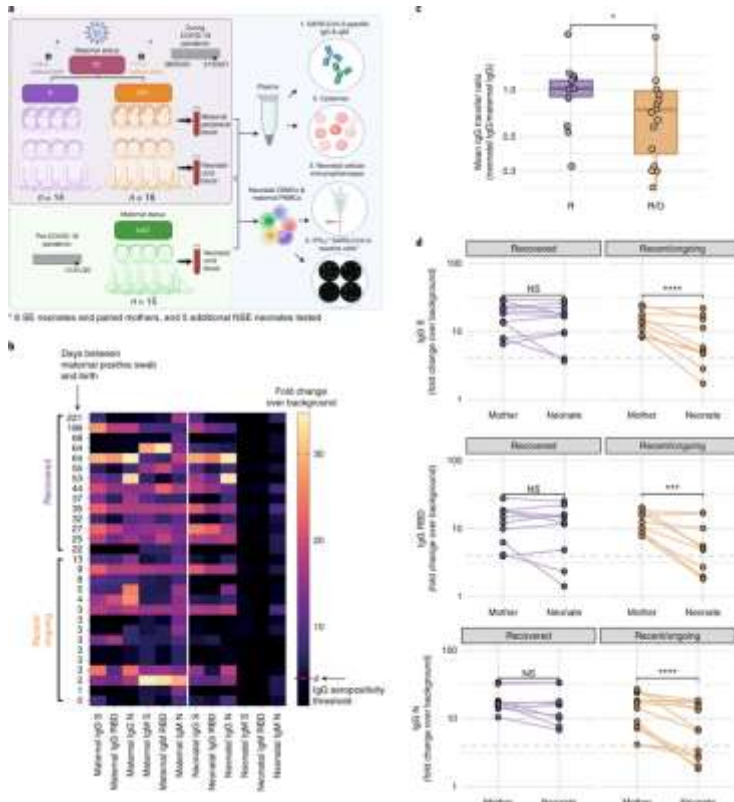
expuestas al SARS-CoV-2 (en cualquier momento de su embarazo) en comparación con los perfiles de los recién nacidos de madres no expuestas. De hecho, es cada vez más difícil incluir un grupo de control adecuado en una pandemia mundial. Además, aún no se han investigado las respuestas de las células T neonatales específicas a los péptidos del SARS-CoV-2. Además, falta el análisis simultáneo de citocinas y títulos de anticuerpos en recién nacidos y sus madres emparejadas.

Aquí, evaluamos el estado inmunológico de los recién nacidos de madres con SARS-CoV-2 que dieron positivo durante las 2 semanas directamente antes del nacimiento o antes del embarazo, en comparación con los nacidos de madres que nunca estuvieron expuestas al SARS-CoV-2, para identificar si existe un legado de infección materna y preparación in utero del sistema inmunológico neonatal.

Resultados

Transferencia reducida de anticuerpos en recién nacidos de madres con infección reciente o en curso

Las descripciones de los grupos están disponibles en la Figura 1a. Los recién nacidos de madres con exposición al SARS-CoV-2 (expuestos al SARS-CoV-2 (SE), $n = 30$) se agruparon en aquellos nacidos de madres con infección reciente o en curso (R / O, identificado por una prueba de PCR positiva dentro de 2 semanas de nacimiento, $n = 16$), o los nacidos de madres que dieron positivo en una etapa anterior de la gestación (grupo recuperado (R), resultó positivo al menos 2 semanas antes del nacimiento, $n = 14$, mediana de hisopo positivo 48,5 d antes del nacimiento).



a, Esquema del estudio que ilustra el reclutamiento de recién nacidos y madres en el grupo SE ($n = 30$), que comprende dos grupos (R, $n = 14$; R / O, $n = 16$) y recién nacidos en el grupo NSE ($n = 15$). Figura creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com). **b**, Mapa de calor que muestra los niveles emparejados de IgG e IgM materna y neonatal contra los epítomos S, RBD y N SARS-CoV-2 medidos en plasma de sangre materna y sangre del cordón extraído en el momento

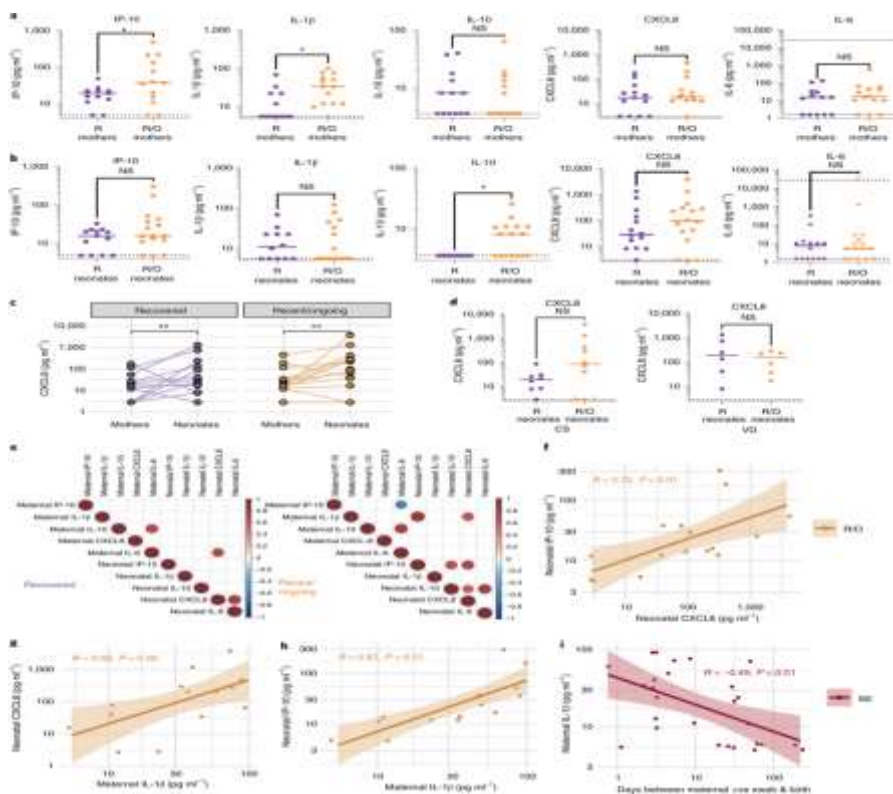
del parto. Los niveles máximos de IgG / IgM (cambio de veces sobre el fondo) se muestran dentro de las díadas recién nacido-madre (cada fila; R, $n = 14$; R / O, $n = 15$), ordenados por el número de días entre el frotis nasofaríngeo positivo materno y el nacimiento. El cambio cuádruple (sobre el fondo) se definió como el umbral de seropositividad de IgG. **c**, Diagrama de caja de la tasa de transferencia media de IgG (promedio de IgG S, N y RBD) entre los recién nacidos y sus madres emparejadas dentro de los grupos R ($n = 14$) y R / O ($n = 15$). **d**, Niveles máximos pareados de IgG maternos y neonatales (cambio de veces sobre el fondo) en díadas con madres seropositivas solamente (el cambio de cuatro veces sobre el fondo se indica mediante la línea gris discontinua) dentro de la R (IgG S, $n = 11$; IgG RBD, $n = 9$; IgG N, $n = 9$) y R / O (IgG S, $n = 10$; IgG RBD, $n = 9$; IgG N, $n = 12$) grupos. Cada línea une a un recién nacido y su madre emparejada. Los diagramas de caja siguen las representaciones estándar de Tukey; la línea central indica la mediana, las líneas superior e inferior representan los percentiles 75 y 25, respectivamente, y los bigotes representan 1,5 veces los percentiles 75 y 25. Los valores de p se evaluaron mediante pruebas de suma de rangos de Wilcoxon no emparejadas (**c**) y pruebas de Wilcoxon emparejadas (**d**). Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y todos los valores de P (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$) no se ajustaron.

Tanto en el grupo reciente / en curso como en el recuperado, independientemente del tiempo entre el hisopo positivo y el nacimiento o los niveles de IgM materna, no se detectó IgM específica del SARS-CoV-2 en el plasma del cordón, lo que sugiere una falta de transmisión vertical (Fig. [1b](#)). Esto fue cierto para la IgM dirigida contra la proteína de pico (S), el dominio de unión al receptor (RBD) dentro de la proteína de pico, así como la nucleoproteína (N) para la cual se ha demostrado que la reactividad de IgM de fondo es mayor [18](#). Por el contrario, se detectó IgG específica del SARS-CoV-2 contra los tres antígenos en recién nacidos de madres expuestas al SARS-CoV-2 (Fig. [1b](#)). Si bien no hubo diferencias significativas en los niveles de IgG específica del SARS-CoV-2 en las díadas madre-recién nacido en el grupo recuperado, hubo niveles significativamente más bajos de IgG específica del SARS-CoV-2 en los recién nacidos de madres con infección (Datos extendidos Fig. [1a](#)). Por lo tanto, cuando se calculó la relación de inmunoglobulina neonatal a su inmunoglobulina materna emparejada (relación de transferencia) para cada antígeno, la relación de transferencia media de los tres antígenos fue significativamente menor en el grupo R / O (0,79) en comparación con el grupo R (1,04; Figura [1c](#)). Esto fue a pesar de la presencia de altos niveles de IgG materna en al menos algunas madres en el grupo R / O (Datos extendidos Fig. [1a](#)). De hecho, cuando solo se comparan los niveles de IgG en recién nacidos de madres seropositivas, la transferencia de IgG específica de SARS-CoV-2 al recién nacido fue significativamente menor en el grupo R / O (Fig. [1d](#)), mientras que nuevamente los niveles de anticuerpos fueron comparables entre madre y recién nacido en el grupo R. La transferencia de anticuerpos no pareció diferir con el sexo del recién nacido, ya que los neonatos masculinos y femeninos en el grupo R / O tenían significativamente menos IgG específica de SARS-CoV-2 en comparación con sus madres seropositivas (Datos extendidos, Fig. [1b](#)).

