

UAH

INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON COVID-19

HUMORAL IMMUNITY IN COVID-19 PATIENTS

Grado en Medicina

Presentado por:

D. Alejandro Rivera Delgado

Tutorizado por:

Dr. Santiago Moreno Guillén

Alcalá de Henares, a 28 de mayo de 2021

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

RESUMEN

La pandemia originada por la COVID-19 constituye una auténtica crisis sanitaria y económica mundial, colapsando los sistemas sanitarios de países por todo el mundo. Se ha propuesto que la respuesta inmunológica contra la infección, en concreto la existencia de reactividad cruzada humoral por anticuerpos formados previamente contra coronavirus causantes de infecciones catarrales estacionales, podría explicar la heterogeneidad en la severidad de la infección, que abarca desde pacientes asintomáticos a casos muy graves. Con el objetivo de evaluar esto, se han estudiado las diferencias en los títulos de IgG entre personas que han pasado COVID-19 con distinto grado de severidad, y controles sin infección por SARS-CoV-2. Los resultados sugieren que existe inmunidad cruzada humoral contra SARS-CoV-2 en personas que no han estado en contacto con ese virus, pero que no tendría capacidad protectora ni modularía la clínica. También se evidencia una mayor respuesta humoral en casos más severos, la cual podría relacionarse con una respuesta inmune desorganizada y desadaptativa que podría ser la causante del agravamiento de la clínica en esos pacientes.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, coronavirus, inmunidad humoral, reactividad cruzada, NL63, HKU1, 229E, OC43

ABSTRACT

The pandemic caused by COVID-19 constitutes a true global health and economic crisis, collapsing health systems of countries all around the world. It has been proposed that the immune response against infection, specifically the existence of humoral cross-reactivity by previously formed antibodies against coronaviruses that cause seasonal catarrhal infections, could explain the heterogeneity of the infection severity, ranging from asymptomatic patients to very severe cases. In order to evaluate this, differences in IgG titers between people who have been diagnosed with COVID-19 with different degrees of severity, and controls without infection with SARS-CoV-2 have been studied. The results suggest that humoral cross-immunity against SARS-CoV-2 in people who have not been infected with this virus exists, but it is not protective nor able to modulate the clinical expression. A greater humoral response is also evidenced in the more severe cases, which might be related to a disorganized and maladaptive immune response that would aggravate the infection in those patients.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, coronavirus, humoral immunity, cross-reactivity, NL63, HKU1, 229E, OC43

RESUMEN DE ABREVIATURAS

COVID-19	Coronavirus Infectious Disease-19
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
HCoV	Human coronavirus
SARS-CoV-1	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus
RBD	Receptor binding domain
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
ECA-2	Enzima convertidora de angiotensina 2
AGTR1A	Type 1A Angiotensin II receptor
PCR	Polymerase chain reaction
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

COVID-19 describe el cuadro clínico ocasionado por la infección por el coronavirus SARS-CoV-2. La expresión clínica es variada, y abarca desde casos asintomáticos hasta casos de gran severidad que requieren ingreso en unidades de cuidados intensivos. La clínica más frecuente es una combinación de fiebre, tos seca y dolor de garganta, con intensa astenia, mialgias y/o cefalea, pudiendo aparecer también síntomas gastrointestinales como vómitos o diarrea¹. En casos más graves pueden existir infiltrados alveolares, generalmente bilaterales, que ocasionan disnea y taquipnea. Se ha descrito la anosmia y ageusia como clínica de aparición precoz, en ocasiones precediendo a la aparición del resto de semiología, y siendo un buen predictor de la enfermedad²⁻⁴. Otra clínica menos frecuente incluye alteraciones neurológicas (accidente cerebrovascular, ataxia, Guillain-Barré), cardiológicas, exantemas y fenómenos trombóticos.

En la actualidad, la COVID-19 constituye una emergencia mundial, y desde la descripción del primer caso el 31 de diciembre de 2019 en Wuhan, China, se han comunicado más de 3 millones de muertes y 167 millones de casos a día 24 de mayo de 2021. La rápida extensión y clínica potencialmente grave ha obligado a la mayoría de los países a establecer medidas estrictas de control y prevención entre las que se incluyen el distanciamiento social, empleo obligatorio de mascarillas e higienización periódica de las manos con soluciones hidroalcohólicas. Aun así, la infección ha seguido propagándose, causando la saturación de sistemas sanitarios en todo el mundo.

La comprensión de la dinámica de transmisión pandémica y postpandémica del SARS-CoV-2 es por tanto fundamental a la hora de imponer las medidas preventivas adecuadas para minimizar el impacto en la sociedad, así como para agilizar el tiempo de respuesta en futuras pandemias. Así mismo, el estudio de los factores que modulan la gravedad de la clínica permitiría acotar poblaciones de alto riesgo, desarrollar terapias específicas, y en general paliar las consecuencias de la infección en los pacientes, a menudo de gran severidad. Algunos de los factores más importantes relacionados con la evolución de la pandemia son la intensidad y momento de la aplicación de las medidas de control, el grado de variación estacional en la transmisión, factores de virulencia y comorbilidades del huésped, y la respuesta inmunológica en la población.

