



ENFERMEDADES CRÓNICAS Y MULTIPARIDAD AFECTAN LOS TÍTULOS NEUTRALIZANTES ANTI-SARS-COV-2 GENERADOS EN LECHE MATERNA POR LA PRIMOVACUNACION CON ABDALA

Maylin Pérez-Bernal¹; Carlos Hernández¹; Rafael Ibargollín¹; Midalis Martínez²; Migdiala Soria²; Magali Delgado¹; Enrique Pérez¹; José M. Sánchez-Ríos¹

1. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Circunvalante Norte, Olivos III, Sancti Spiritus, Cuba.
2. Servicio de Neonatología. Hospital General “Camilo Cienfuegos”, Bartolomé Masó 128, Sancti Spiritus, Cuba.

EMAIL: maylin.perez@cigb.edu.cu

CORRESPONDENCIA: MSc. Maylin Pérez-Bernal. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Circunvalante Norte, Olivos III, Sancti Spiritus, Cuba.

RESUMEN

Este trabajo analizó la influencia de las enfermedades crónicas, la edad y la paridad, de púerperas inmunizadas el esquema primario de la vacuna Abdala, sobre los títulos de anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 en la leche materna que neutralizan la interacción RBD-ACE2. Se realizó un estudio observacional analítico unicéntrico con muestras de leche materna de 104 púerperas, organizadas en dos grupos: 5 y 9 semanas después de la



primovacunación con Abdala. Los títulos de anticuerpos anti-RBD IgA e IgG se determinaron mediante ELISA indirecto. La inhibición de la interacción RBD-ACE2 se evaluó con un ensayo subrogado de neutralización. Los títulos neutralizantes obtenidos de esta prueba se correlacionaron con la paridad y la edad de las participantes y con la presencia de enfermedades crónicas. La IgA anti-RBD predominó sobre el isotipo IgG hasta 9 semanas después de la primovacunación. Los anticuerpos anti-RBD inhibieron la interacción RBD-ACE2, de manera estable de 5 a 9 semanas post-vacunación. Los títulos de anticuerpos neutralizantes no correlacionaron con la edad de las participantes, pero disminuyeron en las multíparas y en aquellas con al menos una enfermedad crónica no transmisible. Este trabajo refiere, por primera vez, el efecto decreciente de las enfermedades crónicas y la multiparidad sobre los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2, generados en leche materna por una vacuna anti-COVID-19.

PALABRAS CLAVE: vacuna Abdala; leche materna; anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2; enfermedad crónica no transmisible; paridad.



CHRONIC DISEASES AND MULTIPARITY AFFECT THE NEUTRALIZING TITERS ANTI-SARS-COV-2 GENERATED IN BREAST MILK BY PRIMOVACINATION WITH ABDALA

ABSTRACT

This work analyzed the influence of chronic diseases, age and parity of puerperal women, immunized with primary schedule of COVID-19 Abdala vaccine, on the SARS-CoV-2 RBD antibody titers that neutralize the RBD-ACE2 interaction. A single-center analytical observational study was conducted with breast milk samples from 104 puerperal women, organized into two groups: 5 and 9 weeks after Abdala primary schedule. IgA and IgG anti-RBD antibody titers were determined by indirect ELISA. A surrogate virus neutralization test evaluated the inhibition of the RBD-ACE2 interaction. The neutralizing antibody titers were correlated with the age and the parity of participants, and were related with the presence of chronic diseases. IgA anti-RBD antibodies predominated over IgG isotype until the ninth week after Abdala primary schedule. Anti-RBD antibodies inhibited the RBD-ACE2 interaction, in a stable manner from 5 to 9 weeks post-vaccination. The neutralizing antibody titers did not correlate with the age of participants, but diminished in multiparous and in those with at least one noncommunicable chronic disease. This is the first report of the decreasing effect of chronic diseases and multiparity on the anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody titers, generated in breast milk by a COVID-19 vaccine.



KEYWORDS: Abdala vaccine; breast milk; SARS-CoV-2 neutralizing antibodies; noncommunicable chronic diseases; parity.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las vacunas anti-SARS-CoV-2 comenzó tan pronto se publicó el genoma del virus en enero de 2020. Varios candidatos vacunales entraron en ensayos clínicos y se aprobaron para uso de emergencia en menos de 10 meses desde el inicio de la pandemia de COVID-19, un resultado sin precedentes en la Vacunología (1). Se utilizaron diferentes plataformas tecnológicas para desarrollar inmunógenos seguros y eficaces, como las vacunas convencionales de virus completo, de vectores virales y de proteínas recombinantes (2), así como las de

ARNm, nunca antes usadas para vacunas humanas autorizadas (3).

En Cuba, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología desarrolló la vacuna de subunidad proteica Abdala, que generó altos niveles séricos de anticuerpos IgG que reconocen el dominio de unión al receptor (RBD) y neutralizan el SARS-CoV-2. Abdala demostró su eficacia en la prevención de la COVID-19 sintomática en las poblaciones adulta (4) y pediátrica (5). Esta vacuna se basa en el RBD recombinante, con una secuencia que comprende los residuos N331-K529 de la



proteína de pico de la cepa Wuhan-Hu-1 del SARS-CoV-2 (NCBI Acc. No. YP_009724390), expresada en *Pichia pastoris*. El correcto plegamiento de la secuencia se confirmó mediante ensayos de resonancia de plasmón de superficie (6), que demostraron su capacidad de unión al receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), con una afinidad similar a la descrita para esta interacción (7). Es un requisito necesario para generar anticuerpos neutralizantes que bloqueen la entrada del SARS-CoV-2 a la célula, inhibiendo la interacción RBD-ACE2.