Niveles elevados de citocinas en plasma en madres con infección reciente o en curso y sus recién nacidos

Se sabe que la infección por SARS-CoV-2 en adultos se asocia con una marcada elevación de varias citocinas plasmáticas, incluida la proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), interleucina (IL) -1 β , CXCL8, IL-6 e IL-10 (refs. [19](#)·[20](#)·[21](#)). Las concentraciones plasmáticas de citocinas se evaluaron tanto en sangre materna como en sangre del cordón umbilical mediante un ensayo multiplex. El análisis de citocinas en plasma materno reveló niveles significativamente elevados de IP-10 e IL-1 β en madres con infección reciente o en curso por SARS-CoV-2 en comparación con madres recuperadas, mientras que los niveles de IL-10, CXCL8 e IL-6 en el plasma materno fueron similares entre los dos grupos (Fig. [2a](#)). Al evaluar los niveles de citocinas neonatales, la IL-10 se elevó significativamente en el plasma del cordón de los recién nacidos de madres con infección reciente o en curso en comparación con los nacidos de madres recuperadas, donde no se pudo detectar IL-10. Los niveles de CXCL8 también fueron numéricamente más altos en el grupo de R / O (mediana, 93 pg ml⁻¹) en comparación

con el grupo recuperado (mediana, 28 pg ml⁻¹), aunque esto no alcanzó significación, debido en gran parte a tres recién nacidos con resultados indetectables niveles (Fig. 2b). Sin embargo, las concentraciones de esta quimiocina fueron significativamente más altas en los recién nacidos que en sus madres emparejadas en ambos grupos (Fig. 2c), que no se observó con ninguna de las otras citocinas probadas. Por el contrario, el IP-10 neonatal fue equivalente entre las madres y los recién nacidos en el grupo recuperado y, de hecho, fue significativamente más bajo en los recién nacidos que en sus madres emparejadas en el grupo R / O (Datos extendidos, Fig. 2a). La mayoría de los recién nacidos de madres recuperadas que mostraron niveles elevados de CXCL8 nacieron por parto vaginal (Fig. 2d), conocido por elevar varias citocinas 22. Sin embargo, todavía hubo aumentos notables, aunque insignificantes (P = 0,07, prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos colas no apareada), de CXCL8 en los recién nacidos nacidos por cesárea (CS) en el grupo R / O, en comparación con el grupo R, lo que sugiere esta fue posiblemente una respuesta neonatal a la infección materna por SARS-CoV-2.



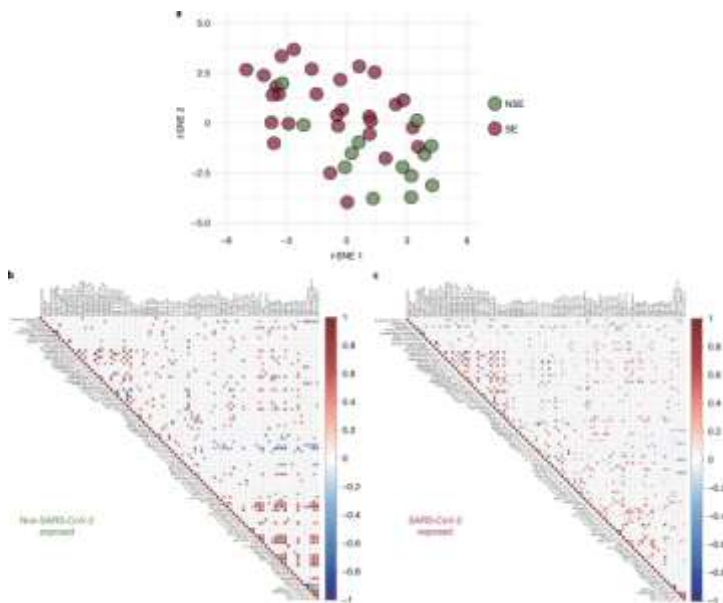
Niveles **a**, **b**, IP-10, IL-1 β , IL-10, CXCL8 e IL-6 en las madres (**a**) y sus recién nacidos (**b**) dentro del grupo R (madres: todas las citocinas, $n = 13$; recién nacidos: CXCL8 & IL-6, $n = 14$, IP-10, $n = 13$; IL-1 β , $n = 12$; IL-10, $n = 11$) y el grupo R / O (madres: IL-6, $n = 15$; IL-10 e IL-1 β , $n = 14$; CXCL8 e IP-10, $n = 13$; neonatos: IP-10, CXCL8, IL-10 e IL-6, $n = 16$; IL-1 β , $n = 15$) medido en plasma de sangre materna y sangre de cordón extraído en el momento del parto. **c**, Niveles de CXCL8 en plasma materno y neonatal emparejados dentro de los grupos R ($n = 13$) y R / O ($n = 14$). Cada línea une a un recién nacido y su madre emparejada. **d**, Niveles neonatales de CXCL8 en bebés nacidos por cesárea (izquierda, $n = 18$) o parto vaginal (VD; derecha, $n = 12$). Las líneas de puntos horizontales representan las concentraciones detectables mínima (y máxima, para IL-6). **e**, Matrices de correlación de Spearman de todas las correlaciones significativas ($P < 0.05$) de citocinas neonatales y maternas en los grupos R (izquierda, $n = 14$) y R / O (derecha, $n = 16$). **f - yo**, Gráficos de correlación de Spearman entre IP-10 neonatal y CXCL8 (**f**), IL-1 β materna y CXCL8 (**g**) neonatal, e IL-1 β materna e IP-10 (**h**) neonatal en el grupo R / O (**f**: $n = 15$, **g** y **h**: $n = 14$) y entre IL-1 β y día materna entre hisopo positivo materna en el grupo SE (**i**; $n = 27$). Los gráficos indican una línea de regresión lineal generalizada con intervalos de confianza del 95% sombreados. Los coeficientes de correlación asociados y los valores de P están en naranja (**f - h**) y rojo oscuro (**i**). En los diagramas de dispersión de citocinas (**un**, **b** y **d**), la línea central representa el valor de la mediana. P valores fueron evaluados mediante pruebas no apareadas Kolmogorov-Smirnov (**un**, **b** y **d**) y las pruebas de Wilcoxon emparejados (**c**). Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y todos los valores de P (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) no se ajustaron.

La prueba de rango de Spearman identificó correlaciones significativas en los niveles de citocinas tanto dentro como entre la sangre materna y del cordón en los grupos R y R / O, aunque esto fue mucho más evidente en el grupo R / O, lo que sugiere un mayor grado de coregulación inmune en infección reciente / en curso por SARS-CoV-2 (Fig. [2e](#)). Por ejemplo, dentro del grupo R / O, hubo correlaciones significativas entre CXCL8 neonatal e IP-10 (Fig. [2f](#)), y los niveles maternos de IL-1 β se correlacionaron con CXCL8 neonatal e IP-10 (Fig. [2g](#), [h](#)). Curiosamente, en todos los recién nacidos con EE, los niveles maternos de IL-1 β se correlacionaron negativamente ($R = -0,49$, $P = 0,016$, prueba de correlación de Spearman de dos colas) con los días entre un hisopo COVID positivo y el nacimiento (Fig. [2i](#)), lo que sugiere que esta citocina era indicativa de una infección reciente en las madres. No se observaron diferencias en la IL-12p70 plasmática, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón (IFN) - α 2, IFN- λ 1, IFN- λ 2 / 3, IFN- β , factor de necrosis tumoral (TNF) e IFN- γ en madres o recién nacidos de cualquier grupo (Datos extendidos, Fig. [2b](#)).

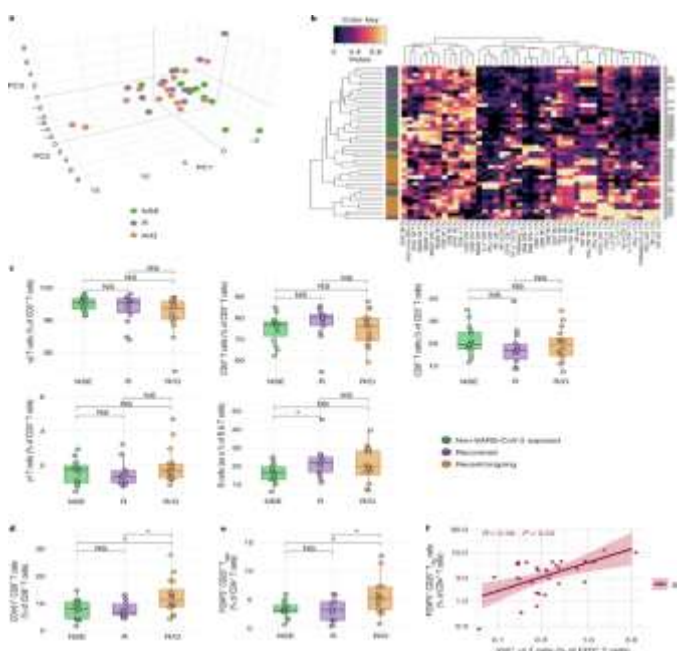
La infección materna reciente o en curso afecta a las células inmunitarias neonatales

Para investigar el impacto potencial de la infección materna SARS-CoV-2 en el compartimento inmune celular del neonato al nacer, se utilizó citometría de flujo multiparamétrica a los leucocitos de sangre de cordón fenotipo y evaluar su capacidad funcional in vitro después de la estimulación por mitógenos (Figs. [3](#) - [6](#)). Para establecer si la infección materna por SARS-CoV-2 alteraba el sistema inmunológico en desarrollo del recién nacido, se compararon los perfiles inmunitarios celulares en el grupo combinado (R y R / O) expuesto al SARS-CoV-2 (EE; $n = 30$) con los de recién nacidos a término nacidos de madres sanas recolectados antes de la pandemia (no expuestos al SARS-CoV-2 (NSE), $n = 15$) pero medidos simultáneamente. En 91 parámetros inmunes de citometría de flujo individuales se observó que los perfiles inmunes en el grupo SE se agrupaban lejos de los perfiles inmunes del grupo NSE. Las correlaciones significativas (evaluadas por las pruebas de correlación de Spearman de dos colas) entre los parámetros inmunes parecían diferentes en los recién nacidos de madres SE en comparación con las madres NSE (Fig. [3b, c](#)). Por ejemplo, la correlación significativa observada entre las células asesinas naturales (NK) productoras de IFN- γ y las células T CD8 $^+$ en el grupo NSE estuvo completamente ausente en el grupo SE, y apareció una correlación significativa entre las poblaciones efectoras importantes, CD4 $^+$ células RA-positivas de memoria efectora terminal (TEMRA) y células CD8 $_{TEMRA}$ en el grupo SE, donde no había habido tal correlación en el grupo NSE (Datos extendidos Fig. [4a, b](#)). De hecho, al centrarnos en los parámetros inmunitarios que generan las mayores diferencias, identificamos que los recién nacidos de madres en el grupo R / O se separaron más lejos del grupo NSE, utilizando un análisis tridimensional de componentes principales (3D PCA; Fig. [4a](#)), y que los tres grupos tendían a segregarse en función de su estado materno de SARS-CoV-2 en un análisis de agrupamiento jerárquico imparcial (Fig. [4b](#)). Además, no hubo un agrupamiento claro basado en factores de confusión alternativos como el sexo, la etnia, el modo de parto y otras características maternas como la corioamnionitis y la diabetes gestacional (Datos extendidos, Fig. [5](#)). A pesar de la observación de que los recién nacidos se segregaron en función del estado del SARS-CoV-2 de su madre, muchos parámetros, incluidos los que se sabe están alterados en la respuesta del adulto al SARS-CoV-2, no fueron significativamente diferentes entre ninguno de los grupos. No se observó linfopenia de células T y, además, las frecuencias relativas de los principales subconjuntos de linfocitos adaptativos en el recién nacido (por ejemplo, CD4 $^+$ y CD8 $^+$ células T $\alpha\beta$, linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos B) no se vieron afectados por la exposición materna al SARS-CoV-2 y fueron similares a los observados en el grupo NSE (Fig. [4c](#)). Si bien estas poblaciones de células inmunitarias neonatales no se vieron afectadas en su totalidad por la exposición

