

Inmunidad cruzada como factor de la variabilidad clínica de la COVID-19

¿una hipótesis altamente especulativa?

SARS-CoV-2 proteins	Protein length	Peptides tested	Epitopes identified		Positive responses		Response magnitude	
	aa	n	n	%	n	%	SFC 10 ⁴ /PBMCs	%
M	222	8	0	0	0	0	0	0
N	419	7	4	3	4	2	6573	2
S (Non-RBD)	1050	207	54	36	90	44	149360	39
S (RBD)	223	46	12	8	23	11	40873	11
E	75	8	2	1	2	1	2240	1
ORF3a	275	10	6	4	7	3	17587	5
ORF7a	121	4	3	2	3	1	4080	1
ORF6	61	6	6	4	7	3	16453	4
ORF8	121	3	3	2	4	2	13553	4
nsp1	180	2	1	1	1	0	387	0
nsp2	636	14	6	4	7	3	32673	9
nsp3	1945	34	10	7	11	5	7307	2
nsp4	500	22	8	6	10	5	5320	1
nsp5	306	6	2	1	4	2	52907	14
nsp6	290	18	6	4	9	4	5813	1
nsp7	83	4	0	0	0	0	0	0
nsp8	186	5	2	1	2	1	6473	2
nsp9	113	2	0	0	0	0	0	0
nsp10	129	2	1	1	2	1	440	0
nsp12	932	19	7	5	9	4	6850	2
nsp13	601	14	3	2	4	2	5360	1
nsp14	527	19	3	2	4	2	2193	1
nsp15	346	4	1	1	1	0	533	0
nsp16	298	9	2	1	2	1	1853	0
ORF10	36	1	0	0	0	0	0	0
Total		474	142	100	206	100	378570	100

Características de los epítomos del SARS-CoV-2 identificados en donantes no expuestos

Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans.

Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez S.I, Dan J.M, et al. **Science** 2020. 10.1126/science.abd3871

Antecedentes: Aún no se han clarificado los mecanismos que subyacen en la diferente severidad clínica de la evolución de la COVID-19, ni en la naturaleza de la inmunidad protectora frente a la COVID-19.

Diferentes estudios comienzan a descifrar la respuesta inmune humana frente al SARS-CoV-2, caracterizando la respuesta de las células T específicas y describiendo la activación de subpoblaciones de células T en los pacientes COVID-19.

Sorprendentemente, estudios realizados en 5 cohortes en diferentes zonas geográficas (EE.UU, Países Bajos, Alemania, Singapur y Reino Unido) mostraron que el 20-50% de la población no expuesta al SARS-CoV-2 tiene una reactividad significativa de células T frente a péptidos correspondientes a secuencias del SARS-CoV-2. Esta reactividad en sujetos no expuestos previamente al SARS-CoV-2 se debe, predominantemente, a células T CD4+. Se ha especulado que este fenómeno puede ser debido a la persistencia de la memoria inmunitaria frente a los coronavirus (HCoV) responsables del resfriado común (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 o HCoV-229E), todos ellos con cierta homología con el SARS-CoV-2. **La hipótesis de la existencia de inmunidad cruzada entre el SARS-CoV-2 y otros coronavirus está aún pendiente de ensayos experimentales.**

Repertorio de epítomos¹ en individuos sin exposición al SARS-CoV-2

Se utilizaron muestras de sujetos obtenidas entre marzo 2015 y marzo 2018 (previas a la existencia del SARS-CoV-2), y en las que se confirmó la sero-negatividad frente al SARS-CoV-2. Se estimularon, in vitro durante dos semanas, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) junto a conjuntos de péptidos (método reconocido y catalogado como robusto para la detección de la respuesta de baja frecuencia de células T a alérgenos, bacterias o virus).

Cuando expusieron la secuencia completa de las proteínas de la espiga y el conjunto de proteínas de los epítomos sospechosos no pertenecientes a la espiga, encontraron que el 93,2% de la respuesta celular frente a la estimulación del SARS-CoV-2 se debía a células T CD4+, el 4,5% correspondía a CD8+ y el 2,3% se debía tanto a CD4+ como a CD8+.

Distribución de epítomos ORF² originales

¹ Los epítomos o determinantes antigénicos son cada uno de los sitios que siendo reconocidos por el sistema inmunitario, tanto por las células B o de las células T en estado soluble, son capaces de estimular la producción de un anticuerpo específico. Una macromolécula puede contener diferentes epítomos.

² ORFs (Open Reading Frames) codifican otras proteínas. Estas proteínas accesorias son prescindibles para la replicación in vitro e in vivo y por lo tanto pueden ser importantes para otros aspectos de la interacción virus-huésped.