Abdala se presenta en forma de suspensión, con 50 µg de antígeno adyuvado con hidróxido de aluminio. Su esquema primario es de tres dosis de 0,5

mL cada una, con intervalos de 14 días (4). Dicho esquema genera en leche materna una respuesta inmune específica contra el RBD-Wuhan-Hu-1, con actividad neutralizante de la interacción RBD-ACE2 similar a la generada por la infección por COVID-19 (8). También se ha descrito que la presencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y la multiparidad en las madres vacunadas con Abdala reducen los niveles de anticuerpos anti-RBD en la leche materna (9), pero no se conoce si la actividad neutralizante de los anticuerpos puede ser afectada por estas u otras características de la madre lactante.

El objetivo de este trabajo fue estimar, mediante titulación, los niveles de anticuerpos IgA e IgG anti-RBD del



SARS-CoV-2 en la leche materna de puérperas inmunizadas con el esquema primario de Abdala, y analizar la influencia de las ECNT, la edad y la paridad de las puérperas, sobre los títulos neutralizantes de estos anticuerpos, evaluados mediante un ensayo subrogado de neutralización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Participantes del estudio

Se realizó un estudio observacional analítico unicéntrico con muestras independientes de leche materna colectadas de puérperas vacunadas con Abdala, organizadas en dos grupos: 5 y 9 semanas después del esquema primario. Todas estuvieron ingresadas en el Servicio de Neonatología del Hospital General de Sancti Spíritus, Cuba, entre el

30 de septiembre y el 26 de noviembre de 2021. El estudio se aprobó por el acuerdo 144/2021 del Comité de Ética del referido hospital.

Las características de las participantes se recopilaron mediante cuestionario. La distribución por grupos asumió los siguientes criterios de inclusión:

Grupo I: Puérperas que estuvieran en la quinta semana después de la tercera dosis de Abdala, y refirieran no haberse infectado con SARS-CoV-2.

Grupo II: Puérperas que estuvieran en la novena semana después de la tercera dosis de Abdala, y refirieran no haberse infectado con SARS-CoV-2.



Control negativo: Puérperas no vacunadas, que refirieran no haberse infectado con SARS-CoV-2.

Colecta y procesamiento de las muestras de leche materna

La leche materna se extrajo manualmente hacia recipientes estériles, desechando las primeras 4-5 gotas. Las muestras colectadas se centrifugaron a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se separó de la capa grasa con una micropipeta con punta amarilla y se conservó en alícuotas de 50 µL a -20°C.

Titulación de anticuerpos IgA e IgG anti-RBD

Se recubrieron placas de 96 pocillos de poliestireno de alta unión Costar® 3590 con 100 µl/pocillo de 10 µg/ml del RBD-

Wuhan-Hu-1 recombinante, expresado en *Pichia pastoris* (CIGB Habana, Cuba), diluido en 0,05 M de tampón carbonato-bicarbonato de sodio; pH 9,8. Las placas se incubaron 2 h a 37 °C y luego se lavaron tres veces con 0,1 % de Tween-20 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El bloqueo se realizó con 370 µl/pocillo de PBS con albúmina sérica bovina (3%), 1 h a 37°C, con un lavado posterior. Con las muestras de leche materna se hicieron curvas de titulación. Para ello se diluyeron en serie ocho veces, de 1:100 a 1:12800 con 2 como factor de dilución, usando PBS con albúmina sérica bovina al 1% (tampón DB). Cada curva de titulación se colocó por duplicado en la placa. Del control negativo, diluido 1:100, se pusieron 4 réplicas. DB fue el blanco del ensayo. Las



placas estuvieron 1 h a 37°C y luego se lavaron 3 veces. Los anticuerpos anti-RBD IgA e IgG se detectaron con IgA e IgG antihumanas conjugadas a peroxidasa de rábano picante, respectivamente, diluidas 1:4000 con DB y se incubaron en las placas 1 h a 37°C. Después de 3 lavados, se reveló el anticuerpo unido utilizando 0,6 mg/ml de ortofenilendiamina en tampón citrato (pH 5,0) con peróxido de hidrógeno al 0,015 %, 20 minutos en la oscuridad a (22–25) °C. El ácido sulfúrico 2,66 M detuvo la reacción. La absorbancia a 492 nm (A492 nm) se midió en un lector de placas (Labsystems Multiskan Plus, Finlandia).

Los títulos de IgA e IgG anti-RBD se calcularon interpolando el valor duplicado del promedio A492nm del control negativo en las curvas de

titulación de cada muestra (10), ajustadas por una regresión logística de cinco parámetros.

Ensayo subrogado de neutralización

Las placas Costar® 3590 se recubrieron con 100 µl/pocillo de la proteína recombinante hFc-ACE2 expresada en HEK293T (Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba), a 5 µg/ml en PBS, 3 h a 37°C. Después de un lavado, las placas se bloquearon como se describió en 2.3. Las muestras de leche materna y el control negativo, en 8 diluciones seriadas con DB, de 1:4 a 1:65536 con 4 como factor de dilución, se pre-incubaron (v/v) en tubos eppendorf® con el RBD-Wuhan-Hu-1 conjugado a peroxidasa de rábano picante, diluido 1:16000 con DB, 1 h a 37°C. El



conjugado, pre-incubado solo con DB, se utilizó como control positivo de la reacción RBD-ACE2. Las reacciones pre-incubadas se añadieron, 100 µl/pocillo, a las placas recubiertas con hFc-ACE2 y bloqueadas, y se dejaron 1 h a 37 °C. Luego, las placas se lavaron 4 veces y se mantuvieron 20 min en la oscuridad a (22–25) °C con 100 µl/pocillo de 0,6 mg/ml de ortofenilendiamina en tampón fosfato-citrato (fosfato 0,2 M, citrato 0,1 M, pH 5,0) y peróxido de hidrógeno al 0,006%. El ácido sulfúrico 2,66 M detuvo la reacción y se leyó la A492 nm.