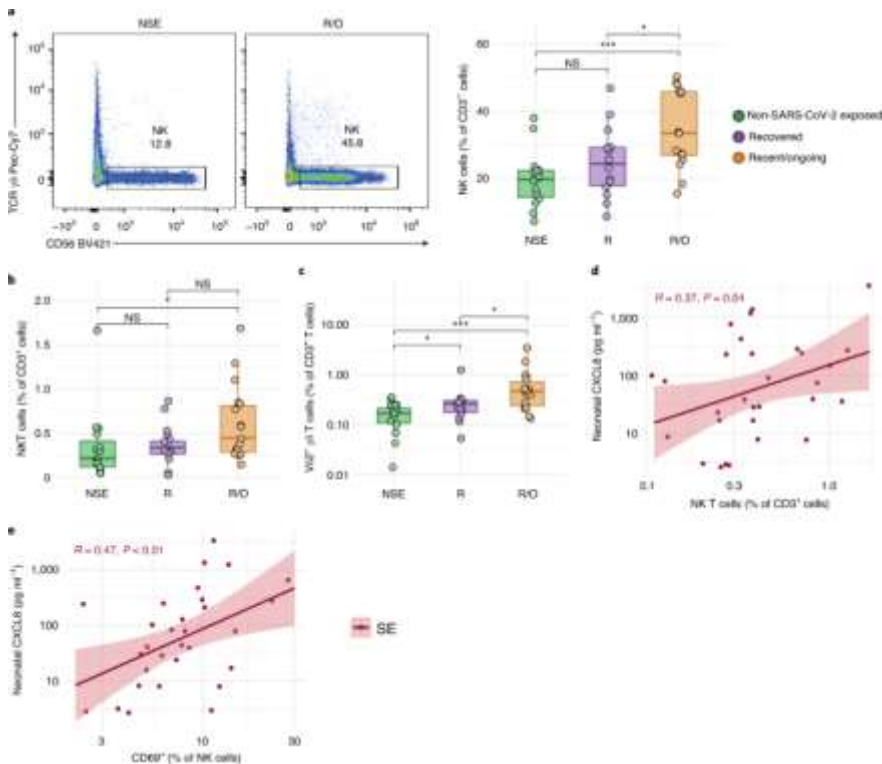
materna al SARS-CoV-2, aún eran evidentes cambios más específicos en las poblaciones de células adaptativas. Por tanto, aunque el porcentaje de células T CD8⁺ que expresan CD161 fue equivalente entre los grupos NSE y R, hubo un aumento significativo en esta población en los recién nacidos de madres con infección reciente o en curso (Fig. 4d). Además, el porcentaje de CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatorio (T_{reg}) las células aumentaron significativamente en los recién nacidos del grupo R / O en comparación con los grupos NSE y R (Fig. 4e). Al evaluar a todos los recién nacidos de madres expuestas al SARS-CoV-2, el porcentaje de células T_{reg} se correlacionó significativamente con el porcentaje de células T Vδ2⁺ (Fig. 4f).



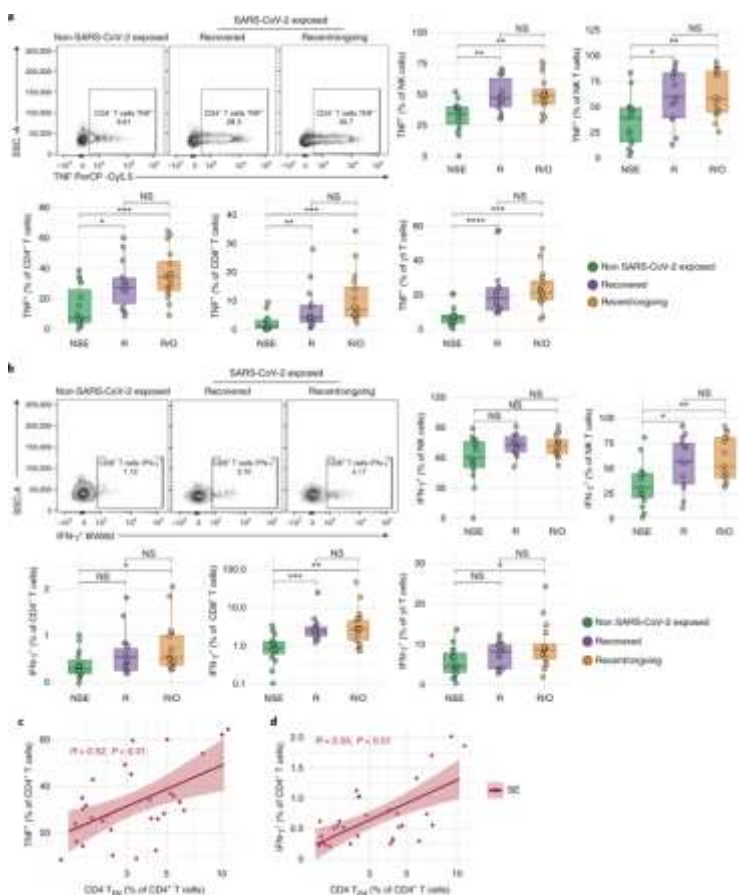
a, reducción de la dimensionalidad *t*-SNE de los perfiles inmunes neonatales medidos a partir de CBMC en recién nacidos de madres SE ($n = 28$) y madres NSE ($n = 13$). **b**, **c**, matriz de correlación de Spearman de correlaciones significativas ($P < 0.05$) de poblaciones celulares neonatales en los grupos NSE ($n = 14$; **b**) SE ($n = 30$; **c**). Las pruebas de correlación de Spearman fueron de dos caras y los valores de *P* no se ajustaron. Célula T_{EM}, célula T de memoria efectora; Célula T_{CM}, célula T de memoria central; T_Ncélula, célula T ingenua. MC, monocitos.



a, reducción de la dimensionalidad 3D PCA de los perfiles inmunes neonatales en los grupos neonatales R/O ($n = 15$), R ($n = 13$) y NSE ($n = 13$). PC1, PC2 y PC3 explican el 20,6%, el 11,8% y el 8,4% de la varianza, respectivamente. **b**, Mapa de calor del grupo dendrograma de 45 poblaciones inmunes por citometría de flujo en recién nacidos dentro de los grupos NSE ($n = 14$), R ($n = 14$) y R/O ($n = 15$). **c**, Diagramas de caja que muestran las proporciones de linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$ (NSE, $n = 15$; R, $n = 14$; R/O, $n = 16$) y la proporción de células B (NSE, $n = 14$; R, $n = 14$; R/O, $n = 16$). **d**, **e**, Diagramas de caja que muestran las proporciones de células T CD161⁺ CD8⁺ y células T reg FOXP3⁺ CD25⁺ (NSE, $n = 15$; R, $n = 14$; R/O, $n = 16$). **f**, Gráfico de correlación de Spearman en el grupo SE ($n = 30$) de proporciones neonatales de células FOXP3⁺ CD25⁺ T reg y V δ 2⁺ Células T $\gamma\delta$. Los datos indican una línea de regresión lineal generalizada con intervalos de confianza del 95% sombreados. Los coeficientes de correlación asociados y los valores P están en rojo oscuro. Todos los diagramas de caja siguen representaciones estándar de Tukey; la línea central indica la mediana, las líneas superior e inferior representan los percentiles 75 y 25, respectivamente, y los bigotes representan 1,5 veces los percentiles 75 y 25. Los valores de p se evaluaron mediante pruebas de suma de rangos de Wilcoxon no apareados (**c - e**). Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y todos los valores de P (* $P < 0,05$) no estaban ajustados.



a, Gráficos de citometría de flujo representativos del porcentaje de células CD56⁺ NK (de CD3⁺ células vivas) en un neonato con NSE y R/O, medidos a partir de CBMC, y los diagramas de caja para el total de neonatos (NSE, $n = 15$; R, $n = 14$; R/O, $n = 16$). **b**, **c**, Diagramas de caja que muestran las proporciones de células T NK y células T V δ 2⁺ $\gamma\delta$ (NSE, $n = 15$; R, $n = 14$; R/O, $n = 16$). **d**, **e**, gráficos de correlación de Spearman en el grupo SE ($n = 30$) entre CXCL8 neonatal y las proporciones de linfocitos T NK (**d**) o células NK CD69⁺ (**e**). Los gráficos indican una línea de regresión lineal generalizada con intervalos de confianza del 95% sombreados. Los coeficientes de correlación asociados y los valores P están en rojo oscuro. Todos los diagramas de caja siguen representaciones estándar de Tukey; la línea central indica la mediana, las líneas superior e inferior representan los percentiles 75 y 25, respectivamente, y los bigotes representan 1,5 veces los percentiles 75 y 25. Los valores de p se evaluaron mediante pruebas de suma de rangos de Wilcoxon no apareados (**a - c**). Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y todos los valores de P (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$) no se ajustaron.