Aunque un amplio abanico de antígenos del SARS-CoV-2 eran reconocidos, era sorprendente que en los donantes (no expuestos) las respuestas más potentes y frecuentes se derivaban de antígenos de la espiga del SARS-CoV-2, siendo el 54% de la respuesta asociada con los epítomos de la espiga (11% con el RBD [Receptor Binding Domain] y el 44% con la porción no RBD de la espiga). Es decir, sólo el 20% de la respuesta a la espiga se derivaba del RBD y la región RBD aportaba sólo el 11% de la reactividad de las células T CD4+.

Además de la respuesta frente a la espiga, se observó respuesta para ORF6, ORF3a, N, ORF8 y en Orf1a/b, donde nsp3, nsp12, nsp4, nsp6, nsp2 y nsp14 (nsp: proteínas no estructurales) fueron los reconocidos con mayor predominancia. Estos resultados se solapan parcialmente con los ORFs que son objetivo de las células CD4+ en los casos de COVID-19. No se identificaron epítomos derivados de la proteína de membrana (M) en los sujetos no expuestos previamente, pero la proteína M era reconocida de manera potente por la respuesta de las células T CD4+ en los casos de COVID-19.

Secuencia homologa de los epítomos identificados del SARS-CoV-2 con otros HCoVs

Se determinó el grado de homología de los 4 HCoVs (conocidos por circular amplia y habitualmente en la Comunidad) con los 142 epítomos identificados del SARS-CoV-2. Los péptidos se dividieron en 3 grupos: no inmunogénicos, inmunogénicos en un individuo o inmunogénicos en 2 o más individuos.

Se observó que existía una significativa mayor similitud en la secuencia de los péptidos que eran reconocidos en 2 o más individuos si lo comparáramos con los péptidos reconocidos por uno solo o ningún individuo. Casi todos los donantes no expuestos eran seropositivos para 3 de los HCoVs de amplia distribución (HCoV-NL63, HCoV-OC42, HCoV-HKU1). Estos datos sugieren que **la reactividad cruzada de las células T es plausible entre el SARS-CoV-2 y otros HCoVs ya establecidos en la población.** Un análisis posterior confirmó la dominancia del antígeno de la espiga sobre los epítomos derivados del resto del genoma. Posteriormente se seleccionaron dos categorías de epítomos, inicialmente los que se consideraba que tenían una potencial reactividad cruzada con los HCoVs y posteriormente los asociados que poseían una alta respuesta. Esto llevó a seleccionar a 31 epítomos de la espiga (CD4+ S31) y otros 30 epítomos (CD4+ R30) del resto del genoma.

Evidencia directa sobre la reactividad de los epítomos homólogos de HCoV con los epítomos del SARS-CoV-2.

Se designaron un conjunto de péptidos abarcando péptidos homólogos con los epítomos CD4-R30 derivados de HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 y otros HCoVs hasta un total de 129 homólogos (HCoV-R129). De forma similar, se sintetizaron un conjunto de péptidos homólogos con el conjunto de epítomos CD4-S31 del SARS-CoV-2 que consistían en potenciales epítomos derivados de otros HCoVs por un total de 124 HCoV homólogos (HCoV-S124). Posteriormente se realizó un ensayo para detectar células T específicas en un nuevo grupo de donantes no expuestos y que no se habían utilizado para la identificación de los epítomos y otro set de pacientes convalecientes de la COVID-19. Se detectó una respuesta ex

vivo significativa de células T CD4+ contra los péptidos de la espiga (CD4-S) y de la no espiga (CD4-R) comparado con los controles negativos (DMSO). Esta respuesta estaba incrementada en los casos COVID-19 en comparación a los no expuestos. En los sujetos no expuestos, se detectaron, con frecuencias significativas, células CD4+ contra los conjuntos de epítomos CD4-R30 y CD4-S31 del SARS-CoV-2 en comparación de los controles negativos. También se observó una significativa reactividad de las células T CD4+ contra los correspondientes conjuntos de péptidos homólogos HCoV-R129 y HCoV-S124 de otros HCoVs. **Todo está en sintonía con la hipótesis sobre la existencia de una reactividad cruzada en muchos individuos entre el SARS-CoV-2 y otros HCoVs.**

La reactividad contra CD4-R30 y CD4-S31, pero no contra HCoV-R129 y HCoV-S124, estaba incrementada en los casos de COVID-19 en comparación con los individuos no expuestos al mismo. Por lo tanto, la reactividad pre-existente de las células T CD4+ de los epítomos de HCoV está modulado por la COVID-19 y por la exposición a los epítomos del SARS-CoV-2 con reactividad cruzada en COVID-19. Estos datos de los casos COVID-19 **no apoyan la hipótesis** de que la exposición a HCoV pudiera inducir el llamado “**pecado antigénico original**”³ que dificultaría la subsecuente respuesta de células T a los epítomos al SARS-CoV-2, al menos en los casos de COVID-19 con enfermedad severa.