El punto de corte (PC) del ensayo fue el valor de A492nm por debajo del cual las muestras se consideraron inhibidoras de la reacción RBD-ACE2. Se calculó mediante la ecuación:

$$PC = m(A492nm) - t(0,99; 7 \text{ gL}; \text{una cola}) \times DE$$

Donde: m (A492nm): media de ocho valores de A492nm del control positivo; gL: grados de libertad; DE: desviación estándar

Los títulos de anticuerpos neutralizantes (TNat) de las muestras se determinaron interpolando el PC en la curva de titulación de cada muestra. Las curvas se ajustaron mediante una regresión logística de 5 parámetros.

Evaluación de la relación de los TNat con tres características de las participantes del estudio

Las tres características relacionadas con los TNat fueron la edad, la paridad al



inicio de la vacunación y la presencia o no de ECNT.

Se usó una prueba de correlación de los TNat con las correspondientes edades de las puérperas de cada grupo.

Para correlacionar los TNat y la paridad, los grupos I y II se organizaron en tres subgrupos cada uno: nulíparas (paridad=0), primíparas (paridad=1) y multíparas (paridad ≥ 2).

La relación de los TNat y la presencia o no de ECNT en las participantes se evaluó, luego de organizar los grupos I y II en dos subgrupos cada uno: puérperas con al menos una ECNT y puérperas sin ECNT. No se hizo prueba de correlación, sino que se determinó por subgrupo el número de muestras con TNat y su

posición en los siguientes rangos: $\text{TNat} \geq 65536$; $50000 \leq \text{TNat} < 65536$; $20000 \leq \text{TNat} < 50000$; $10000 \leq \text{TNat} < 20000$; $\text{TNat} < 10000$.

Análisis estadístico

Las curvas de titulación se ajustaron con el GraphPad Prism, versión 8.0.2 para Windows. El análisis estadístico utilizó el programa SPSS, versión 15.1. Los títulos de anticuerpos se normalizaron mediante transformación logarítmica. La prueba t de muestras independientes comparó los títulos IgA e IgG anti-RBD en los grupos I y II. Se usó la prueba de Spearman para las correlaciones. La fuerza de la correlación se definió según la guía: $0,00 \leq |r| \leq 0,30$, débil; $0,30 \leq |r| \leq 0,70$, moderado; $0,70 \leq |r| \leq 1,00$, fuerte (11).



La significancia estadística se fijó en $p \leq 0,05$ para las pruebas aplicadas.

RESULTADOS

Un total de 147 puérperas aceptaron participar en el estudio, pero se excluyeron 43 de ellas: 27 por haber estado enfermas de COVID-19 y 16 por no estar dentro de los tiempos post-vacunación definidos para el análisis. Finalmente se seleccionaron 104 participantes, 52 por cada grupo. Seis

muestras de puérperas no vacunadas con Abdala, y que refirieron no haberse infectado con SARS-CoV-2, se utilizaron como control negativo en los ensayos. Las incluidas tenían edades comprendidas entre 15 y 41 años. La mayoría eran nulíparas al inicio de la vacunación. Menos del 20% en cada grupo tenían al menos una ECNT, y la hipertensión arterial y el asma fueron las más frecuentes (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las puérperas incluidas en el estudio

Características	Grupo I (n=52)	Grupo II (n=52)
Edad, mediana (RIC), años	25 (22-30)	26,5 (20,5-32,5)
Condición de salud		
Sin ECNT, %	82,69	80,77
Con ECNT, %	17,31	19,23
ECNT detectadas, n		
Hipertensión arterial	4	4
Asma	3	2
Epilepsia	1	1
Hipotiroidismo	0	2
Diabetes mellitus tipo 1	0	0
Cardiopatía	1	0
Nefropatía	0	1
Paridad al inicio de la vacunación		
Nulíparas, %	44,23	42,31
Primíparas, %	36,54	36,54
Múltiparas, %	19,23	21,15

Grupo I: Puérperas vacunadas con tres dosis de Abdala durante el embarazo, que estaban en la quinta semana después de la

tercera dosis, y refirieron no haberse infectado con SARS-CoV-2.

Grupo II: Puérperas vacunadas con tres dosis de Abdala durante el embarazo, que



estaban en la novena semana después de la tercera dosis, y refirieron no haberse infectado con SARS-CoV-2.

Abreviaturas: RIC, rango intercuartílico; ECNT, enfermedad crónica no transmisible

Los promedios de los títulos de anticuerpos IgA anti-RBD fueron mayores que los de IgG en los dos momentos post-vacunación, pero el comportamiento de los títulos de cada isotipo en el tiempo tuvo tendencias contrarias: los títulos de IgA anti-RBD disminuyeron significativamente entre la quinta y la novena semana después del esquema primario de Abdala, mientras

que los IgG anti-RBD aumentaron notablemente en ese período de tiempo (Figura 1).

En las muestras del grupo I, el promedio de los títulos de anticuerpos IgA anti-RBD fue 8787, asumiendo una escala lineal, mientras que en las del grupo II ese valor se redujo hasta más allá de la mitad, 3987. Por el contrario, los títulos de IgG anti-RBD en las muestras de leche colectadas en la novena semana fueron mayores, unas tres veces como promedio, con respecto a las muestras de la semana cinco.