a, **b**, Gráficos de citometría de flujo representativos del porcentaje de células T TNF⁺ CD4⁺ (**a**) y el porcentaje de células T IFN- γ ⁺ CD8⁺ (**b**) en un recién nacido NSE, R y R/O, medido a partir de CBMC. Diagramas de caja que muestran las proporciones de TNF⁺ (**a**) e IFN- γ ⁺ (**b**) linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos NK (NSE, $n = 15$; R, $n = 14$; R/O, $n = 16$), así como células T NK (NSE, $n = 15$; R, $n = 13$; R/O, $n = 15$), después de la estimulación policlonal (12-miristato 13-acetato de forbol (PMA; 10 ng ml⁻¹), ionomicina (1 μ g ml⁻¹), brefeldina A (20 ng ml⁻¹) y monensina solución (2 μ M) a 37 ° C durante 4 h). **c**, **d**, gráficos de correlación de Spearman entre linfocitos T EM CD4⁺ neonatales / linfocitos T TNF⁺ CD4⁺ (**c**), linfocitos T EM CD4⁺ / linfocitos T IFN- γ ⁺ CD4⁺ (**d**) en el grupo SE ($n = 30$). Los gráficos indican una línea de regresión lineal generalizada con intervalos de confianza del 95% sombreados. Los coeficientes de correlación asociados y los valores P están en rojo oscuro. Todos los diagramas de caja siguen representaciones estándar de Tukey; la línea central representa la mediana, las líneas superior e inferior representan los percentiles 75 y 25, respectivamente, y los bigotes representan 1,5 veces los percentiles 75 y 25. P valores fueron evaluados mediante pruebas de suma de rangos de Wilcoxon no apareados (**una** y **b**). Todas las pruebas fueron de dos caras y todos los valores de P (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) no se ajustaron.

Aumento de los porcentajes de células inmunitarias innatas en recién nacidos de madres con infección reciente o en curso

En contraste con el compartimento de células inmunes adaptativas relativamente no afectado, los cambios en los subconjuntos de células innatas fueron más prominentes después de la exposición materna al SARS-CoV-2. Las células NK, NK T y $\gamma\delta 2^+$ $\gamma\delta$ de tipo innato estaban todas significativamente elevadas en los recién nacidos de madres con infección reciente o en curso en comparación con el grupo NSE (Fig. 5a-c). Las células T NK y $\gamma\delta 2^+$ $\gamma\delta$ también se elevaron significativamente en los recién nacidos del grupo R/O en comparación con el grupo R. También hubo un cambio en las poblaciones de monocitos con porcentajes significativamente mejorados de monocitos alternativos y, posteriormente, monocitos clásicos CD38⁺ significativamente reducidos en recién nacidos de madres con infección reciente o en curso en comparación con el grupo NSE (Datos extendidos Fig. 6a). Estas células, en su mayor parte, no estaban significativamente elevadas en los recién nacidos de madres con exposición previa al SARS-CoV-2 (R) en comparación con las contrapartes NSE, de acuerdo con las respuestas neonatales reactivas a la infección por SARS-CoV-2 reciente o en curso. De

hecho, al observar a todos los recién nacidos de madres SE, los porcentajes elevados de células NK mostraron una correlación negativa ($R = -0,39$, $P = 0,04$, prueba de correlación de Spearman de dos colas) con los días de resultado positivo de la torunda de SARS-CoV-2 al nacimiento, lo que sugiere además que se trataba de una respuesta neonatal a la infección materna (Datos extendidos, Fig. [6b](#)). Curiosamente, dentro del grupo SE, hubo una correlación significativa entre los niveles de CXCL8 en sangre del cordón umbilical y el porcentaje de células T NK (Fig. [5d](#)) y las concentraciones de CXCL8 en sangre del cordón umbilical y activación de células NK (según lo evaluado por la expresión de CD69; Fig. [5e](#)) sugiriendo que estos son marcadores inmunes clave asociados con la respuesta neonatal a la infección materna.

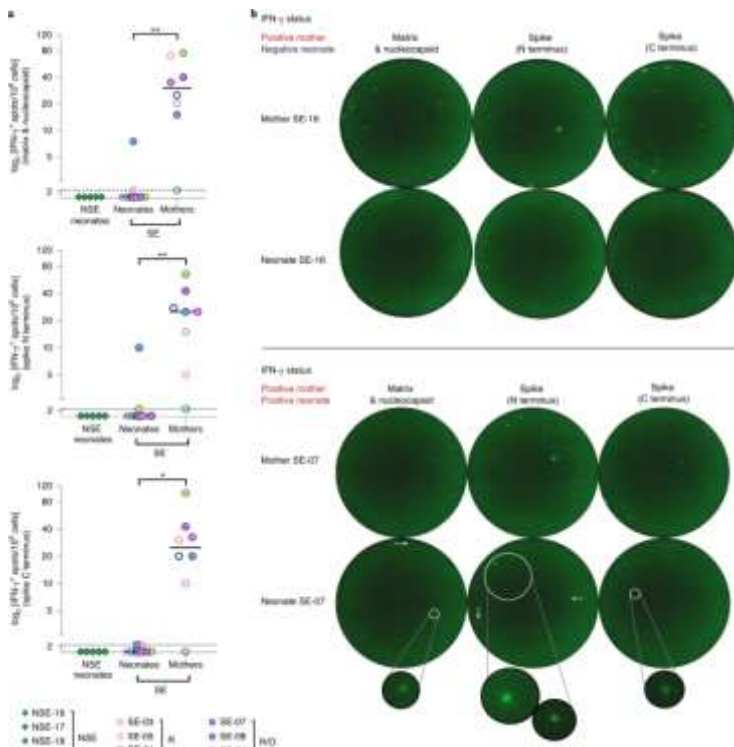
Mayor funcionalidad de las citocinas en recién nacidos de madres expuestas al SARS-CoV-2

Al evaluar la funcionalidad mediante tinción de citocinas intracelulares (ICS) después de la activación policlonal, la capacidad de las células inmunes para producir citocinas tras la estimulación se elevó significativamente en los recién nacidos de madres SE. De acuerdo con los cambios observados en las concentraciones plasmáticas de citocinas y la composición inmune celular, la producción mejorada de citocinas por las células inmunes neonatales se asoció con la infección materna por SARS-CoV-2. De hecho, el potencial de las citocinas se incrementó significativamente en varios tipos de células diferentes en los recién nacidos de madres previamente expuestas al SARS-CoV-2 (en cualquier momento). Así, los porcentajes de CD4⁺, CD8⁺ Las células T, $\gamma\delta$, NK y NK que producen TNF aumentaron significativamente en los recién nacidos en el grupo R / O en comparación con el grupo NSE, pero también aumentaron significativamente en todos estos tipos de células en el grupo R en comparación con las contrapartes NSE (Fig. [6a](#)). El porcentaje de células que expresan IFN- γ también aumentó significativamente en las células T CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ y NK del grupo R / O en comparación con el grupo NSE (Fig. [6b](#)), y porcentajes significativamente mayores de IFN- γ se observaron en células T que producen CD8⁺ y NK en el grupo R en comparación con el grupo NSE (Fig. [6b](#)). Las células que expresan IL-17 también aumentaron, aunque en menor medida, con aumentos significativos en CD4⁺ células que expresan IL-17 en el grupo R / O en comparación con el grupo NSE, y los porcentajes de células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 aumentaron significativamente en los grupos R / O y R en comparación con el grupo NSE (Datos extendidos [Fig.6c](#)). Los porcentajes de células T CD4⁺, CD8⁺ o $\gamma\delta$ que producen CXCL8 fueron equivalentes en todos los grupos (Datos extendidos, Fig. [6d](#)). La funcionalidad de citocina mejorada observada (TNF e IFN- γ) en células T CD4⁺ de recién nacidos de madres expuestas a SARS-CoV-2 se correlacionó significativamente con células T CD4⁺ de memoria efectora (Fig. [6c, d](#)). De hecho, la expresión de CD38, conocida por disminuir durante la maduración [11](#), se correlacionó negativamente con las células CD4⁺ y CD8⁺ productoras de TNF e IFN- γ en el grupo SE ($R = -0,45$ a $-0,59$, $P \leq 0,01$, pruebas de correlación de Spearman de dos colas; Datos extendidos Fig. [6e](#)). Debido al número limitado de madres con enfermedad grave, no pudimos establecer si la extensión de la impronta inmunitaria estaba relacionada con el estado de infección materna.

Respuestas de péptidos virales detectadas en madres expuestas al SARS-CoV-2, pero rara vez en recién nacidos

Para evaluar si el aumento de la funcionalidad de las citocinas observada en las células de los recién nacidos SE se debió a la presencia de células T específicas del SARS-CoV-2, estimulamos células mononucleares de sangre periférica o de cordón (PBMC) de recién nacidos y sus madres seropositivas ($n = 8$).), respectivamente, con péptidos específicos de SARS-CoV-2 y respuestas evaluadas mediante el ensayo IFN- γ FluoroSpot. Todas, excepto una, de las madres expuestas al SARS-CoV-2 tuvieron respuestas positivas contra todos los grupos de péptidos del

SARS-CoV-2 con una mediana combinada de la matriz y la nucleocápside, pico 1 (extremo N) y pico 2 (extremo C).) grupos de péptidos de 36 puntos de IFN- γ + por 10^6 células (rango, 15-100) en madres R / O ($n = 4$) y una mediana combinada de los tres grupos de péptidos de 15 IFN- γ + manchas por 10^6 células (rango, 1-70) en madres R ($n = 4$). Sin embargo, no se detectaron respuestas a ningún péptido del SARS-CoV-2 en los grupos neonatales R / O, R o NSE ($n = 5$) con la excepción de un recién nacido en el grupo R / O donde una respuesta débil de IFN- γ a Se observó un pico de SARS-CoV-2 (extremo N) y péptidos de matriz / nucleocápsida (Fig. 7).



a, manchas de IFN- γ + por 10^6 células detectadas por el ensayo FluoroSpot después de la estimulación de células mononucleares con matriz y nucleocápside, grupos de péptidos de punta N terminal y punta C terminal durante 24 ha 37°C en neonatos NSE ($n = 5$; diamantes), Madres SE y sus recién nacidos emparejados ($n = 8$ pares) agrupados según el estado materno-del SARS-CoV-2 (R / O, círculos rellenos; R, círculos abiertos). Los colores individuales se emparejan para mostrar las díadas madre-recién nacido. **b**, Imágenes representativas de FluoroSpot de IFN- γ (canal FITC) en una madre con respuestas positivas y su neonato emparejado con respuestas negativas (arriba) y en la díada madre-neonato donde ambos individuos tuvieron respuestas positivas. Las flechas blancas indican IFN- γ adicional⁺ manchas en el neonato que no se han agrandado. Las líneas de puntos horizontales representan el nivel de umbral de positividad. En los diagramas de dispersión, la línea central representa el valor mediano. Los valores de p se evaluaron mediante pruebas de Wilcoxon emparejadas entre madres SE emparejadas y sus recién nacidos (**a**). Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y todos los valores de P (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) no se ajustaron.