Las células T CD4+ que reconocen epítomos del SARS-CoV-2 en los sujetos no expuestos, y los epítomos de otros HCoVs, presentan un fenotipo con memoria. En conjunto, estos datos son consistentes con la **presencia de células T CD4+ reactivas frente al SARS-CoV-2 en los sujetos no expuestos, con la presencia de células T CD4+ con memoria específica frente a HCoV y con reactividad cruzada con SARS-CoV-2.**

Identificación de los epítomos del SARS-CoV-2 con reactividad cruzada con otros HCoVs frecuentes

Se utilizaron los epítomos derivados de los conjuntos CD4-R30 y CD4-S31 para generar líneas celulares mediante estimulación de PBMCs de sujetos no expuestos. Los PBMCs se estimulaban con un epítomo afín al SARS-CoV-2 que había demostrado ser reconocido por las células T de estos sujetos. En conjunto, las líneas celulares T podían derivarse específicamente de un total de 42 epítomos del SARS-CoV-2. **La reactividad cruzada entre los epítomos del SARS-CoV-2 y otros epítomos de HCoVs se detectaron en el 24% de las líneas celulares T.** La reactividad cruzada se asoció con los epítomos derivados de la espiga del SARS-CoV-2, N, nsp8, nsp12 y nsp13. En tres casos, los análogos HCoV fueron mejores antígenos que el péptido del SARS-CoV-2, sugiriendo que pudiera tratarse del inmunógeno afín. Un epítomo de la espiga del SARS-CoV-2 se encontró en dos diferentes donantes no expuestos sugiriendo que los perfiles de la reactividad cruzada del HCoV eran recurrentes entre individuos.

Por otra parte, sólo 3/18 casos con fuerte respuesta a los epítomos presentaban reactividad cruzada, en comparación de los 4/5 epítomos con respuesta débil.

³ El **pecado antigénico original**, se refiere a la propensión del sistema inmunológico a utilizar preferentemente la memoria inmunológica originada en una infección previa cuando una segunda infección ligeramente diferente (un virus o una bacteria) aparece. Esto "atrapa" al sistema inmunológico con la primera respuesta dada a cada antígeno, e incapaz de activar respuestas potencialmente más efectivas en sucesivas infecciones.

Seguidamente se estimularon, durante 14 días, células T CD4+ con memoria y naïve purificadas con el conjunto de epítomos CD4-S31, detectándose respuesta en los cultivos de células T con memoria pero no en las naïve. Todos estos datos demuestran que **las células T CD4+ con memoria que reconocen los HCoV del resfriado** (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 y HCoV-229E) **pueden mostrar una sustancial reactividad cruzada con los epítomos homólogos del SARS-CoV-2.**

Finalmente se examinó por cada par de epítomos SARS-CoV-2: HCoV, el grado de homología en la secuencia de aminoácidos y se existía alguna relación entre la homología y la reactividad cruzada de las células T, considerando diferentes rangos de homología. Sólo el 1% de los pares de péptidos con el 33-40% de homología tenían reactividad cruzada. Entre los que tenían una homología entre el 47-60% la reactividad cruzada se daba en el 21% de los casos. Sorprendentemente, epítomos con homología $\geq 67\%$ se asocia con reactividad cruzada en el 57% de los casos. Por lo tanto, **homologías del 67% en los aminoácidos parece ser el punto de referencia para considerar una potencial reactividad cruzada entre epítomos de clase II.**

Conclusiones:

- se han identificado, en el presente estudio, más de 140 epítomos de células T humanas derivados del genoma del SARS-CoV-2.
- Se ha mostrado evidencia directa de que numerosas células T CD4+ que reaccionan frente a epítomos del SARS-CoV-2 también tienen reactividad cruzada con las secuencias homólogos correspondientes a algunos de los diferentes HCoVs habitualmente circulantes, y que estas células reactivas se rigen por las células T CD4+ con memoria.
- Esta reactividad cruzada se contrapone con los anticuerpos neutralizantes de los HCoV, que son específicos de especie y no muestran reacción cruzada con el RBD del SARS-CoV-2.
- La reacción cruzada pre-existente de las células T CD4+ con memoria del HCoV pudiera contribuir a la variabilidad en la evolución de la COVID-19, pero actualmente es una hipótesis altamente especulativa.