Se ha estudiado de manera comparativa el genoma y la estructura, el mecanismo fisiopatológico, la respuesta inmune y la dinámica de infección del SARS-CoV-2 frente al resto de coronavirus que infectan y ocasionan clínica en humanos con el objetivo de hallar mecanismos comunes que permitan extrapolar los conocimientos existentes sobre medidas preventivas y terapéuticas a la COVID-19. SARS-CoV-2 es el coronavirus de más reciente aparición dentro de los 7 que infectan a humanos, y dentro de éstos, 5 han sido descubiertos en los últimos 20 años, lo cual sugiere una alta frecuencia de recombinaciones y capacidad de mutación. Los coronavirus no epidémicos o endémicos (HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoV-OC43) son causantes de infecciones leves del tracto respiratorio superior con estacionalidad invernal, mientras que SARS-CoV-1 y MERS-CoV han sido causantes de infecciones respiratorias graves en el contexto de pandemias en 2002-2004 y 2012, respectivamente. Los 7 virus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, y se agrupan dentro del género *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, MERS-CoV, HKU1 y OC43) y *Alphacoronavirus* (NL63 y 229E).

Son virus RNA monocatenarios de polaridad positiva. Los dos tercios proximales al extremo 5´terminal de su RNA se traducen en 2 poliproteínas (pp1a y pp1ab) que se escisionan para generar entre 15-16 proteínas no estructurales (nsp) que se combinan luego en el complejo de replicación. El tercio distal al extremo 5´terminal codifica las proteínas estructurales que incluyen las proteínas de nucleocápside (N), la glicoproteína integral de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína transmembrana Spike (S)⁵⁻⁷. En general, la proteína S tiene una subunidad 1 (S1), que contiene el dominio de unión al receptor (RBD); y una subunidad 2 (S2), que se encarga de la fusión de membranas^{8,9}.

Esta estructura, en términos generales, es compartida entre los coronavirus que infectan a humanos, con alguna variación. Algunos de los *Betacoronavirus* (OC43 y HKU1) codifican una hemaglutinina-esterasa (HE) que se expresa en su superficie y se fija a residuos de ácido siálico de la célula huésped, hidrolizando grupos acetilo y potencialmente facilitando la entrada viral.

El mecanismo de entrada en la célula se vale de la proteína S para, a través del RBD, unirse a su diana celular, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2), presente sobre todo en células alveolares tipo 1 y 2, epitelio, endotelio y macrófagos^{5-7,10}. La unión con el receptor fomenta la proteólisis de S1 por parte de la Proteasa transmembrana de

serina 2 (TMPRSS2) y posteriormente por Catepsina B y Catepsina L, lo que a su vez causa un cambio conformacional en el extremo C'-terminal de la subunidad S2 que desemboca en la fusión de membranas y entrada del virus en la célula diana. La disponibilidad de cada receptor, por tanto, podría ser un factor de susceptibilidad de cada persona. La entrada en la célula causa la activación de la respuesta inmunitaria innata, con activación de complemento y piroptosis que ocasiona daño en los tejidos diana, exponiendo el subendotelio y siendo la causa de un aumento de fenómenos trombóticos. La regulación a la baja de ECA-2 se traduce en un aumento de angiotensina II, que al estimular el receptor 1A de angiotensina tipo II (AGTR1A) a nivel pulmonar puede aumentar la permeabilidad de los capilares pulmonares y generar edemas pulmonares¹¹. Por otro lado, se ha descubierto que el sitio de escisión por furina localizado entre S1 y S2 es estructuralmente muy similar a la subunidad alfa del canal epitelial de sodio humano, por lo que podría competir con éste, disminuyendo la activación proteolítica del canal y su función y fomentando la formación de edema pulmonar agudo al disminuir el aclaramiento de líquido alveolar^{12,13}. Todo ello se suma a la propia acción inflamatoria del SARS-CoV-2 para provocar la clínica grave de neumonía bilateral.

SARS-CoV-2 comparte su diana celular, ECA-2, con el SARS-CoV-1 y NL63, lo cual sugiere una cierta similitud en la estructura de su proteína de unión al receptor S^{8,9}. Los coronavirus han demostrado tener una gran homología para la mayoría de sus proteínas estructurales, excepto la proteína S, más específica de especie^{5,6,9}.

Ante estas similitudes, se ha propuesto que uno de los factores que influyen en la gravedad de la infección podría ser el reconocimiento de antígenos de SARS-CoV-2 por parte de anticuerpos dirigidos contra antígenos de otros coronavirus; esto es, la existencia de reactividad humoral cruzada. La alta incidencia de infecciones catarrales por coronavirus no epidémicos generaría unos títulos de anticuerpos lo suficientemente altos y/o de duración prolongada en el tiempo como para reaccionar contra SARS-CoV-2, lo cual también podría ser un factor en la heterogeneidad de la expresión clínica, ya que la infancia es la etapa en la que se ha observado mayor incidencia de infecciones catarrales por coronavirus endémicos, y en ellos es más frecuente que la infección sea asintomática o leve¹⁴. Se desconoce, no obstante, si esta inmunidad cruzada sería capaz de neutralizar el SARS-CoV-2, y por tanto fuera protectora; o si fuera capaz de reducir la gravedad.