Discusión

Nuestro estudio investigó los perfiles inmunes de los recién nacidos de madres con exposición al SARS-CoV-2. Si bien no observamos IgM específica del SARS-CoV-2 en los recién nacidos y, por lo tanto, por definición, vimos una transmisión vertical limitada del SARS-CoV-2, sí encontramos múltiples perturbaciones inmunológicas dentro del neonato asociadas con el SARS-CoV-2 materno, exposición durante el embarazo, muchas de las cuales se asociaron con infecciones recientes o en curso. Tomados en conjunto, nuestros hallazgos sugieren un legado inmunológico impreso en el recién nacido después de la exposición materna al SARS-CoV-2, con posibles consecuencias de gran alcance.

Aunque no evaluamos directamente a los recién nacidos para detectar la presencia de SARS-CoV-2, sí evaluamos los niveles de IgM específicos del SARS-CoV-2, que fueron insignificantes en los 30 recién nacidos de madres expuestas al SARS-CoV-2, lo que no sugiere transmisión vertical. Sin embargo, se transfirió IgG específica de SARS-CoV-2 a los recién nacidos de sus madres, lo que sugiere la transferencia de inmunidad protectora. Hubo una correlación entre los niveles de IgG del SARS-CoV-2 materno y neonatal en las díadas madre-recién nacido en ambos grupos, como se sugirió previamente [23](#). Sin embargo, aunque para muchos patógenos, los títulos de IgG del cordón umbilical en el parto a término normal son más altos que los de la sangre materna [24](#)·[25](#), hubo niveles reducidos de IgG específica de SARS-CoV-2 en recién nacidos de madres con infección reciente o en curso en comparación con sus madres emparejadas. Esto no pareció ser un problema de umbral, ya que muchas madres exhibían niveles altos de IgG específica del SARS-CoV-2, que no se transfirió de manera eficiente a su recién nacido. Previamente se ha observado una reducción de la transferencia placentaria de inmunoglobulina específica del SARS-CoV-2 [26](#), posiblemente debido a la alteración de la glicosilación [27](#). Además, también se observaron títulos reducidos de anticuerpos maternos específicos del SARS-CoV-2 y alteración de la transferencia de anticuerpos placentarios en embarazos con un feto masculino [28](#), aunque no pareció haber ningún sesgo sexual en nuestro conjunto de datos. Actualmente, no está claro si los anticuerpos inducidos mediante vacunación, a diferencia de la infección natural, difieren en términos de su estado de glicosilación y la posterior transferencia placentaria, que es un área importante de investigación. La vacunación contra el SARS-CoV-2 en el segundo y tercer trimestre provocó la transferencia placentaria de anticuerpos, con una tasa de transferencia reducida observada en el último trimestre [29](#). Nuestro estudio agrega evidencia adicional que sugiere que el segundo trimestre puede representar un momento de vacunación más oportuno, al menos con respecto a la transferencia de inmunidad pasiva al recién nacido.

Se reconoce cada vez más que la exposición en el útero a factores ambientales, la infección y / o la inflamación materna afectan el sistema inmunológico en desarrollo y las respuestas subsiguientes tanto a la infección [30](#), a las enfermedades inmunomediadas [31](#) como a los problemas del neurodesarrollo [32](#). De hecho, los efectos a largo plazo no pueden descartarse como se observó en los sobrevivientes después de la exposición en el útero a la pandemia de influenza de 1918 (española) [33](#). Quizás como era de esperar, el plasma del cordón umbilical de los recién nacidos de madres con una infección reciente o en curso, expresó concentraciones elevadas de algunas citocinas que se sabe que están asociadas con la inflamación y COVID-19, de acuerdo con la activación inmunitaria placentaria [19](#). Los niveles elevados de IP-10, IL-6, IL-10, CXCL8 e IL-1 β se han asociado con la infección del adulto [20](#)·[21](#), con un aumento de IL-6 e IL-10 también asociado con la gravedad de la infección por SARS-CoV-2 en niños [34](#). Curiosamente, esta firma convencional de COVID-19 se inclinó más hacia IL-10 (y en menor medida, CXCL8) en los recién nacidos de madres con infección reciente o en curso. De hecho, se observó un aumento de IL-10 en el grupo R / O, lo que sugiere un posible desequilibrio entre las citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias. En teoría, el aumento de las concentraciones de citocinas en el recién nacido podría explicarse por la transferencia de citocinas maternas a través de los tejidos placentarios. De hecho, los recién nacidos con concentraciones elevadas de IP-10 nacieron de madres que tenían elevadas mediciones de IP-10 en plasma, aunque en general las concentraciones fueron significativamente más bajas en los recién nacidos en comparación con las madres. Sin embargo, en el caso del plasma del cordón umbilical CXCL8, una quimiocina que se correlacionó fuertemente con la IL-1 β materna (previamente asociada con la infección materna por SARS-CoV-2 [35](#)), los niveles fueron significativamente más altos que los observados en sus madres, lo que sugiere que al menos algunas de estas citocinas elevadas se derivaron neonatalmente y fueron una respuesta directa a la infección materna. Se han observado anteriormente citocinas elevadas en el

plasma del cordón, incluida la CXCL8, en algunos recién nacidos de madres positivas al SARS-CoV-2 [17](#) . De manera similar, se ha observado un aumento de CXCL8 en el plasma del cordón después de la exposición in utero a una infección [36](#)·[37](#), lo que sugiere que la infección materna puede influir directamente en el CXCL8 fetal. Los marcadores inflamatorios neonatales elevados parecen estar relacionados con el estado de infección materna en el momento del nacimiento, ya que dichos perfiles son menos obvios en los recién nacidos de madres con la infección recuperada. De hecho, donde vimos ligeras elevaciones en CXCL8 en el grupo recuperado, esto podría explicarse por el modo de parto, ya que se sabe que el trabajo de parto impulsa la elevación de estas citocinas [22](#) .

A diferencia de la infección por COVID-19 en adultos, en los que se han observado reducciones en las células NK periféricas, NK T, Vδ2⁺ y T invariantes asociadas a la mucosa [20](#)·[38](#)·[39](#) , los recién nacidos de madres expuestas al SARS-CoV-2 en realidad mostraron niveles elevados porcentajes de linfocitos T NK, NK T y Vδ2⁺ γδ y también linfocitos T CD8⁺ que expresan CD161 (la mayoría de los cuales es probable que sean linfocitos T invariantes asociados a la mucosa). Estas células de tipo innato pueden estar respondiendo al medio de citocinas inflamatorias en el contexto de la infección materna, potencialmente como una respuesta protectora en el recién nacido frente a su probable papel beneficioso en el COVID-19 adulto grave (ref. [38](#)). La activación inmunitaria de estas células se ha observado en la interfaz materno-fetal [19](#) , y aunque un informe anterior sugirió que no hubo elevación de las células NK en los recién nacidos de madres con COVID-19 (ref. [16](#)), esto solo se comparó con lo informado niveles de referencia y no hubo un grupo de comparación directo en su estudio.

Además de las alteraciones en estas poblaciones de células, también identificamos un mayor potencial de citocinas tras la estimulación in vitro. Esto se observó no solo en los recién nacidos de madres con infección reciente o en curso, sino también en los nacidos de madres recuperadas, lo que sugiere una posible preparación in utero de la respuesta inmunitaria. No está claro si los perfiles inmunitarios identificados serían similares en los recién nacidos directamente infectados con SARS-CoV-2 después del nacimiento y esto no se pudo evaluar en nuestro estudio. Los porcentajes de CD4⁺ , CD8⁺ , Las células T NK, NK T o γδ que produjeron TNF (o IFN-γ e IL-17 en menor grado) fueron significativamente mayores en los recién nacidos de madres que estuvieron expuestas al SARS-CoV-2. Al nacer, las células T neonatales producen predominantemente CXCL8 con una capacidad limitada para la producción de IFN-γ e IL-17, que aumenta con los [40](#) años . Por lo tanto, estos hallazgos pueden reflejar cierta maduración acelerada del sistema inmunológico neonatal inducida en el útero por la infección materna por SARS-CoV-2. Gran parte de esta funcionalidad mejorada de las citocinas se correlacionó con otros marcadores de maduración inmune, como porcentajes aumentados de células T de memoria y disminución de la expresión de células T de CD38. La expresión de IFN-γ está controlada por mecanismos epigenéticos en recién nacidos [41](#), por lo que es tentador especular que la infección materna por SARS-CoV-2 puede haber inducido algunos cambios epigenéticos en estos loci. De hecho, la exposición materna a los hidrocarburos aromáticos policíclicos alteró directamente este locus en las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical (CBMC) [42](#) , y otros datos sugieren que las modificaciones epigenéticas durante la gestación pueden moldear el desarrollo futuro de enfermedades como la obesidad, la diabetes tipo 2, las alergias, el asma y las infecciones. [43](#) . También se han observado proporciones aumentadas de células T productoras de citocinas después de la exposición in utero a la infección [44](#)·[45](#) . Se sabe que ciertos antígenos atraviesan la placenta, y se ha observado el cebado fetal del sistema inmunológico en respuesta a las bacterias detectadas en los órganos fetales [46](#). Nuestra observación de que no hubo reactividad específica a los péptidos del SARS-CoV-2 en la mayoría de los recién nacidos con SE evaluados (a pesar de la positividad materna) sugiere que la capacidad de respuesta mejorada de las citocinas

detectada se debe a la exposición indirecta a la inflamación / citocinas que preparan la respuesta inmune durante el desarrollo fetal. Sin embargo, se detectaron células reactivas al SARS-CoV-2 en un recién nacido. Esto puede corroborar que la transmisión vertical, aunque infrecuente, puede ocurrir. De hecho, la viremia se asocia con la gravedad [47](#), y este recién nacido expresó los niveles plasmáticos más altos de CXCL8, IL-6 e IL-10 de cualquiera de los recién nacidos y nació de una madre piréxica con desprendimiento de placenta, lo que puede haber ayudado a cualquier transmisión viral. De la misma manera, la posible reactividad a virus sin transmisión directa obvia también ha sido sugerida por la reducción en la diversidad de receptores de células T observada en recién nacidos no infectados expuestos al VIH [12](#).