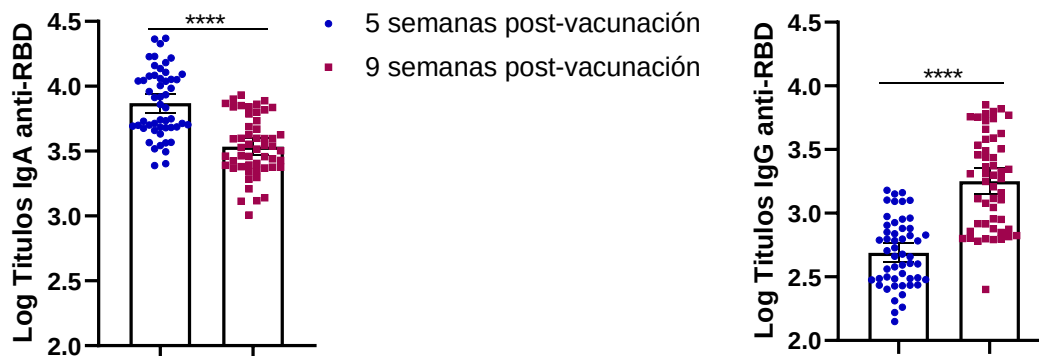


Figura 1. Títulos de anticuerpos IgA e IgG anti-RBD-Wuhan-Hu-1 del SARS-CoV-2 en leche materna, colectada de puérperas que recibieron la vacuna anti-COVID-19 Abdala, 5 y 9 semanas después de la tercera dosis. La prueba t para muestras independientes se usó para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre los títulos de anticuerpos en escala logarítmica. Los datos son presentados como la media y el intervalo de confianza (95%); los asteriscos representan a $p < 0.000$.

La primovacunación con Abdala generó títulos de anticuerpos anti-RBD con potencial neutralizante del SARS-CoV-2 en la mayoría de las muestras de leche materna colectadas. Se encontraron anticuerpos que inhibieron la interacción RBD-ACE2 en el 84,62% y el 80,77% de las muestras de leche de los grupos I y II, respectivamente. Los promedios de los

TNat no difirieron entre los dos grupos ($p=0,798$) (Figura 2). Los TNat inferiores a 10 000 representaron el 9,61% y el 5,77% del total de muestras con anticuerpos inhibidores de la interacción RBD-ACE2 en los grupos I y II, respectivamente. Cerca de la quinta parte de las muestras de cada grupo tenían TNat cercanos o iguales a 65536, el factor

de dilución más alto aplicado en este ensayo. Estas fueron las muestras con mayores niveles de anticuerpos

potencialmente neutralizantes del SARS-CoV-2.

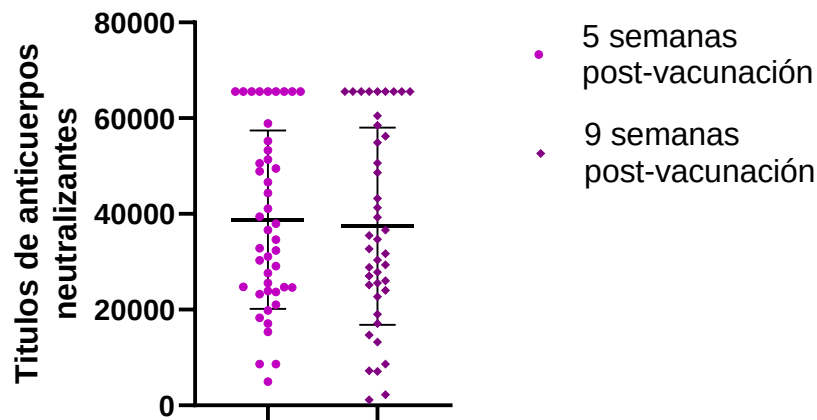


Figura 2. Títulos de anticuerpos anti-RBD-Wuhan-Hu-1 neutralizantes del SARS-CoV-2 detectados en muestras de leche materna mediante un ensayo subrogado de neutralización. Las muestras se colectaron de puérperas vacunadas con el esquema primario de Abdala, 5 y 9 semanas después de la tercera dosis. Los datos se presentan como la media y la desviación estándar de los títulos de anticuerpos neutralizantes

La prueba de correlación de Spearman indicó que la paridad al inicio de la vacunación correlaciona significativa y moderadamente con los TNat (Tabla 2). Se consideró que no correlacionaron los

TNat y la edad de las puérperas participantes, al comprobarse la correlación débil y no significativa entre ambas variables (Tabla 2).

Tabla 2. Correlaciones entre la edad y la paridad al inicio de la vacunación con los títulos de anticuerpos anti-RBD-Wuhan-Hu-1 neutralizantes en leche materna colectada de puérperas vacunadas con el esquema primario de Abdala.

Correlaciones	Grupo I		Grupo II	
	Rho (Spearman)	<i>p</i>	Rho (Spearman)	<i>p</i>
Edad - TNat	-0,190	0,218	0,126	0,416
Paridad - TNat	-0,529	0,000	-0,581	0,000

Grupos I y II: muestras de leche colectadas 5 y 9 semanas después de la tercera dosis de Abdala, respectivamente. TNat: títulos de anticuerpos neutralizantes

La Tabla 3 muestra las tendencias en la respuesta de anticuerpos neutralizantes, cuando las muestras de leche materna se agruparon según la presencia o ausencia de ECNT en las donantes. Casi el 98% de

las muestras colectadas de participantes sin ECNT inhibieron la interacción RBD-ACE2. Los TNat más altos, por encima de 50 000, se encontraron en aproximadamente el 34% de ellas en los dos momentos post-vacunación analizados. Sin embargo, se detectaron anticuerpos neutralizantes solamente en el 22% y el 10% de las muestras de leche de las donantes con al menos una ECNT, colectadas 5 y 9 semanas después de la

vacunación, respectivamente, y todas ellas estaban en el rango más bajo de títulos inhibidores de la interacción RBD-ACE2 (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las muestras de leche materna con títulos de anticuerpos anti-RBD neutralizantes (TNat), acorde a la ausencia o presencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) en las puérperas donantes, vacunadas con el esquema primario de Abdala.