Además de la inmunidad cruzada, se han estudiado otros posibles factores de riesgo para desarrollar una clínica más grave, pudiendo asociarse a una peor evolución la existencia de hipertensión arterial, enfermedades hepáticas, enfermedad renal crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer y enfermedades neurológicas^{15,16}.

Se ha comprobado también que la respuesta inmune tiene algunas diferencias entre los casos leves y graves, tanto en intensidad como en el patrón de citoquinas expresadas durante el curso de la infección. En un estudio¹⁷ realizado para describir los patrones inmunológicos de la COVID-19 según su gravedad, se cuantificaron los niveles de citoquinas plasmáticas obteniendo que inicialmente hay expresión de citoquinas de respuesta inmunitaria tipo 1 y tipo 3 en ambos grupos. En los casos con clínica más leve, los niveles de citoquinas disminuirían con el tiempo, mientras que en los casos más graves no solo se mantendrían, sino que también se expresarían citoquinas de respuesta inmunitaria tipo 2 (antihelmíntica, con aumento en suero de IL-5, IL-13, IgE y eosinófilos). Las diferencias descritas orientan a que el patrón e intensidad de la respuesta inmune puede estar relacionado con los mecanismos que aumentan la gravedad de la COVID-19. En la respuesta inflamatoria de casos severos, por ejemplo, aumentan los niveles de trombotocina, pudiendo asociarse a un mayor riesgo de coagulopatías.

Objetivos

La similitud entre los coronavirus que causan clínica en seres humanos y los antecedentes de inmunidad cruzada entre coronavirus no epidémicos sugiere que podría existir una reactividad inmunológica cruzada de anticuerpos contra antígenos de coronavirus endémicos contra SARS-CoV-2, y viceversa.

De igual manera, es preciso estudiar en más profundidad la diferente respuesta inmune que tiene lugar en los casos leves y más graves, para conocer su relación con una mayor mortalidad. Niveles altos de anticuerpos en casos más graves podrían deberse a que la inmunidad humoral influye aumentando la gravedad. Sin embargo, niveles de anticuerpos menores que en casos leves sugerirían que podría ser un fallo en la generación de inmunidad humoral cuantitativa la que permitiera que el SARS-CoV-2 ejerciera su acción patológica sin control. La respuesta inmunológica previamente formada, en caso de existir, podría incluso dificultar el establecimiento de una nueva respuesta inmune, más específica, debido a la similitud la estructura entre los distintos coronavirus, un fenómeno conocido como efecto Hoskins.

El objetivo de este estudio es evaluar la existencia de inmunidad humoral cruzada entre coronavirus endémicos y SARS-CoV-2, y si dicha respuesta pudiera ser protectora o se relacionase positiva o negativamente con la gravedad. Del mismo modo, también se evaluará cuantitativamente la respuesta inmune humoral en pacientes con clínica severa y con clínica más leve, para estimar su papel en la fisiopatología de la COVID-19.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Estudio de casos y controles entre personal laboral, sanitario y no sanitario, del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Los participantes en el estudio se seleccionaron a partir del listado del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales y los listados del Servicio de Microbiología, donde constan identificados todos los trabajadores del centro hospitalario y los resultados de sus pruebas serológicas y PCR contra SARS-CoV-2 realizadas.

Se definieron como casos (grupo 1) los participantes que habían tenido infección por SARS-CoV-2 confirmada mediante PCR de exudado nasofaríngeo. El grupo control (grupo 0) lo integraban los participantes que no habían padecido infección por SARS-CoV-2 en base a tres criterios: ausencia de síntomas compatibles con COVID-19 desde el comienzo de la pandemia, no haber tenido nunca una PCR positiva para SARS-CoV-2 y ausencia de anticuerpos IgG e IgM específicos contra SARS-CoV-2 en muestra reciente. Para confirmación de este último criterio todos los participantes del grupo control tuvieron un estudio serológico realizado en su inclusión en el estudio.

Cada caso se apareó con 2 controles según la edad (± 5 años), sexo y grado estimado de exposición al SARS-CoV-2 según puesto de trabajo. Cada puesto de trabajo se estratificó según el riesgo en 3 niveles: alto riesgo (médicos internos residentes, facultativos especialistas, jefes de servicio y de sección, médicos de urgencia, fisioterapeutas, celadores y enfermeros), riesgo intermedio (trabajadores sociales, técnicos de radiodiagnóstico, optometristas, biólogos internos residentes, auxiliares administrativos y peluqueros) y bajo riesgo (técnicos de anatomía patológica y de diagnóstico clínico, cocineros, fontaneros, mecánicos y pinches de cocina).

Los participantes fueron contactados a lo largo del mes de agosto de 2020 para la extracción de una muestra de sangre venosa y la realización de una encuesta en la cual se valoraba la edad, sexo y puesto laboral, los antecedentes de clínica compatible con COVID-19 desde el comienzo de la pandemia y su gravedad, y los antecedentes de realización de estudios serológicos o PCR previas para el diagnóstico de COVID-19.