Tomados en conjunto, estos datos sugieren fuertemente que la infección materna por SARS-CoV-2 configura el perfil inmunológico de los recién nacidos en diferentes grados, dependiendo del tiempo de exposición, y que esto puede estar asociado con y sin transmisión vertical del SARS-CoV-2. Identificamos una respuesta transitoria a la inflamación materna en forma de aumento de citocinas en el plasma del cordón, pero también alteración de la funcionalidad de las células inmunes en los recién nacidos expuestos al SARS-CoV-2 en cualquier momento durante la gestación, lo que sugiere cierta impronta inmunitaria. Si bien la etiología de las perturbaciones inmunitarias observadas en el recién nacido sigue sin estar clara, las consecuencias podrían ser de gran alcance.[48](#).

El seguimiento a largo plazo de los recién nacidos en nuestro estudio establecería si la exposición materna al SARS-CoV-2 tiene un impacto duradero en el niño. Estos datos también pueden tener implicaciones con respecto al régimen de vacunación para mujeres embarazadas. De hecho, la reducción de la transferencia de anticuerpos protectores al recién nacido que observamos en los nacidos de madres con una infección reciente puede sugerir que es preferible la vacunación en el segundo trimestre o principios del tercer trimestre.

Métodos

Diseño de estudios y material humano

Este estudio cumple con todas las normas éticas y fue aprobado por el comité de ética en investigación (REC) correspondiente, como se describe a continuación. Se recolectó sangre del cordón umbilical (y sangre periférica materna emparejada) durante la pandemia de COVID-19 (28 de mayo de 2020-1 de marzo de 2021) en el momento del nacimiento de recién nacidos de madres que estuvieron expuestas al SARS-CoV-2 (SE) que asistieron la unidad de maternidad en Guy's and St Thomas 'NHS Foundation Trust (GSTT), Londres, en tubos de sangre heparinizados en el momento del nacimiento para investigar el estado inmunológico (aprobación de REC n. ° 19 / SC / 0232, Infectious Diseases Bio-Bank — Guys & St Thomas's Hospital, South Central, Hampshire B REC). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes antes del ingreso al estudio. Las díadas madre-recién nacido se clasificaron en grupos recientes o en curso (R / O) y recuperados (R), según el número de días antes del nacimiento que la madre recibió un estado positivo de un hisopo nasofaríngeo SARS-CoV-2 (R / O, <14 d; R, > 14 d). Se utilizaron muestras de plasma SE materno y neonatal para las pruebas de anticuerpos y citocinas. Se utilizaron muestras de células neonatales en experimentos de citometría de flujo para medir poblaciones de células neonatales y algunas ($n = 8$) se utilizaron en experimentos de prueba de células reactivas al SARS-CoV-2 junto con sus muestras de células madre emparejadas ($n = 8$). También se extrajo sangre del cordón umbilical en el momento del nacimiento de recién nacidos de madres sanas en GSTT antes de la pandemia de COVID-19 (hasta el 1 de enero de 2020), por lo que sus madres no se infectaron con SARS-CoV-2 en ningún momento durante su embarazo. , denominado grupo no

expuesto al SARS-CoV-2 (NSE) (aprobación REC nº 17 / LO / 0641, London-Camberwell St. Giles REC). Las muestras de NSE se utilizaron como grupo de control para la citometría de flujo. Se utilizó un grupo adicional de muestras de NSE ($n = 5$) como grupo de control para los experimentos de prueba de células reactivas al SARS-CoV-2. Los detalles clínicos de los grupos se pueden encontrar en la Tabla [1](#).

Aislamiento de células mononucleares de sangre de cordón y plasma

Se aislaron CBMC de todos los grupos de recién nacidos. También se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ocho madres SE para su uso en ensayos FluoroSpot específicos de SARS-CoV-2. También se aisló plasma puro de los recién nacidos SE y sus madres emparejadas. Más específicamente, para las muestras de sangre periférica materna pareadas, la sangre completa se centrifugó a 2.000 *g* durante 10 min a temperatura ambiente, y el plasma se recogió de la capa superior y se almacenó a -80 ° C en tubos de polipropileno. Para las muestras neonatales, la sangre del cordón se colocó en capas sobre Ficoll (GE Healthcare), dentro de un tubo cónico de polipropileno de 15 ml, y se centrifugó a 800 *g* durante 15 min (descanso) a temperatura ambiente. A continuación, se recogió el plasma de la fracción superior y se almacenó a -80 ° C en tubos de polipropileno. La capa de CBMC se aisló y posteriormente se lavó dos veces con medio base precalentado (RPMI-1640 + L -glutamina, Gibco), y luego medio completo (CM; RPMI-1640 + 330 L -glutamina; FBS inactivado por calor al 10%; Penicilina-estreptomomicina al 1%, Gibco), bajo centrifugación a 300 *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Para el aislamiento materno de PBMC, la sangre se diluyó con la mitad del volumen en PBS y se colocó en capas sobre tubos Leucosep (Greiner) que contenían 15 ml de Ficoll. Luego, la capa de PBMC se aisló y se lavó dos veces con PBS bajo centrifugación a 300 *g* durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, los sedimentos celulares se congelaron en Cryostor CS10 (Sigma) dentro de crioviales de polipropileno antes **de proceder con la citometría de flujo.**

Estimulación policlonal

Antes de teñir las CBMC para la inmunofenotipificación por citometría de flujo con el panel 4 (Tabla complementaria [1](#)), las células se descongelaron y se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Corning) dentro de 200 μ l de CM que contenían PMA (10 ng ml^{-1} ; Sigma), ionomicina (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Sigma), brefeldina A (20 ng ml^{-1} ; Sigma) y solución de monensina (1 \times ; BioLegend). También se sembró en placa un control de solo brefeldina A y solo de monensina para cada recién nacido. Las células se incubaron a 37 ° C durante 4 h en el laboratorio de contención de nivel de bioseguridad 3 (BSL-3), de acuerdo con las reglas de seguridad del King's College London antes de proceder con la tinción por citometría de flujo. Las células se retiraron de BSL-3 una vez que se fijaron con Cell Fix (1 \times ; BD) durante un mínimo de 10 min.

Adquisición y tinción de citometría de flujo

Las CBMC se descongelaron y se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos antes de teñirlas en uno de los cuatro paneles (Tabla complementaria [1](#)) que evalúan las siguientes poblaciones de células inmunitarias (panel 1, estado de memoria / sin experiencia de células T; panel 2, células mieloides y B; panel 3, estado de activación de células T y NK; panel 4, potencial de citocinas T y NK). Los cuatro paneles contenían tinción de marcador de superficie, y los paneles 1 y 4 también contenían tinción intracelular. Todos los siguientes pasos de lavado se realizaron por debajo de 2000 *g*, durante 1 min a temperatura ambiente. Para cada panel, las células se lavaron con 100 μ l de PBS de Dulbecco (1 \times ; Gibco) y se resuspendieron en 100 μ l de PBS, que contenía el colorante de viabilidad fijable Zombie NIR (dilución 1: 1000;

BioLegend), con la adición de TCR V δ 1-FITC (TS8 .2; Thermo Fisher) en el panel 1, durante 15 min en la oscuridad a 4 ° C. A continuación, las células se lavaron con 150 μ l de tampón de fijación / permeabilización FOXP3 de eBioscience (Invitrogen), para el panel 1, o tampón FACS (PBS, FBS inactivado por calor al 0,5%, EDTA 2 mM, Invitrogen), para los paneles 2-4. La etapa de lavado se repitió con un volumen de 200 μ l. Luego, las células se resuspendieron en 100 μ l de tampón de permeabilización eBioscience FOXP3 (FPB; Invitrogen), para el panel 1, o 50 μ l de cóctel de anticuerpos de superficie dentro del tampón FACS, para los paneles 2 a 4, durante 30 minutos (paneles 2 a 3) o 20 minutos (panel 4), a 4 ° C en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron en 100 μ l de FPB (panel 1) o 150 μ l de tampón FACS (paneles 2-4) y nuevamente con 200 μ l de volumen antes de resuspender en 50 μ l de cóctel de anticuerpos en FPB (panel 1) o 100 μ l de Cell Fix (1 \times ; paneles 2-4) durante 30 min (paneles 1-3) o hasta ICS (panel 4) a 4 ° C en la oscuridad. Los paneles 1-3 se lavaron luego dos veces en 100 μ l de FPB (panel 1) o tampón FACS (paneles 2-3) y se resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS hasta la adquisición. Para el panel 4 ICS, las células se centrifugaron a 2000 Los paneles 1-3 se lavaron luego dos veces en 100 μ l de FPB (panel 1) o tampón FACS (paneles 2-3) y se resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS hasta la adquisición. Para el panel 4 ICS, las células se centrifugaron a 2000 Los paneles 1-3 se lavaron luego dos veces en 100 μ l de FPB (panel 1) o tampón FACS (paneles 2-3) y se resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS hasta la adquisición. Para el panel 4 ICS, las células se centrifugaron a 2000g , durante 1 min a temperatura ambiente, y se resuspendió en 50 l de cóctel de anticuerpos ICS en tampón de lavado de permeabilización (1 \times ; PWB; BioLegend) durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en 150 μ l de PWB, seguido de 200 μ l de tampón FACS antes de resuspender las células en tampón FACS para su adquisición en un muestreador de alto rendimiento en un LSR Fortessa (BD) de cuatro láser usando FACSDiva (v8, BD), a una caudal de 1 μ l s⁻¹ .

Análisis de datos de citometría de flujo

Los archivos RAW FCS se analizaron mediante FlowJo (v10.6.2, BD), y las estrategias de activación periódica se incluyen en la ampliación de los datos Fig. 3 . Como control interno, se analizó la misma muestra adulta junto con cada experimento de citometría de flujo para mantener la consistencia y ayudar a establecer las puertas. Los datos se limpiaron mediante la activación del parámetro Tiempo para garantizar que solo se analizaran las células que pasaban por una corriente de flujo constante, y las poblaciones de células se excluían del análisis posterior si el recuento de eventos en la población original era <30.