Muestras analizadas	Grupo I		Grupo II	
	52		52	
	Sin ECNT	Con ECNT	Sin ECNT	Con ECNT
Distribuidas acorde a la ausencia o presencia de ECNT	43	9	42	10
Muestras con TNat	44		42	
	Sin ECNT	Con ECNT	Sin ECNT	Con ECNT
Distribuidas acorde a la ausencia o presencia de ECNT	42	2	41	1
Distribuidas en rangos de TNat				
TNat $\geq 65\ 536$	9	0	9	0
$50\ 000 \leq \text{TNat} < 65\ 536$	6	0	5	0
$20\ 000 \leq \text{TNat} < 50\ 000$	22	0	19	0
$10\ 000 \leq \text{TNat} < 20\ 000$	4	0	4	0
TNat $< 10\ 000$	1	2	4	1

Las muestras de leche materna se colectaron 5 (Grupo I) y 9 (Grupo II) semanas después de la tercera dosis de Abdala.



DISCUSIÓN

Este trabajo ha estimado, mediante titulación, los niveles de anticuerpos IgA e IgG anti-RBD, presentes en muestras de leche materna colectadas de puérperas que recibieron el esquema primario de Abdala, una vacuna anti-SARS-CoV-2 de subunidad proteica.

La prevalencia de la respuesta IgA sobre la IgG hasta 9 semanas después de administrado el esquema, contrasta con la mayoría de los estudios citados por Dimitroglou et al. (12), que refieren la superioridad de la respuesta IgG en la leche humana desde las primeras dosis de vacunas de ARNm, de virus inactivado y de vector viral. Los títulos de IgA anti-RBD decrecieron en el tiempo, una tendencia similar a la descrita por otros

autores (13, 14), que podría estar relacionada con la cinética natural de esta inmunoglobulina (15).

Los títulos de IgG anti-RBD aumentaron significativamente hasta la novena semana, lo que concuerda con Young et al. (16) y Ricciardi et al. (17), que revelaron el aumento notable de la IgG anti-RBD en la leche materna después de vacunación con ARNm. Jorgensen et al. (18) señalaron que el aumento de IgG es más lento, pero es el isotipo que más tiempo persiste en la leche materna de quienes recibieron este tipo de vacunas.

La actividad neutralizante de los anticuerpos anti-RBD detectados se determinó mediante un ensayo subrogado (19), que reveló la presencia de anticuerpos inhibidores de la interacción



del RBD-Wuhan-Hu-1 con el receptor ACE2 recombinante, en la mayoría de las muestras de leche materna analizadas. Esto confirmó que Abdala genera anticuerpos anti-RBD que podrían bloquear la entrada del SARS-CoV-2 a las células (6). No hubo diferencias significativas entre los promedios de los TNat en los dos grupos de puérperas, lo que sugiere estabilidad en la actividad neutralizante entre las 5 y las 9 semanas después del esquema primario de Abdala. El ensayo subrogado no determinó el isotipo anti-RBD dominante en la inhibición de la interacción RBD-ACE2. Tan et al. (19) explicaron que este ensayo detecta anticuerpos neutralizantes séricos de manera independiente del isotipo, que tienen un efecto sinérgico resultante de la combinación de diferentes isotipos

dirigidos a epítomos críticos para la neutralización.

La actividad neutralizante de los anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 en la leche materna puede atribuirse a los isotipos IgA e IgG (18). Como en el presente trabajo los niveles de IgA anti-RBD fueron siempre superiores a los IgG, podría considerarse que la actividad neutralizante también es mayoritariamente del isotipo IgA, el más abundante y valioso en la leche materna, que protege contra el SARS-CoV-2 en la mucosa del tracto respiratorio y digestivo del lactante (20, 21, 22, 23).

El presente trabajo informa, por vez primera, la relación de los TNat anti-RBD, en leche materna, con tres



características de las puérperas donantes: la presencia o no de ECNT, la paridad al inicio de la vacunación y la edad. Un estudio previo reveló el efecto reductor, causado por las ECNT y la multiparidad, sobre los niveles de anticuerpos anti-RBD generados por Abdala en la leche materna (9), y el efecto ha sido el mismo sobre la actividad neutralizante de esos anticuerpos evaluada en este trabajo.

Los TNat anti-RBD mostraron una tendencia a ser menores en participantes con ECNT. La hipertensión arterial fue la ECNT prevalente en ellas. Algunos investigadores han encontrado niveles bajos de anticuerpos anti-RBD en suero de pacientes hipertensos, en respuesta a las vacunas Pfizer/BioNTech (24) y CoronaVac (25), pero no analizaron la capacidad neutralizante de esas

inmunoglobulinas ni su presencia en la leche materna. El bajo contenido de anticuerpos séricos anti-RBD en los hipertensos puede deberse a que la hipertensión arterial se asocia con una inflamación sistémica crónica, que altera las funciones de tejidos, órganos y células y conduce a un deterioro de la función inmune, que afecta la respuesta a las vacunas (26). Esta podría ser la causa de la reducción de los TNat en la leche materna de las puérperas hipertensas incluidas en este trabajo.

El asma fue la segunda ECNT más frecuente. Se ha comprobado la incidencia negativa del asma en las concentraciones séricas de inmunoglobulinas anti-RBD y en su actividad neutralizante del SARS-CoV-2,



un comportamiento similar al obtenido en las muestras de leche materna del presente trabajo. Liu et al. (27) comprobaron que sólo el 22% de los pacientes asmáticos vacunados con Pfizer y Moderna, incluidos en un estudio prospectivo, tuvieron títulos séricos neutralizantes de la interacción RBD-ACE2, mientras que el 94% de los controles sanos neutralizaron esta interacción hasta 5 meses después de la vacunación.