Se consideró enfermedad leve aquella que no había requerido ingreso hospitalario, moderada la que había precisado hospitalización sin ingreso en UCI y grave la que había precisado ingreso en UCI o había ocasionado la muerte del paciente. Los participantes en el grupo de casos fueron todos de gravedad leve o moderada. Para poder evaluar los objetivos relacionados con la gravedad, se añadió un tercer grupo de casos con enfermedad grave. Para ellos se seleccionaron de modo aleatorio pacientes que habían fallecido en el hospital a causa de COVID-19 de los que se guardaba una muestra de suero congelada. Estos participantes no se aparearon con un grupo control.

Estudios de laboratorio

Los estudios de laboratorio se realizaron con simple ciego como técnica de enmascaramiento. El personal de laboratorio desconocía si las muestras procedían de casos, controles o de los casos con enfermedad grave. La metodología empleada para cada prueba fue la siguiente:

ELISA IgG frente a HCoV. En cada muestra de suero, se cuantificaron los títulos de anticuerpos IgG frente a la proteína de nucleocápside N (Creative diagnostics, New York, USA) de los coronavirus humanos NL63, HKU1, 229E y OC43 mediante ELISA indirecto, empleando anticuerpos anti-IgG humana, midiendo la absorbancia a 450 nm y corrigiendo el blanco de reactivo.

Determinación de IgG anti-SARS-CoV-2. Se utilizó el ensayo Abbott Alinity SARS-CoV-2 (Abbot, Illinois, EE. UU.) para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG específicos frente a la proteína S del SARS-CoV-2 en todas las muestras de suero, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección molecular de SARS-CoV-2. Para la detección cualitativa de los genes N, S y ORF1ab del SARS - CoV-2, se realizó una PCR multiplex en tiempo real en muestras nasofaríngeas utilizando el kit combinado TaqPath COVID-19 (Thermofisher, Massachusetts, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados, se ha empleado el programa estadístico IBM SPSS Statistics 26.0, considerando un nivel de significancia estadística a un valor de p menor a 0,05 ($p < 0,05$). Los datos se han sometido a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Saphiro-Wilk según tamaño muestral para valorar normalidad, tras lo cual se emplearon

pruebas no paramétricas para el contraste de hipótesis (U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis) y el análisis de la correlación entre las variables (Coeficiente de Correlación de Spearman).

Aspectos Éticos

Los datos necesarios para el desarrollo del estudio y el análisis estadístico fueron proporcionados de manera codificada, sin manejar en ningún momento datos de carácter personal, por el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, a partir de un estudio aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del mismo hospital. Todos los participantes vivos dieron su consentimiento informado para participar en el estudio.

RESULTADOS

Se reclutaron un total de 221 participantes: 92 casos que habían tenido COVID-19 leve a finales de abril o principios de mayo y que no habían requerido ingreso, 84 controles, y 45 pacientes que habían sufrido exitus durante el ingreso por COVID-19. Las características de casos y controles se muestran en la tabla 1.

	Grupo 0 (n=92)	Grupo 1 (n=84)
Mujeres (%)	86,42%	90,11%
Hombres (%)	13,58%	9,89%
Media Edad (años)	42,75 años	40,9 años
Profesión de alto riesgo (%)	86,42%	87,91%
Profesión de riesgo intermedio (%)	8,64%	4,93%
Profesión de riesgo bajo (%)	4,39%	7,69%

TABLA 1. Proporción de participantes de los grupos 0 y 1 según sexo y riesgo profesional. Edad media de los participantes de grupo 0 y 1.

Anticuerpos frente a la proteína N de HCoV y la proteína S de SARS-CoV-2.

De cada grupo se midieron los títulos de anticuerpos IgG contra proteína N de coronavirus endémicos (HCoV NL63, HKU1, 229E y OC43) (Tabla 2 y Figura 1) y frente a la proteína S de SARS-CoV-2 en todos los participantes (Tabla 2 y Figura 2).

	Grupo 0 Participantes que no tuvieron COVID-19 (n=84)	Grupo 1 Participantes que pasaron COVID-19 leve (n=92)	Grupo 2 Participantes que sufrieron exitus por COVID-19 (N= 45)	U de Mann- Whitney Grupo 0 y 1 p	Kruskal- Wallis p
IgG NL63 (AU/ml)	0,136 (0,09-0,238)	0,149 (0,079-0,388)	2,739 (1,673-3,628)	p = 0,622	p <0,01*
IgG HKU1 (AU/ml)	0,143 (0,001-0,556)	0,248 (0-0,844)	0,018 (0-0,520)	p = 0,395	p=0,229
IgG 229E (AU/ml)	0,298 (0,080-0,553)	0,344 (0,134-0,707)	0,465 (0,189-1,161)	p = 0,110	p= 0,059
IgG OC43 (AU/ml)	0,389 (0,221-0,838)	0,630 (0,207-1,263)	0,431 (0,238-1,066)	p = 0,177	p= 0,389
IgG SARS-CoV-2 (AU/ml)	0 (0,000-1,400)	470,95 (211-1027)	1256,300 (31,000-13776,200)	p <0,01*	p <0,01*

TABLA 2. Mediana y rango intercuartílico (en paréntesis) de los títulos de anticuerpos IgG contra proteína N de NL63, HKU1, 229E y OC43, y contra proteína S de SARS-CoV-2 en cada grupo, expresados en AU/ml. A la derecha, p valor para las comparaciones de las medianas, empleando U de Mann-Whitney entre grupo 0 y 1, y Kruskal-Wallis entre los tres grupos. Se destacan con asterisco las diferencias estadísticamente significativas

En todos los grupos se observó seropositividad contra proteína N de coronavirus endémicos, de entre los cuales para el que mayores títulos de anticuerpos reactivos había en el grupo control y en los pacientes que habían tenido COVID-19 leve fue para OC43,

seguido por 229E. En los pacientes que tuvieron COVID-19 grave, el coronavirus endémico para el que más reactividad hubo fue NL63.