Prueba de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2

Los ensayos ELISA se realizaron como se describió anteriormente [18](#)·[49](#) . Todas las muestras de plasma se inactivaron por calor a 56 ° C durante 30 minutos antes de su uso. Se recubrieron placas ELISA de alta unión (Corning, 3690) con antígeno (proteína nuclear (N), glicoproteína de pico (S) o RBD a 3 μ g ml⁻¹ (25 μ l por pocillo) en PBS, ya sea durante la noche a 4 ° C o durante 2 ha 37 ° C. Los pocillos se lavaron con PBS-T (PBS con 0,05% Tween-20) y luego se bloquearon con 100 μ l de leche al 5% en PBS-T durante 1 ha temperatura ambiente. Los pocillos se vaciaron y Se agregaron diluciones seriadas de plasma (comenzando a 1:25, dilución quintuple) y se incubaron durante 2 ha temperatura ambiente. Los reactivos de control incluyeron CR3009 (2 μ g ml⁻¹ ; anticuerpo monoclonal N-específico), CR3022 (0,2 μ g ml⁻¹; Anticuerpo monoclonal específico S), plasma de control negativo (dilución 1:25), plasma de control positivo (dilución 1:50) y pocillos en blanco. Los pocillos se lavaron con PBS-T. Se añadió el anticuerpo secundario y se incubó durante 1 ha temperatura ambiente. Se detectó IgG usando Fc-AP antihumano de cabra (dilución 1: 1.000; Jackson, 109-055-098) y los pocillos se lavaron con PBS-T. Se añadió sustrato AP (Sigma) y se leyeron las placas a 405 nm. La IgM se detectó usando IgM-HRP antihumana de cabra (dilución 1: 1.000; Sigma, A6907) y los pocillos se

lavaron con PBS-T. Se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina en un solo paso (Thermo Fisher Scientific) y se inactivó con 2 M H_2SO_4 antes de leer a 450 nm (HRP). Las muestras se analizaron por duplicado y se representaron gráficamente los valores máximos de cambio de pliegues por encima del fondo para cada paciente. Se calcularon las relaciones de transferencia de IgG para mostrar la diferencia en los niveles de neonato y materno emparejados (cambio de multiplicación de pico de IgG neonatal sobre el fondo / cambio de veces de pico de IgG materna sobre el fondo).

Cuantificación de citocinas plasmáticas

El plasma materno y neonatal emparejados se descongelaron y se probaron en el kit del panel de respuesta antiviral humano LegendPlex de 13 plexos (BioLegend), para cuantificar los niveles de IL-1 β , IL-6, TNF, IP-10, CXCL8, IL-12p70, IFN- α 2, IFN- λ 1, IFN- λ 2 / 3, GM-CSF, IFN- β , IL-10 e IFN- γ . El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se modificó diluyendo los reactivos del kit 2 veces (perlas, anticuerpos de detección y estreptavidina-PE). Todas las muestras de plasma se diluyeron 2 veces con tampón de ensayo y las concentraciones de muestra resultantes se calcularon de acuerdo con el factor de dilución. En resumen, se agregaron 25 μ l de plasma diluido o estándar y perlas mezcladas (proporción 1: 1) a cada pocillo (en placas de 96 pocillos con fondo en V) y se incubaron durante 1,5 h. Las muestras se lavaron dos veces con tampón de lavado, se incubó con 25 μ l de anticuerpos de detección durante 1 hora y luego se añadieron 25 μ l de estreptavidina-PE durante 30 minutos más. A continuación, las muestras se lavaron una vez con tampón de lavado, se resuspendieron en 200 μ l de tampón de lavado y se adquirieron en un muestreador de alto rendimiento con un FACSCanto (BD) de tres láseres. Todos los pasos de incubación se realizaron a 600 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Los datos se limpiaron excluyendo citocinas si el recuento de eventos de perlas era <90, para garantizar análisis precisos, realizados con el software Windows LegendPlex (v8.0, BioLegend). en un agitador orbital a temperatura ambiente y protegido de la luz. Los datos se limpiaron excluyendo citocinas si el recuento de eventos de perlas era <90, para garantizar análisis precisos, realizados con el software Windows LegendPlex (v8.0, BioLegend). en un agitador orbital a temperatura ambiente y protegido de la luz. Los datos se limpiaron excluyendo citocinas si el recuento de eventos de perlas era <90, para garantizar análisis precisos, realizados con el software Windows LegendPlex (v8.0, BioLegend).

Detección de células positivas para IFN- γ + SARS-CoV-2 mediante el ensayo FluoroSpot

Se descongelaron y estimularon CBMC y PBMC criopreservados de recién nacidos SE y sus madres peladas, respectivamente, con grupos de péptidos de SARS-CoV-2 para probar las células positivas para IFN- γ + en los ensayos FluoroSpot (Mabtech), adaptado de Monin et al. [50](#). Específicamente, las células se estimularon con grupos de péptidos que abarcan la matriz de SARS-CoV-2 y la nucleocápside (M&N; Miltenyi), el dominio N-terminal de la proteína espiga del SARS-CoV-2 (S1; JPT Peptide Technologies) o el dominio C-terminal de la proteína de pico SARS-CoV-2 (S2; JPT Peptide Technologies). También se probaron CBMC de recién nacidos con ENE. Todos los reactivos FluoroSpot eran de Mabtech a menos que se especifique lo contrario y se usen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se recubrieron placas de membrana de PVDF de 96 pocillos con anticuerpo de captura monoclonal anti-IFN- γ (1-D1K, FSX-01A-1; 15 μ g ml⁻¹) a 4 ° C. Las placas se lavaron 4 veces con 200 μ l de PBS frío y se bloquearon con 200 μ l de medio durante 1 h (RPMI-GlutaMAX (Gibco), penicilina al 2%, estreptomycin y anfotericina B (Gibco) y suero AB humano al 10% (Sigma). , las células se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se sembraron en placas a 1 x 10⁵ o 2 x 10⁵ células por pocillo en la placa recubierta a 100 μ l de volumen final de medio que contiene M&N (dilución 1: 200), S1 (dilución 1: 2000) o S2 (dilución 1: 2000)

durante 14 h a 37 ° C en condiciones duplicadas. Se usó dimetilsulfóxido como control negativo, y cada muestra individual se sembró en placas con el mismo número de células por condición. La incubación se realizó en el laboratorio de contención BSL-3, de acuerdo con las reglas de seguridad del King's College London antes de fijar y leer las placas. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces con 200 µl de PBS antes de agregar 100 µl de anticuerpo de detección monoclonal anti-IFN-γ BAM (7-B6-1-BAM, FSX-01A-1; dilución 1: 200) en PBS-0.1% BSA durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Las placas se lavaron como antes, y se añadieron 100 µl de anti-BAM-490 (FSX-01A-1; dilución 1: 200) en PBS-BSA al 0,1% durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se repitió el paso de lavado y se añadieron 50 µl de potenciador de fluorescencia durante 10 minutos en la oscuridad antes de retirar el líquido y la bandeja de plástico y secar las placas durante la noche. A continuación, se añadió un total de 100 µl de paraformaldehído al 2% (Alfa Aesar) en PBS durante 30 min. Después de la fijación, las placas se secaron y el número de IFN-γ⁺ Manchas por 10⁶ células se detectó y se analizaron utilizando un lector de AID iSpot Spectrum y software ELISPOT (v8.0 Autoimmun Diagnostika). Un nivel umbral de positividad se fijó en > 1 IFN-γ⁺ Células por pocillos (equivalente a 2,5 células secretoras de citocinas por cada 10⁶ células).

Análisis estadístico

Las poblaciones de citometría de flujo analizadas, las citocinas plasmáticas y los anticuerpos se importaron a una hoja de cálculo de Excel y se analizaron en R (v4.0.3) para generar diagramas de caja, diagramas de reducción de dimensionalidad, diagramas de correlación de Spearman y mapas de calor. Los mapas de calor agrupados se realizaron sobre datos escalados y centrados utilizando la función `heatmap.2` (paquete `gplots`) y se agruparon de acuerdo con el método euclidiano. El paquete `corrplot` se utilizó para generar matrices de correlación de Spearman, y solo se muestran los valores significativos ($P < 0,05$). GraphPad Prism (v9.0) también se utilizó para generar gráficos de dispersión para citocinas y el mapa de calor de anticuerpos. Todas las pruebas estadísticas se utilizaron para medir las diferencias entre muestras biológicamente distintas. Valores de P no ajustados ($* P < 0,05$; $** P < 0,01$; $*** P < 0,001$; $**** P < 0,0001$) se evaluaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (para comparar las concentraciones de citocinas entre los grupos), las pruebas de suma de rangos de Wilcoxon de dos lados (para poblaciones de células inmunitarias entre los grupos) y las pruebas de Wilcoxon emparejadas de dos lados (entre niveles pareados de anticuerpos / citocinas maternos y neonatales).

Resumen de informes

Más información sobre el diseño de la investigación está disponible en el [Resumen de informes de investigación de la naturaleza](#) vinculado a este artículo.

Disponibilidad de datos

Los archivos FCS sin procesar generados durante este estudio se han depositado en FlowRepository con el código de acceso FR-FCM-Z46A. [Los datos originales](#) se proporcionan con este documento.

Disponibilidad de código

El código se generó utilizando los paquetes R (v4.0.3) disponibles públicamente: `ggplot2`, `gplots`, `dplyr`, `dynutils`, `tidyr`, `viridis`, `ggrepel`, `ggfortify`, `Hmisc`, `Rtsne` y `corrplot`.

