

COLEGIO DE BIOQUIMICOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES



AGOTAMIENTO FUNCIONAL DE LINFOCITOS ANTIVIRALES EN PACIENTES CON COVID-19

Meijuan Zheng, Yong Gao, Gang Wang, Guobin Song, Siyu Liu, Dandan Sun, Yuanhong Xu y Zhigang Tian.

Cellular & Molecular Immunology- Publicado el 19 de marzo de 2020

<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>

En diciembre de 2019, un nuevo coronavirus se informó por primera vez en Wuhan, China (1). Fue nombrado por la Organización Mundial de la Salud como Síndrome Respiratorio Agudo Severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) y es responsable de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Hasta el 28 de febrero de 2020, 79.394 casos han sido confirmados según la Comisión Nacional de Salud de China. Fuera de China, el virus tiene se extendió rápidamente a más de 36 países. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células asesinas naturales (NK) son necesarias para el control de la infección por el virus, el agotamiento funcional de los linfocitos citotóxicos está correlacionado con la progresión de la enfermedad (2). Sin embargo, si los linfocitos citotóxicos en pacientes infectados con SARS-CoV-2 se agotan funcionalmente, no se ha documentado aún. Aquí mostramos que el número total de células T, NK y CD8⁺, disminuyeron notablemente en pacientes con infección por SARS-CoV-2. La función de las células T, NK y CD8⁺ se agotó, con el aumento de la expresión de NKG2A en pacientes con COVID-19. Es importante destacar, que en pacientes convalecientes después del tratamiento, se restauró el número de células T, NK y CD8⁺, con expresión reducida de NKG2A. Estos

resultados sugieren que el agotamiento funcional de los linfocitos citotóxicos, está asociado con la infección por SRAS-CoV-2. Por lo tanto, la infección por SARS-CoV-2 puede alterar la inmunidad antiviral en una etapa temprana.