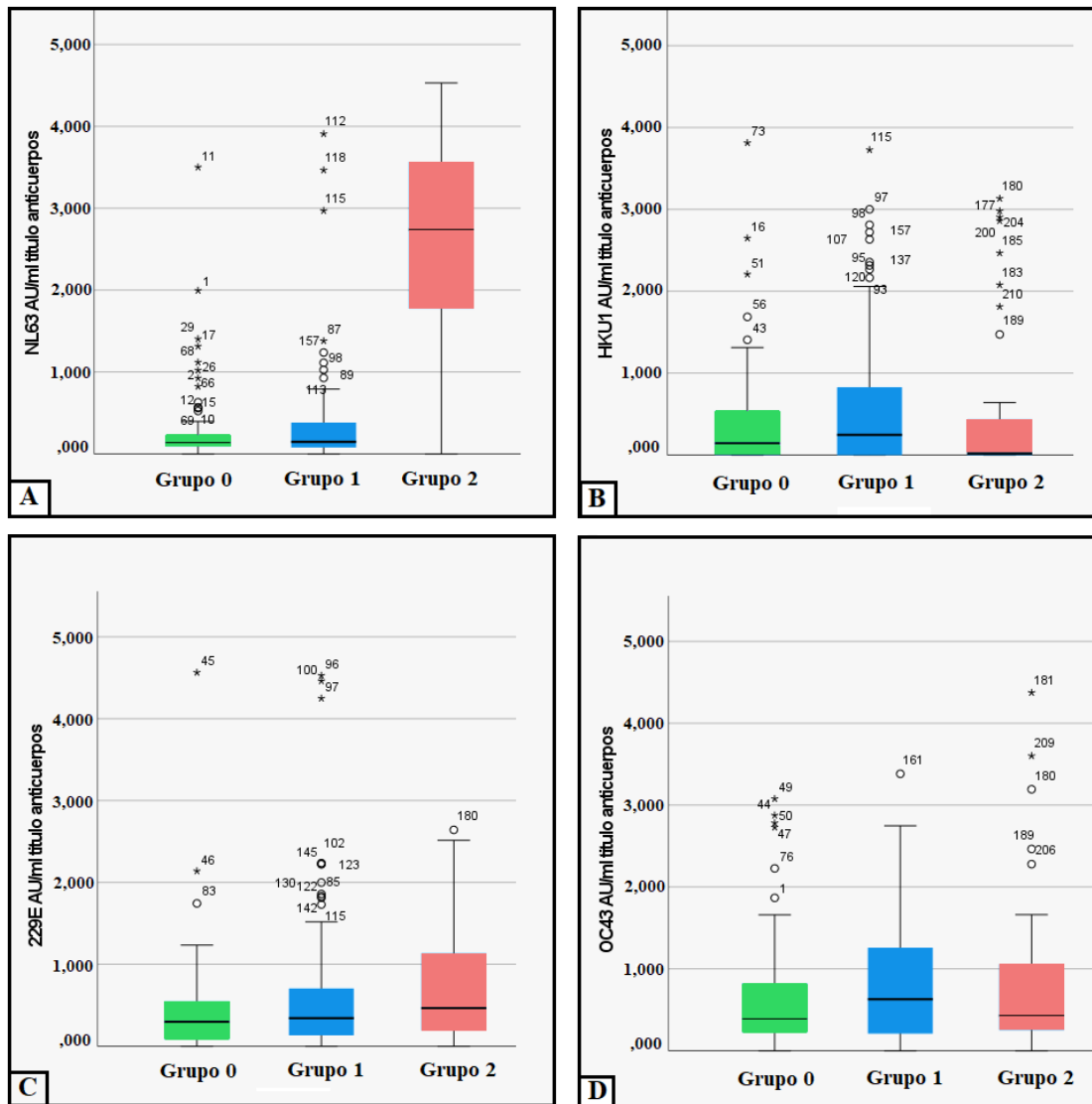


Figura 1. Títulos de IgG contra proteína N de los coronavirus endémicos en cada uno de los tres grupos, expresado en AU/ml. Grupo 0 corresponde al grupo control, grupo 1 a los casos leves, y grupo 2 a los casos que sufrieron exitus. A. IgG contra NL63. B. IgG contra HKU1. C. IgG contra 229E. D. IgG contra OC43.

En cuanto a los títulos de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 hubo diferencias importantes entre los tres grupos.