Runnstrom et al. (28) declararon que los pacientes asmáticos tienen niveles séricos más bajos de anticuerpos anti-RBD después de recibir vacunas de ARNm, en comparación con los sanos. Los autores no evaluaron la capacidad neutralizante de los anticuerpos, pero recomendaron dosis de refuerzo en los asmáticos, debido

al alto riesgo de COVID-19 grave y a los títulos más bajos que generan en ellos las vacunas anti-SARS-CoV-2.

Un estudio más reciente investigó la incidencia de las comorbilidades en la respuesta inmune a la vacuna de Pfizer en poblaciones indígenas y no indígenas. El menor contenido de anticuerpos séricos neutralizantes anti-RBD, al igual que en nuestro estudio con leche materna, se asoció con ECNT presentes en los participantes, como la diabetes y la enfermedad renal crónica (29).

Los anticuerpos neutralizantes, que generan las vacunas anti-SARS-CoV-2 o la infección por este coronavirus, son el verdadero correlato de protección contra la COVID-19, no así la sola presencia de



anticuerpos específicos, aun cuando sus niveles sean altos. Por tanto, el efecto negativo de las ECNT sobre los TNat anti-RBD generados por Abdala en la leche materna, exige maximizar la protección contra la COVID-19 en las embarazadas y las puérperas que padecen alguna de estas enfermedades. Asimismo, son necesarios estudios similares después de las dosis de refuerzo, para confirmar o no la tendencia decreciente de la actividad neutralizante anti-RBD en la leche materna de donantes que padezcan ECNT.

Se estableció una correlación negativa moderada entre los TNat y la paridad al inicio de la vacunación. La relación directa no es fuerte pero sí significativa. El valor $p=0,000$ garantiza que el 99,99%

de las veces la correlación será moderada entre las dos variables (30).

Hasta donde sabemos, se ha publicado un único artículo científico que correlacionó la paridad con los niveles de IgA anti-RBD, pero no con su actividad neutralizante, en la leche materna tras la administración de las vacunas Pfizer y Moderna. Los autores obtuvieron una correlación inversa entre la concentración de IgA anti-RBD excretada en la leche y el número de partos (31).

Aunque no se conoce bien la influencia de la paridad en la actividad neutralizante anti-SARS-CoV-2 en la leche materna después de la vacunación, es importante considerar que la paridad se ha asociado con cambios significativos en la



composición de la leche materna (32). Por ejemplo, la concentración de IgA en el calostro de madres primíparas es significativamente mayor en comparación con las multíparas (33). Akhter et al. (34) advirtieron la influencia significativa de la paridad en la reducción de los niveles de IgG e IgM en la leche de transición y de IgA en el calostro.

El hecho de que este trabajo encontrara una correlación negativa moderada y significativa entre la paridad y los TNat es una alerta para reforzar la protección anti-SARS-CoV-2 de las embarazadas y puérperas multíparas, que se suma a la relacionada con la presencia en ellas de ECNT.

La no existencia de correlación entre la edad de las puérperas y los TNat anti-

RBD, generados en leche materna por una vacuna anti-SARS-CoV-2, es un resultado que no puede ser comparado con otros afines porque no se encuentran en la literatura científica. Trofin et al. (31) informaron que la edad es una variable que no correlaciona con los niveles de anticuerpos anti-RBD IgA e IgG en la leche materna de mujeres que recibieron vacunas de ARNm, y que no influye en la secreción de IgA durante la lactancia, a diferencia de la multiparidad, pero no la correlacionaron con la actividad neutralizante de estos anticuerpos.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado que los TNat anti-RBD, generados en la leche materna por la vacuna Abdala, no se afectan por la edad de la madre lactante, pero se



reducen si es múltipara o padece alguna ECNT. Es preciso reforzar los cuidados de las embarazadas que presenten una o ambas condiciones, así como de sus bebés lactantes, que no recibirán un alto contenido de anticuerpos neutralizantes que sustenten la inmunidad pasiva anti-SARS-CoV-2 a través de la lactancia materna.

RECOMENDACIONES

Investigaciones futuras deberán ahondar en el efecto de las ECNT, la paridad y la edad, en la actividad neutralizante de los anticuerpos que generan en la leche materna las dosis de refuerzo de Abdala, y también de otros tipos de vacunas anti-SARS-CoV-2.

REFERENCIAS

1. Londono J, Ghasmi S, Lawand G, Mirzaei F, Akbari F, Dashti M. Assessment of the golden proportion in natural facial esthetics: A systematic review. J Prosthet Dent [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 26];131(5):804–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022391322002852>
2. Matoula S, Pancherz H. Skeletofacial morphology of attractive and nonattractive faces. Angle Orthod [Internet]. 2006 [cited 2024 Jul 26];76(2):204–10. Available from: <https://meridian.allenpress.com/angle-orthodontist/article-abstract/76/2/204/132010>
3. Papio MA, Fields HW, Beck FM, Firestone AR, Rosenstiel SF. The effect of dental and background facial attractiveness on facial attractiveness and perceived integrity and social and intellectual qualities. Am J Orthod Dentofac Orthop [Internet]. 2019 [cited 2024 Jul 26];156(4):464–474.e1. Available from:



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889540619305311>

4. Devgan L, Singh P, Durairaj K. Minimally Invasive Facial Cosmetic Procedures. *Otolaryngol Clin North Am* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jul 23];52(3):443–59. Available from: [https://www.oto.theclinics.com/article/S0030-6665\(19\)30015-5/abstract](https://www.oto.theclinics.com/article/S0030-6665(19)30015-5/abstract)

5. Mendelson B, Wong CH. Changes in the facial skeleton with aging: Implications and clinical applications in facial rejuvenation. *Aesthetic Plast Surg*. 2012;36(4):753–60.