Referencias

1. Sutton, D., Fuchs, K., D'Alton, M. & Goffman, D. Prueba de detección universal del SARS-CoV-2 en mujeres admitidas para el parto. *N. Engl. J. Med.* **382** , 2163–2164 (2020).
 2. Allotey, J. et al. Manifestaciones clínicas, factores de riesgo y resultados maternos y perinatales de la enfermedad por coronavirus 2019 en el embarazo: revisión sistemática viva y metanálisis. *BMJ* **370** , m3320 (2020).
 3. Kadiwar, S. et al. ¿Las mujeres embarazadas fueron más afectadas por COVID-19 en la segunda ola de la pandemia? *Lancet* **397** , 1539-1540 (2021).
 4. Martinez-Perez, O. et al. La asociación entre la infección por SARS-CoV-2 y el parto prematuro: un estudio prospectivo con un análisis multivariable. *BMC Pregnancy Childbirth* **21** , 273 (2021).
 5. Gale, C. y col. Características y resultados de la infección neonatal por SARS-CoV-2 en el Reino Unido: un estudio de cohorte nacional prospectivo que utiliza vigilancia activa. *Lancet Child Adolesc. Health* **5** , 113–121 (2021).
 6. Salvatore, CM y col. Manejo neonatal y resultados durante la pandemia de COVID-19: un estudio de cohorte de observación. *Lancet Child Adolesc. Health* **4** , 721–727 (2020).
 7. Vivanti, AJ et al. Transmisión transplacentaria de la infección por SARS-CoV-2. *Nat. Comun.* **11** , 3572 (2020).
 8. Fenizia, C. et al. Análisis de la transmisión vertical del SARS-CoV-2 durante el embarazo. *Nat. Comun.* **11** , 5128 (2020).
 9. Dong, L. y col. Posible transmisión vertical del SARS-CoV-2 de una madre infectada a su recién nacido. *JAMA* **323** , 1846–1848 (2020).
 10. Chen, G. y col. Respuesta inmune al COVID-19 durante el embarazo. *Parte delantera. Immunol.* **12** , 675476 (2021).
 11. Kamdar, S. y col. La inflamación perinatal influye pero no detiene el rápido desarrollo inmunológico en los bebés prematuros. *Nat. Comun.* **11** , 1284 (2020).
 12. Gabriel, B. y col. Análisis del repertorio de TCR en lactantes expuestos al VIH pero no infectados. *Sci. Rep.* **9** , 11954 (2019).
 13. Babik, JM, Cohan, D., Monto, A., Hartigan-O'Connor, DJ & McCune, JM La respuesta inmune fetal humana a la exposición al virus de la hepatitis C en el útero. *J. Infect. Dis.* **203** , 196–206 (2011).
 14. Gómez de Agüero, M. et al. La microbiota materna impulsa el desarrollo inmunológico innato postnatal temprano. *Science* **351** , 1296–1302 (2016).
-

15. Torow, N. & Hornef, MW La ventana de oportunidad neonatal: preparando el escenario para la interacción huésped-microbiano de por vida y la homeostasis inmunológica. *J. Immunol.* **198** , 557–563 (2017).
16. Liu, P. y col. El estado inmunológico de los recién nacidos de madres infectadas con SARS-CoV-2 en Wuhan, China. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146** , 101–109 (2020).
17. García-Flores, V. et al. Respuestas inmunitarias materno-fetales en mujeres embarazadas infectadas con SARS-CoV-2. Preimpresión en <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-362886/v1> (2021).
18. Pickering, S. et al. La evaluación comparativa de múltiples tecnologías serológicas COVID-19 respalda la evaluación continua de los ensayos de flujo lateral en el punto de atención en entornos de atención médica hospitalaria y comunitaria. *PLoS Pathog.* **16** , e1008817 (2020).
19. Lu-Culligan, A. et al. La infección respiratoria materna por SARS-CoV-2 durante el embarazo se asocia con una fuerte respuesta inflamatoria en la interfaz materno-fetal. *Med (NY)* **2** , 591–610 (2021).
20. Laing, AG y col. Una firma inmune dinámica de COVID-19 incluye asociaciones con mal pronóstico. *Nat. Medicina.* **26** , 1623–1635 (2020).
21. Arunachalam, PS y col. Sistemas de evaluación biológica de la inmunidad a la infección por COVID-19 leve frente a la grave en humanos. *Science* **369** , 1210–1220 (2020).
22. Tornblom, SA y col. Expresión de ARNm y localización de bNOS, eNOS e iNOS en el cuello uterino humano en el parto prematuro y a término. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3** , 33 (2005).
23. Flannery, DD y col. Evaluación de los anticuerpos contra el SARS-CoV-2 de la sangre del cordón umbilical materno y neonatal y las proporciones de transferencia placentaria. *JAMA Pediatr.* **175** , 594–600 (2021).
24. Martinez, DR y col. Las características de Fc median la transferencia placentaria selectiva de IgG en mujeres infectadas por el VIH. *Cell* **178** , 190-201 (2019).
25. Goncalves, G. et al. Transferencia transplacentaria de sarampión e IgG total. *Epidemiol. Infectar.* **122** , 273-279 (1999).
26. Edlow, AG y col. Evaluación de la carga viral del SARS-CoV-2 materno y neonatal, la transferencia de anticuerpos transplacentarios y la patología placentaria en embarazos durante la pandemia de COVID-19. *JAMA Netw. Abierto* **3** , e2030455 (2020).
27. Atyeo, C. et al. Transferencia de anticuerpos placentarios específicos del SARS-CoV-2 comprometida. *Cell* **184** , 628–642 (2021).
28. Bordt, EA y col. Respuestas placentarias sexualmente dimórficas a la infección materna por SARS-CoV-2. Preimpresión en <https://doi.org/10.1101/2021.03.29.437516> (2021).
29. Beharier, O. et al. Transferencia eficiente de la madre al recién nacido de anticuerpos contra la vacuna COVID-19 de ARNm del SARS-CoV-2 y BNT162b2. *J. Clin. Invertir.* **131** , e150319 (2021).

30. Gleditsch, DD y col. La inflamación materna modula los patrones de respuesta inmune del lactante al desafío pulmonar viral en un modelo murino. *Pediatr. Res.* **76** , 33–40 (2014).
31. Apostol, AC, Jensen, KDC y Beaudin, AE Entrenamiento del sistema inmunológico fetal a través de la inflamación materna: una hipótesis de higiene en capas. *Parte delantera. Immunol.* **11** , 123 (2020).
32. Bilbo, SD & Schwarz, JM Programación de la vida temprana del cerebro y el comportamiento de la vida posterior: un papel fundamental para el sistema inmunológico. *Parte delantera. Behav. Neurosci.* **3** , 14 (2009).

[PubMed](#) [PubMed Central](#) [Artículo CAS](#) [Google Académico](#)

33. Acquah, JK, Dahal, R. & Sloan, FA pandemia de influenza 1918: exposición en el útero en los Estados Unidos e impacto a largo plazo en las hospitalizaciones. *Soy. J. Public Health* **107** , 1477–1483 (2017).
34. Lu, W. y col. Respuestas inmunes tempranas y factores pronósticos en niños con COVID-19: un análisis retrospectivo de un solo centro. *BMC Pediatr.* **21** , 181 (2021).
35. Sherer, ML y col. El embarazo altera la expresión de interleucina-1 beta y las respuestas de anticuerpos antivirales durante la infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo. *Soy. J. Obstet. Gynecol.* **225** , 301.e1–301.e14 (2021).
36. Lohman-Payne, B. y col. Lactantes no infectados expuestos al VIH: la interleucina 8 (IL-8) de la sangre del cordón umbilical elevada se asocia significativamente con la infección materna por el VIH y la IL-8 sistémica en una cohorte de Kenia. *Clin. Transl. Med* **7** , 26 (2018).
37. Reuschel, E. et al. La exposición perinatal a bacterias grampositivas provoca distintas respuestas de citocinas in vitro. *En t. J. Mol. Sci.* **22** , 332 (2020).
38. Jouan, Y. et al. Alteración fenotípica y funcional de células T no convencionales en pacientes con COVID-19 grave. *J. Exp. Medicina.* **217** , e20200872 (2020).
39. Kuri-Cervantes, L. et al. Mapeo completo de perturbaciones inmunes asociadas con COVID-19 severo. *Sci. Immunol.* **5** , eabd7114 (2020).
40. Gibbons, D. et al. La producción de interleucina-8 (CXCL8) es una función efectora signataria de las células T de los recién nacidos humanos. *Nat. Medicina.* **20** , 1206–1210 (2014).
41. White, GP, Watt, PM, Holt, BJ & Holt, PG Los patrones diferenciales de metilación del promotor de IFN- γ en los sitios CpG y no CpG subyacen a las diferencias en la expresión del gen de IFN- γ entre las células T CD45RO⁺ neonatales y adultas humanas. *J. Immunol.* **168** , 2820-2827 (2002).

42. Tang, WY y col. Exposición materna a hidrocarburos aromáticos policíclicos y metilación 5'-CpG de interferón- γ en glóbulos blancos del cordón. *Reinar. Perspectiva de salud*. **120** , 1195-1200 (2012).
43. van Esch, B. et al. El impacto de la leche y sus componentes en la programación epigenética de la función inmunológica en la vida temprana y más allá: implicaciones para la alergia y el asma. *Front Immunol*. **11** , 2141 (2020).
44. Hong, M. y col. Inmunidad entrenada en recién nacidos de madres infectadas por el VHB. *Nat. Comun*. **6** , 6588 (2015).
45. García-Knight, MA y col. Respuestas de células T de memoria alteradas a la vacunación con Bacillus Calmette-Guerin y toxoide tetánico y respuestas de citocinas alteradas a la estimulación policlonal en bebés kenianos no infectados expuestos al VIH. *PLoS ONE* **10** , e0143043 (2015).
46. Mishra, A. et al. La exposición microbiana durante el desarrollo humano temprano prepara las células inmunes fetales. *Cell* **184** , 3394-3409 (2021).
47. Fajnzylber, J. et al. La carga viral del SARS-CoV-2 se asocia con una mayor gravedad y mortalidad de la enfermedad. *Nat. Comun*. **11** , 5493 (2020).
48. Kappanayil, M. et al. Síndrome inflamatorio multisistémico en un recién nacido, asociado temporalmente con la exposición prenatal al SARS-CoV-2: reporte de un caso. *Lancet Child Adolesc. Health* **5** , 304-308 (2021).
49. Seow, J. y col. Observación longitudinal y disminución de las respuestas de anticuerpos neutralizantes en los tres meses posteriores a la infección por SARS-CoV-2 en humanos. *Nat. Microbiol*. **5** , 1598–1607 (2020).
50. Monin, L. et al. Seguridad e inmunogenicidad de una versus dos dosis de la vacuna COVID-19 BNT162b2 para pacientes con cáncer: análisis intermedio de un estudio observacional prospectivo. *Lancet Oncol*. **22** , 765–778 (2021).

Traducción: Dr Hernan Jamui (drhernanjamui@gmail.com)