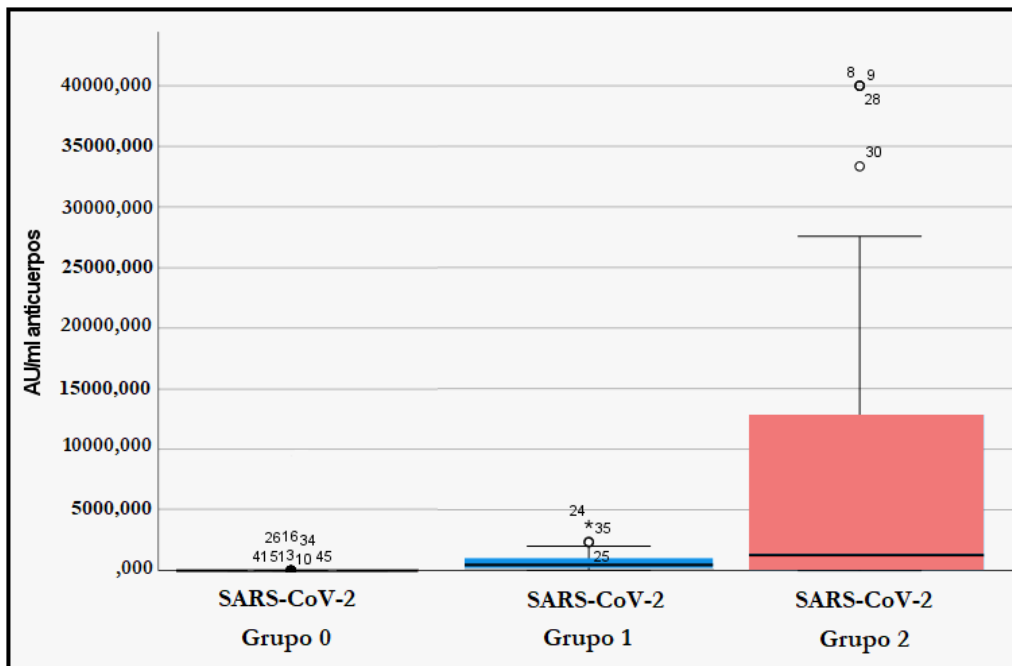


Figura 2. Títulos de IgG contra proteína S de SARS-CoV-2 en cada grupo, expresados en AU/ml. Grupo 0 corresponde al grupo control, grupo 1 a los casos leves y grupo 2 a los casos que sufrieron exitus.

Anticuerpos frente a HCoV y susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2

Con el objetivo de evaluar si haber pasado una infección por coronavirus endémicos protegía frente a la infección por SARS-CoV-2, se compararon los niveles de anticuerpos frente la proteína N de los HCoV en los casos y controles, con riesgo semejante de exposición (Tabla 2).

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgG contra coronavirus endémicos entre el grupo control y los pacientes que tuvieron COVID-19 leve.

Adicionalmente, se encontraron niveles positivos de anticuerpos reactivos contra proteína S de SARS-CoV-2 en suero de 35,7% de los participantes que no habían tenido COVID-19, teniendo 28,5% de ellos niveles iguales o superiores a 1 AU/ml. En contraste, todos los participantes que tuvieron COVID-19 leve tuvieron títulos mayores de 1 AU/ml.

Anticuerpos frente a HCoV y gravedad de COVID-19

Para determinar si los niveles de anticuerpos frente a HCoV limitaban la progresión de la COVID-19, se compararon los títulos en los pacientes con enfermedad leve o grave (Tabla 2). Los pacientes que tuvieron COVID-19 grave tuvieron niveles de anticuerpos reactivos contra NL63 significativamente mayores que los otros grupos, no habiendo diferencias respecto a los títulos de anticuerpos reactivos frente a HKU1, 229E y OC43. Se observó un gradiente en los niveles de anticuerpos frente a HCoV 229E, próximo a la significación estadística ($p=0,059$).

Anticuerpos frente a la proteína S de SARS-CoV-2 y gravedad de COVID-19

De manera llamativa, los pacientes que fallecieron como consecuencia de la COVID-19 tuvieron niveles significativamente más elevados de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 que los pacientes con enfermedad leve.

Correlación entre los niveles de anticuerpos frente a coronavirus.

Posteriormente, y para evaluar si pudiera existir alguna correlación entre el aumento de anticuerpos frente a las diferentes especies de coronavirus, se empleó la Rho de Spearman para analizarlo de manera conjunta en todos los participantes de los tres grupos (Tabla 3).

		NL63	HKU1	229E	OC43	SARS-CoV-2
NL63	Coeficiente de correlación	1	-0,26	0,185*	0,24	0,218*
	p	-	0,700	0,006	0,726	0,001
HKU1	Coeficiente de correlación		1	0,23	0,238*	0,109
	p		-	0,730	<0,001	0,107
229E	Coeficiente de correlación			1	0,101	0,117
	p			-	0,135	0,083
OC43	Coeficiente de correlación				1	0,97
	p				-	0,152
SARS-CoV-2	Coeficiente de correlación					1
	p					-

TABLA 3. Coeficiente de correlación de Spearman para los títulos de IgG contra proteína N de cada coronavirus endémico y contra proteína S de SARS-CoV-2 en todos los participantes, y significancia estadística (p). Se destacan con asterisco las relaciones estadísticamente significativas.

Los resultados mostraron una correlación positiva débil entre los *Alphacoronavirus* (NL63 y 229E) y entre los *Betacoronavirus* endémicos (HKU1 y OC43). Adicionalmente, se halló una correlación positiva débil entre anticuerpos reactivos a SARS-CoV-2 y los reactivos a NL63.