El SARS-CoV-2 ha sido identificado como del género β -coronavirus, y comparte una homología de secuencia del 79.5% con SARS-CoV (3). En nuestra cohorte de 68 pacientes con COVID-19 ingresados en el hospital "The First Affiliated Hospital" (Hefei) y el "Hospital Fuyang" (Fuyang), los cuales son parte de la Universidad de Medicina de Anhui en China, hubo 55 casos con cuadros de enfermedad leve (DM) y 13 casos de enfermedad grave (DE). Los pacientes tenían entre 11 a 84 años de edad, y la mediana de edad de los pacientes fue de 47,13 años. El porcentaje de pacientes masculinos fue del 52,94%. coincidente con estudios previos, muchos pacientes tenían al ingreso fiebre (80.88%), tos (73.53%) y catarro (32.36%). La prevalencia de otros síntomas (por ejemplo, dolor de cabeza, diarrea) fue relativamente bajo (Tabla complementaria 1). Las características clínicas de los pacientes infectados por SARS-CoV-2 fueron consistente con los reportados por Chen y colegas (4). Al ingreso, el recuento de neutrófilos fue notablemente más alto en pacientes con SD que en casos de MD, mientras que el recuento de linfocitos fue significativamente menor en casos SD que en casos MD. La concentración de bilirrubina total, dímero-D y lactato deshidrogenasa en la sangre presentaron niveles mayores en pacientes con SD que en pacientes con MD. Niveles de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa fueron un poco más altos en casos SD, que en casos MD. Los niveles de albúmina y la hemoglobina fueron menores en pacientes con SD que en aquellos pacientes con DM (tabla complementaria 2). Específicamente, los recuentos de células T y CD8⁺ disminuyeron significativamente en pacientes con DM y DE en comparación con aquellos en controles sanos (HC). El número de células T y CD8⁺ fueron significativamente más bajas en pacientes con SD que en casos de MD. Los recuentos de células NK se redujeron notablemente en pacientes con SD en comparación con aquellos en casos de MD y HC (Figura 1a). Como inhibidor del receptor, se ha demostrado que NKG2A induce el agotamiento de las células NK en las infecciones virales crónicas (5). Es para destacar que la expresión de NKG2A en células T NK y CD8⁺ da como resultado, el agotamiento funcional de las células T NK y CD8⁺ (6). En pacientes infectados con SARS-CoV-2, la expresión de NKG2A aumentó significativamente en células NK y CD8⁺ se comparan con las de los HC (Figura 1b). Luego, para identificar el rol de NKG2A en la función de las células T NK y CD8⁺, niveles de CD107a, interferón (IFN) γ , interleucina (IL) -2, granzima B (proteasa) y el factor de necrosis tumoral (TNF) α se midió mediante la tinción de citoquinas intracelulares. Encontramos porcentajes más bajos de CD107a⁺ NK, IFN- γ células⁺ NK, IL-2⁺ NK y TNF- α + NK y fluorescencia de intensidad media (MFI) de células granzima B⁺ NK en pacientes con COVID-19 que aquellos en HCs. De acuerdo con estos hallazgos, los pacientes con COVID-19 también mostraron porcentajes disminuidos de CD107a⁺ CD8⁺, IFN- γ + CD8⁺, y células T IL-2⁺ CD8⁺ e MFI de células T granzimas B⁺ CD8⁺, comparadas con aquellos en HC (Figura 1c). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren el agotamiento funcional de linfocitos citotóxicos en pacientes infectados por COVID-19. Por lo tanto, el SARS-CoV-2 puede alterar la inmunidad antiviral, en una etapa temprana. En nuestro entorno, aproximadamente el 94.12% de los pacientes recibieron terapia con antivirales (Kaletra® nombre comercial de la mezcla del lopinavir que es inhibidor de la proteasa viral y ritonavir que frena el metabolismo hepático del lopinavir). El fosfato de cloroquina se usó en el 7.35% de los pacientes, y la proporción de pacientes tratados con IFN fue de 64,71%. Además, el 48,53% de los pacientes recibió tratamiento con antibióticos (Tabla complementaria 3). Se comparó el número total de linfocitos citotóxicos (incluidos los CTL y las células NK) después del tratamiento. El número total de células T y células NK recuperadas en el período de convalecencia en cuatro de los cinco pacientes, y el recuento total de CTL, se restableció en el período de convalecencia en tres de los cinco pacientes (Figura 1d). Por lo tanto, la terapia eficaz fue acompañada por un mayor número de células T, CTL y células NK. Es importante destacar que el porcentaje de células NKG2A⁺ NK se redujo en el período de convalecencia en comparación con el período anterior al tratamiento en cinco pacientes. Del mismo modo, cinco pacientes mostraron una disminución porcentaje de NKG2A⁺ CTL en el período de convalecencia (Figura 1e). Estos hallazgos sugieren que la regulación negativa de la expresión de NKG2A puede correlacionarse con el control de la enfermedad en pacientes con COVID-19. Mostramos que la expresión de NKG2A, estaba sobre expresada en células NK y CTL en pacientes con COVID-19 con una capacidad reducida para producir CD107a, IFN- γ , IL-2, granzima B y TNF- α . Además, el porcentaje de linfocitos citotóxicos NKG2A⁺ disminuyó en pacientes recuperados infectados con SARS-CoV-2, lo que sugiere que la expresión de NKG2A, puede estar correlacionada con el agotamiento funcional de los linfocitos citotóxicos y la progresión de la enfermedad en la etapa temprana de COVID-19. Aunque el agotamiento de las células T y NK ocurre en la infección crónica y la tumorigénesis

humana, la apoptosis de las células T (que se considera como el mecanismo huésped involucrado en la infección crónica y el cáncer) también ocurre en la infección por SARS-CoV (7). Por lo tanto, pueden estar presentes linfocitos citotóxicos NKG2A⁺ agotados en pacientes con COVID-19. Con respecto a nuestro hallazgo de que el porcentaje de linfocitos citotóxicos NKG2A⁺ disminuyó después de la terapia antiviral en pacientes con COVID-19, el control eficaz de la infección por SARS-CoV-2 está relacionado con la reducción de la expresión de NKG2A en los linfocitos citotóxicos. Por lo tanto, en pacientes con COVID-19 con inflamación pulmonar severa, la expresión de NKG2A inducida por el SARS-CoV-2 puede correlacionarse con el agotamiento funcional de los linfocitos citotóxicos en la etapa temprana, lo que puede provocar la progresión de la enfermedad. Además, se han demostrado receptores de "punto de control", inhibidores inmunitarios que provocan el agotamiento de las células NK y T en infecciones crónicas y cáncer. Es importante destacar que los inhibidores de puntos de control como anti-PD-1 y anti-TIGIT, ayudan a revitalizar las respuestas agotadas de las células T o NK en el contexto de infección crónica y cáncer (8,9). Se cree que NKG2A es una molécula inhibitoria novedosa en el bloqueo del punto de control inmunitario (10). Tomados en conjunto, estos datos resaltan la importancia de mejorar la respuesta inmune de las células NK y CTL para evitar el agotamiento de los linfocitos citotóxicos en la etapa temprana de la infección por SARSCoV-2.