6. Emer J, Sundaram H. Aesthetic applications of calcium hydroxylapatite volumizing filler: An evidence-based review and discussion of current concepts: (Part 1 of 2). *J Drugs Dermatology* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jul 23];12(12):1345–54. Available from: <https://europepmc.org/article/med/24301235>

7. Donis AA, Gutiérrez PG, Domínguez NR, Moreno GS, Ruiz Ávila J. Revisión de materiales de

relleno. *Dermatologia Cosmet Medica y Quir* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 27];13(1):54–64. Available from: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=57456>

8. Lefebvre-Vilardebo M, Trevidic P, Moradi A, Busso M, Sutton AB, Bucay VW. Hand: Clinical anatomy and regional approaches with injectable fillers. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 26];136(5):258S–275S. Available from: https://journals.lww.com/plasreconsurg/FullText/2015/11001/Midface__Clinical_Anatomy_and_Regional_Approaches.31.aspx

9. Cotofana S, Gaete A, Hernandez CA, Casabona G, Bay S, Pavicic T, et al. The six different injection techniques for the temple relevant for soft tissue filler augmentation procedures – Clinical anatomy and danger zones. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jul 26];19(7):1570–9. Available from:



<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jocd.13491>

10. Casabona G, Kaye KO. Invited Discussion on: Combining Calcium Hydroxylapatite and Hyaluronic Acid Fillers for Aesthetic Indications: Efficacy of an Innovative Hybrid Filler. *Aesthetic Plast Surg.* 2022;46(1):382–4.

11. Bourguignon LYW. Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions. *Am J Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jul 29];184(7):1912–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944014002223>

12. Antoszevska M, Sokolewicz EM, Baranska-Rybak W. Wide Use of Hyaluronic Acid in the Process of Wound Healing—A Rapid Review. *Sci Pharm* [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 29];92(2):23. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-0532/92/2/23>

13. Cotofana S, Koban K, Pavicic T, Yankonva M, Frank K, Green JB, et al. Clinical Validation of the Surface Volume Coefficient for Minimally Invasive Treatment of the Temple. *J Drugs Dermatology* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jul 26];18(6):533–40. Available from: <https://europepmc.org/article/med/31251545>

14. Hernandez CA, Freytag DL, Gold MH, Pavicic T, Ascher B, de Almeida AT, et al. Clinical validation of the temporal lifting technique using soft tissue fillers. *J Cosmet Dermatol.* 2020 Oct 1;19(10):2529–35.

15. Müller DS, Prinz V, Sulovsky M, Cajkovsky M, Cotofana S, Frank K. Volumization of the young and the old temple using a highly cross-linked HA filler. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(6):1634–42.

16. Attenello NH, Maas CS. Injectable fillers: Review of material and properties. *Facial Plast Surg* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 26];31(1):29–34. Available from: <https://www.thieme->



connect.com/products/ejournals/html/
10.1055/s-0035-1544924

17. Moradi A, Shirazi A, David R.
Nonsurgical Chin and Jawline
Augmentation Using Calcium
Hydroxylapatite and Hyaluronic Acid
Fillers. *Facial Plast Surg.*
2019;35(2):140–8.

18. Edsman K, Nord LI, Öhrlund Å,
Lärkner H, Kenne AH. Gel properties
of hyaluronic acid dermal fillers.
Dermatologic Surg [Internet]. 2012
[cited 2024 Jul 26];38(7 PART
2):1170–9. Available from:
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/
/10.1111/j.1524-4725.2012.02472.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-4725.2012.02472.x)

19. Fundarò SP, Salti G, Malvin
Hernandez Malgapo D, Innocenti S.
The rheology and physicochemical
characteristics of hyaluronic acid
fillers: their clinical implications.
mdpi.com SP Fundarò, G Salti, DMH
Malgapo, S Innocenti *International J
Mol Sci* 2022•*mdpi.com* [Internet].
2022 [cited 2024 Jul 29];2022:10518.
Available from:
[https://www.mdpi.com/1422-
0067/23/18/10518](https://www.mdpi.com/1422-0067/23/18/10518)

20. Kim S, Matic DB. The anatomy of
temporal hollowing: The superficial
temporal fat pad. *J Craniofac Surg*
[Internet]. 2005 [cited 2024 Jul
26];16(5):760–3. Available from:
[https://journals.lww.com/jcraniofacial
surgery/fulltext/2005/09000/Zygomatico
temporal_Nerve_Passage_in_the_O
rbit_and.6.aspx](https://journals.lww.com/jcraniofacial_surgery/fulltext/2005/09000/Zygomaticotemporal_Nerve_Passage_in_the Orbit_and.6.aspx)

21. Alghoul MS, Vaca EE, Mioton
LM, Zins JE. The Functional
Anatomy of the Deep Facial Fat
Compartments: A Detailed Imaging-
Based Investigation. *Plast Reconstr
Surg* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jul
26];145(4):870E-871E. Available
from:
[https://journals.lww.com/plastreconsur
g/fulltext/2019/01000/the_functional_
anatomy_of_the_deep_facial_fat.12.as
px](https://journals.lww.com/plastreconstrurg/fulltext/2019/01000/the_functional_anatomy_of_the_deep_facial_fat.12.aspx)

22. Cotofana S, Schenck T, Trevidic
P, Sykes J, Massry G, Liew S, et al.
Midface: clinical anatomy and
regional approaches with injectable
fillers. *Plast Reconstr Surg* [Internet].
2015 [cited 2024 Jul
27];136(5S):219S-234S. Available



from:

https://journals.lww.com/plasreconsurg/abstract/2015/11001/midface__clinical_anatomy_and_regional_approaches.31.aspx

23. Tan M, Clinics TK-FPS, 2015 U. Midface volumization with injectable fillers. kinampark.comM Tan, TC KontisFacial Plast Surg Clin 2015•kinampark.com [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 27];23:233–42.