DISCUSIÓN

Respuesta inmunológica en pacientes sin contacto con SARS-CoV-2

El hallazgo de la presencia de anticuerpos con reactividad a coronavirus endémicos en grupo control es coherente con los estudios realizados hasta la fecha ^{18,19,20}. Las infecciones por coronavirus endémicos tienen una alta incidencia, especialmente en la población infantil donde los agentes etiológicos más frecuentes son OC43 y NL63^{21,22}. Se ha estimado que la reinfección por un mismo microorganismo sucede aproximadamente cada 12 meses²³, lo cual sugiere que sería probable encontrar niveles elevados de anticuerpos reactivos contra éstos en la población al tomar una muestra en cualquier momento determinado (especialmente durante invierno por su estacionalidad). La respuesta inmune humoral detectada en esos casos sería entonces insuficiente para proteger de las reinfecciones de por vida, ya sea porque disminuye con el tiempo o porque no tiene capacidad neutralizante.

Por otro lado, aunque la respuesta ha sido baja, 28,5% de los pacientes que no habían tenido COVID-19 presentaron valores superiores a 1 AU/ml de IgG reactiva contra proteína S de SARS-CoV-2, lo cual sugiere la existencia de reactividad cruzada humoral, que podría deberse a la homología que existe en ciertas regiones de esta proteína entre los distintos coronavirus^{5,6}, siendo mayor en la subunidad S2 y menor en la subunidad S1 y RBD. Esto concuerda con los hallazgos encontrados en la mayoría de los estudios^{18,19,20,24}, en los que se ha encontrado reactividad contra proteína S, subunidad S2 y proteína N de SARS-CoV-2 en suero de pacientes que no habían tenido contacto con el virus, aunque no tenían capacidad neutralizante/protectora. En esos estudios¹⁸, no se describieron diferencias en los títulos de anticuerpos con reactividad cruzada según edad, lo cual sugiere que un mayor número de resfriados en la infancia no sería un factor protector, al no tener tampoco capacidad neutralizante¹⁹. Sin embargo, en otros estudios si se han encontrado superiores niveles de anticuerpos en pacientes mayores de 65 años mayores que en menores de 25 años²⁵, por lo que la mayor severidad de su clínica podría ser debida a una respuesta inmunológica mayor, pero insuficiente para combatir una mayor carga viral.

Además de reactividad cruzada humoral también se ha descrito, en suero de personas que no han tenido contacto con SARS-CoV-2, la existencia de respuesta celular de linfocitos T CD4+ contra antígenos de SARS-CoV-2²⁶⁻³⁵. La mayoría de los epítomos reconocidos

por esos linfocitos T CD4+ se han encontrado dentro de la proteína S, sobre todo contra aquellos localizados en su extremo C terminal (donde se ubica S2, que comparte más homología con coronavirus endémicos que el extremo N terminal donde se ubica la subunidad S1)²⁷, llegando a identificarse reactividad contra RBD en un 11% de ellos²⁶. Al estudiar el fenotipo de esos linfocitos T CD4+, encontramos que son mayoritariamente linfocitos T memoria efectores (CD45RA -, CCR7 -) y memoria central (CD4RA - y CCR7+)²⁶, lo cual apoya que se trate de inmunidad cruzada originada inicialmente contra algún coronavirus endémico.

En algunos casos, se ha descrito la formación de una respuesta de linfocitos T contra proteínas S1, S2, M y N de SARS-CoV-2 sin seroconversión³⁰. Este fenómeno se ha descrito previamente tras exposiciones ocupacionales e infección subclínica por virus de la hepatitis C³⁶, y podría deberse en esos casos a una baja carga viral que no estimule una formación suficiente de anticuerpos para ser detectada, pero si la respuesta celular.

Respuesta inmunológica en pacientes con COVID-19 leve

La ausencia de diferencias en los títulos de IgG contra coronavirus endémicos entre los pacientes que habían pasado COVID-19 leve frente a los que no lo habían pasado sugiere que estos anticuerpos dirigidos contra la proteína S no serían protectores, ya que de ser así esperaríamos encontrar valores superiores en los participantes que no han tenido infección. Del mismo modo, aunque no fueran protectores, esperaríamos encontrar niveles mayores de IgG contra coronavirus endémicos en el grupo de pacientes que han tenido COVID-19 si los anticuerpos neoformados contra SARS-CoV-2 tuvieran reactividad cruzada contra ellos. Sin embargo, esto no ha sido así, lo cual podría explicarse por un lado porque los niveles de IgG reactivos contra coronavirus endémicos sean los que se encuentran habitualmente en la población y no hubiera reactividad cruzada, o porque hubiera reactividad cruzada leve que no fuera capaz de dar diferencias significativas.

Otra posible explicación sería que los títulos de IgG frente a SARS-CoV-2 hubieran descendido durante los 4 meses desde el inicio de la infección hasta la toma de las muestras. Si ese fuera el caso, los títulos de anticuerpos contra SARS-CoV-2 serían mayores a los objetivados en el estudio, y explicaría también por qué en los pacientes con COVID-19 grave los niveles de anticuerpos son mayores, al haberse tomado estas muestras durante el curso de la infección.