Por lo tanto, apuntar a la molécula NKG2A puede prevenir el agotamiento funcional de los linfocitos citotóxicos y en consecuencia, contribuir a la eliminación del virus en la etapa temprana de la infección por SRAS-CoV-2.

Bibliografía

1. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733 (2020).
2. Zhang, C. et al. NKG2A is a NK cell exhaustion checkpoint for HCV persistence. *Nat. Commun.* 10, 1507 (2019).
3. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).
4. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513 (2020).
5. Li, F. et al. Blocking the natural killer cell inhibitory receptor NKG2A increases activity of human natural killer cells and clears hepatitis B virus infection in mice. *Gastroenterology* 144, 392–401 (2013).
6. Andre, P. et al. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell* 175, 1731–1743 (2018).
7. Barathan, M. et al. Viral persistence and chronicity in hepatitis C virus infection: role of T-cell apoptosis, senescence and exhaustion. *Cells* 7, 165 (2018).
8. Barber, D. L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687 (2006).
9. Zhang, Q. et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* 19, 723–732 (2018).
10. Haanen, J. B. & Cerundolo, V. NKG2A, a new kid on the immune checkpoint block. *Cell* 175, 1720–1722 (2018).

Figura 1- Los linfocitos citotóxicos NKG2A⁺ están funcionalmente agotados en pacientes con COVID-19. **A-** Número absoluto de células T, células T CD8⁺ y células NK en la sangre periférica de controles sanos (n = 25) y pacientes con infección leve (n = 55) y grave (n = 13) con SARS-CoV-2. **B-** Porcentajes de células NKG2A⁺ NK y células T NKG2A⁺ CD8⁺ en la sangre periférica de controles sanos (n = 25) y pacientes infectados con SARS-CoV-2 (n = 68). **C-** Expresión de CD107a, IFN- γ , IL-2 y granzima-B intracelulares en células NK bloqueadas y células T CD8⁺ y porcentaje de células TNF- α + NK en la sangre periférica de pacientes infectados con SARS-CoV-2 y sanos control S. **D-** Número total de células T, CTL y células NK en la sangre periférica de pacientes con COVID-19 y pacientes convalecientes. **E-** Porcentajes de células NKG2A⁺ NK y NKG2A⁺ CTL en la sangre periférica de pacientes con COVID-19 y pacientes convalecientes. Los datos son la media \pm SEM. Se realizaron pruebas t de Student de dos colas sin parear / pareadas. p <0.05 se consideró significativo. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001; N.S., no significativo