Available from:

http://kinampark.com/PL/files/Tan2015_Midface_volumization_with_injectable_fillers.pdf

24. Rivera I, Ollarves V, Ortiz D, Caballero V, Lugo D, Ucrós C, et al. Evaluación del efecto de un tratamiento combinado utilizando fórmulas lipolíticas y de estimulación celular para el remodelado mandibular. Acta Bioclínica [Internet]. 2024 [cited 2023 Dec 18];14(27). Available from: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/19450>

25. Braz A, De Paula Eduardo CC. Reshaping the lower face using

injectable fillers. Vol. 53, Indian Journal of Plastic Surgery. Georg Thieme Verlag; 2020. p. 207–18.

26. Scarano A, Rapone B, Amuso D, Inchingolo F, Lorusso F. Hyaluronic Acid Fillers Enriched with Glycine and Proline in Eyebrow Augmentation Procedure. Aesthetic Plast Surg. 2022;46(1):419–28.

27. Yutskovskaya Y, Kogan E, Leshunov E. A randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler. J Drugs Dermatology [Internet]. 2014 [cited 2024 Jul 26];13(9):1047–52. Available from: <https://europepmc.org/article/med/25226004>

28. Mance M, Mosler EL. Premixed hyaluronic acid and calcium hydroxyapatite dermal fillers: A new generation of aesthetic injectables case presentation and review of literature. Open J Clin Med Images [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 26];4(1). Available from:



<https://www.jclinmedimages.org/articles/OJCMI-v4-1178.pdf>

29. Zheng R, Ren D, Xie C, Pan J, Zhou G. Normality mediates the effect of symmetry on facial attractiveness. *Acta Psychol (Amst)* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 26];217. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001691821000615>

30. Peron APLM, Morosini IC, Correia KR, Moresca R, Petrelli E. Photometric study of divine proportion and its correlation with facial attractiveness. *Dental Press J Orthod* [Internet]. 2012 [cited 2024 Aug 5];17(2):124–31. Available from: <https://www.scielo.br/j/dpjo/a/Lp6sGrTXm7Hx4k5DPkpZGPv/>

31. Manzini JL. Declaración de Helsinki: principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta Bioeth* [Internet]. 2000;6(2):321–34. Available from: <https://doi.org/10.4067/s1726-569x2000000200010>

32. Farkas L, Munro I.

Anthropometric facial proportions in medicine [Internet]. Charles C Thomas. Illinois; 1987 [cited 2024 Aug 5]. Available from: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1373664917190081284>

33. Edler R, Agarwal P, Wertheim D, Greenhill D. The use of anthropometric proportion indices in the measurement of facial attractiveness. *Eur J Orthod* [Internet]. 2006 [cited 2024 Aug 5];28(3):274–81. Available from: <https://academic.oup.com/ejo/article-abstract/28/3/274/404711>

34. Newsome HA, Chi JJ. Mastering Midface Injections. *Clin Plast Surg* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jul 23];50(3):437–46. Available from: [https://www.facialplastic.theclinics.com/article/S1064-7406\(22\)00025-6/abstract](https://www.facialplastic.theclinics.com/article/S1064-7406(22)00025-6/abstract)

35. Akinbiyi T, Othman S, Familusi O, Calvert C, Card EB, Percec I. Better Results in Facial Rejuvenation with Fillers. *Plast Reconstr Surg - Glob Open* [Internet]. 2020 [cited



2024 Jul 23];8(10):E2763. Available from:
https://journals.lww.com/prsgo/fulltext/2020/10000/Better_Results_in_Facial_Rejuvenation_with_Fillers.17.aspx?context=LatestArticles

36. Anand C. Facial contouring with fillers, neuromodulators, and lipolysis to achieve a natural look in patients with facial fullness. *J Drugs Dermatology* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jul 23];15(12):1536–42. Available from:
<https://europepmc.org/article/med/28095576>

37. Fakih-Gomez N, Kadouch J. Combining Calcium Hydroxylapatite and Hyaluronic Acid Fillers for Aesthetic Indications: Efficacy of an Innovative Hybrid Filler. *Aesthetic Plast Surg* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jul 26];46(1):373–81. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00266-021-02479-x>

38. Santos J. Estudo da proporção áurea em fotografias faciais de indivíduos com oclusão normal [dissertação] [Internet]. Universidade

Metodista de São Paulo.; 2003 [cited 2024 Aug 5]. Available from:
https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Estudo+da+proporção+áurea+em+fotografias+faciais+de+indivíduos+com++oclusão+normal+%5Bdissertação%5D&btnG=

39. Ricketts RM. The biologic significance of the divine proportion and Fibonacci series. *Am J Orthod* [Internet]. 1982 [cited 2024 Aug 5];81(5):351–70. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002941682900732>

40. Farkas L, Kolar J. Anthropometric and art in the aesthetics of Women face. *Clin Plast Surg* [Internet]. 1987 [cited 2024 Aug 5];14:599–615. Available from:
https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Anthropometric+and+art+in+the+aesthetics+of+woman+faces&btnG=

41. Vegter F, Mulder JW, Hage JJ. Major Residual Deformities in Cleft Patients: A New Anthropometric Approach. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 1997 Mar;34(2):106–10.