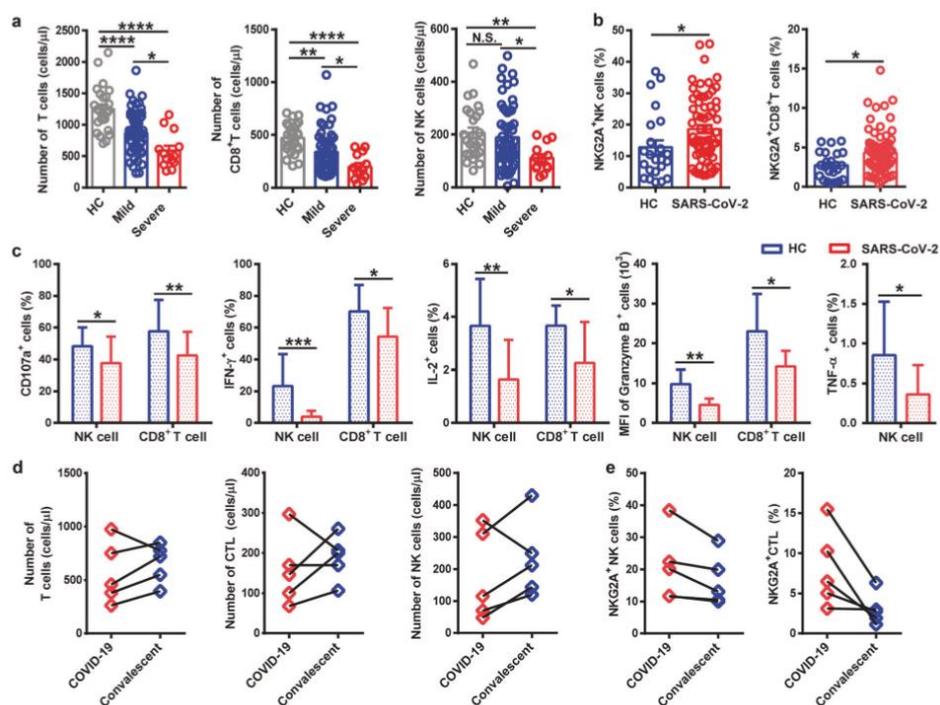


Tabla 3- Tratamiento recibido por los pacientes infectados

	All patients (n=68)	Mild (n=55)	Severe (n=13)
Kaletra	64/68(94.12%)	52/55(94.55%)	12/13(92.31%)
Hydroxychloroquine/ Chloroquine Phosphate	5/68(7.35%)	4/55(7.27%)	1/13(7.69%)
Interferon therapy	44/68(64.71%)	34/55(60.00%)	10/13(76.92%)
Antibiotic therapy	33/68(48.53%)	22/55(40.00%)	11/13(84.62%)

Tabla 2- Datos bioquímicos de los pacientes al momento de la admisión

	All patients (n=68)	Mild (n=55)	Severe (n=13)	P value
White blood cell count, × 10 ⁹ /L	5.981(2.83-14.24)	5.744(2.83-14.24)	6.868(3.07-13.26)	0.1519
Neutrophil count, × 10 ⁹ /L	3.806(1.24-12.07)	3.462(1.24-7.78)	5.098(1.72-12.07)	0.0111
Lymphocyte count, × 10 ⁹ /L	1.37(0.32-2.33)	1.487(0.57-2.33)	0.9333(0.32-1.76)	<0.0001
Monocyte count, × 10 ⁹ /L	0.432(0.24-0.74)	0.4309(0.24-0.68)	0.4358(0.24-0.74)	0.9138
CD4 ⁺ T, Cell/μl	491.391(108.47-1040)	509.8(108.47-1040)	413.3(140-885.63)	0.3145
B cell, Cell/μl	157.451(39-356)	158.4(66-356)	114.6(39-270.71)	0.1119
Haemoglobin, g/L	129.389(87-170)	131.8(87-170)	120.3(101-162)	0.0426
Platelet count, × 10 ⁹ /L	238.3(79-380)	238.3(90-366)	238.3(79-380)	0.9994
Prothrombin time, s	11.713(9.7-17.7)	11.58(9.7-14.9)	12.12(10.4-17.7)	0.2390
D-dimer, mg/L	1.181(0.12-8.71)	0.5207(0.12-3.48)	3.312(0.51-8.71)	<0.0001
Albumin, g/L	37.573(9.7-47.4)	39.26(9.7-47.4)	32.65(26-38.6)	0.0012
Alanine aminotransferase, U/L	30.129(7-167)	24.7(7-67)	46(14-167)	0.0090
Aspartate aminotransferase, U/L	24.176(10-89)	20.16(10-48)	35.92(15-89)	0.0005
Total bilirubin, mmol/L	14.927(4.7-47.8)	13.62(4.7-47.8)	18.86(9.3-32.5)	0.0337
Potassium, mmol/L	4.003(2.69-5.17)	4.039(2.95-4.96)	3.894(2.69-5.17)	0.4247
Sodium, mmol/L	140.687(132.1-187)	141(132.9-187)	139.6(132.1-146.2)	0.6008
Creatinine, μmol/L	69.209(39-209)	69.29(44-209)	63.62(39-106)	0.5301
Lactate dehydrogenase, U/L	223.1(117-551)	186.9(117-303)	326.2.1(142-551)	<0.0001
C-reactive protein, mg/L	28.819(0.1-343.8)	22.72(0.1-343.8)	48.35(0.3-156.9)	0.2515