Al estudiarse la duración de la respuesta inmunológica formada tras la infección por SARS-CoV-2, se ha estimado que los títulos IgG contra su proteína S podrían mantenerse estables durante más de 6 meses, con un porcentaje de seropositivos en ese momento del 90% y una semivida de 140 días aproximadamente^{37,38,39}. Además, en estudios comparando la respuesta inmunitaria entre casos leves y graves de COVID-19¹⁷, se ha objetivado una respuesta inmunitaria de menor intensidad en los casos leves que en los casos más severos. Por todo ello, no podríamos afirmar que la disminución en los títulos de anticuerpos con el tiempo pudiera explicar las diferencias encontradas entre los grupos, ya que podrían deberse simplemente a una menor respuesta inmunitaria en general en casos leves. En contraste, los anticuerpos IgG dirigidos contra su proteína N podrían detectarse tan tardíamente como a los 106 días, con una semivida de aproximadamente 68 días³⁷, aunque otros estudios³⁸ determinaron que los títulos se podrían mantener hasta decaer tras alrededor de 6 meses.

Empleando citometría de flujo, se ha estudiado la respuesta inmune de células B memoria contra S o RBD, encontrándose que sus niveles aumentan desde el primer mes tras la infección hasta el sexto mes^{37,38}. Durante ese tiempo, podría suceder una maduración en la afinidad contra los antígenos virales a través de hipermutación somática, lo cual mejoraría la potencia de la acción humoral y la resistencia frente a mutaciones de RBD³⁸. Como la duración de la IgG es aproximadamente de 21 días³⁷, esta respuesta inmunitaria de memoria mantendría la formación de anticuerpos al menos durante el periodo de tiempo estudiado, revelando una evolución de la respuesta humoral tras el final de la infección.

La proteína S, y especialmente el dominio RBD son altamente específicas de SARS-CoV-2^{6,9}, y anticuerpos dirigidos contra epítomos de estas regiones encontrados en suero de pacientes convalecientes de COVID-19 han demostrado tener capacidad neutralizante⁴⁰. De igual manera, se ha evidenciado protección cruzada contra SARS-CoV-2 en suero de pacientes que habían tenido infección por SARS-CoV-1^{19,41}, lo que podría ser explicado por la alta homología en su proteína S y RBD entre ambos virus, que hace que compartan la misma diana celular, ECA-2^{8,9}. A pesar de su gran homología, el RBD de SARS-CoV-2 se diferencia en varios aminoácidos del RBD de SARS-CoV-1, de manera que la terapéutica desarrollada contra SARS-CoV-1 no funciona de manera eficiente contra el nuevo coronavirus⁶ y sería necesario desarrollar nuevas terapias. La alta especificidad de la respuesta formada contra proteína S y RBD y su capacidad neutralizante hacen que

esos componentes virales sean actualmente la diana terapéutica más prometedora, empleada en las vacunas comercializadas y en la formación de cocktails terapéuticos formados por anticuerpos policlonales con especificidad contra RBD⁴²⁻⁴⁴. El empleo de distintos anticuerpos dirigidos contra esos antígenos dificulta el escape viral a la respuesta inmunológica por mutaciones en sus epítomos.

Es mayoritariamente contra epítomos de la proteína S contra los que en otros estudios se ha detectado, en pacientes que han pasado COVID-19, el desarrollo de una respuesta específica de linfocitos T CD4+ y CD8+^{26-31,45}. Al comparar esta respuesta con la de suero de pacientes no expuestos, se observó que las respuestas CD4+ contra antígenos específicos de SARS-CoV-2 eran mayores entre los que habían pasado COVID-19, por lo cual se estimó que era poco probable un efecto Hoskins debido a la inmunidad preformada contra coronavirus endémicos²⁶. La respuesta de linfocitos T podría iniciarse de manera temprana en la infección, e incrementarse con el tiempo³¹, de manera que se ha estimado que la respuesta inicial CD4+ y CD8+ específica contra SARS-CoV-2 podría detectarse hasta 3-5 meses tras la infección, momento a partir del cual podría declinar³⁷.

Estos estudios muestran que la respuesta inmunitaria formada contra SARS-CoV-2 no es solamente humoral y centra su acción protectora mayoritariamente sobre la proteína S, altamente específica de SARS-CoV-2, por lo que la reactividad cruzada formada sobre proteína S de los coronavirus endémicos no tendría la misma capacidad neutralizante a nivel humoral o celular. Además, anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 se han mostrado suficientes para ofrecer protección ante el virus en modelos animales⁴⁶, por lo que la respuesta humoral podría ser protectora independientemente de la celular. Esto es especialmente importante si se tiene en cuenta que uno de los mecanismos patogénicos descritos en la COVID-19 es el establecimiento de linfopenia⁴⁷. Una posible explicación de ese fenómeno es que al presentar ECA-2 en su membrana, SARS-CoV-2 podría infectar a linfocitos y macrófagos, afectando y causando atrofia en órganos linfáticos⁴⁸.

Diferencias en la respuesta inmunológica según gravedad de COVID-19

La cuantitativamente mayor respuesta humoral frente a SARS-CoV-2 en el grupo de pacientes con COVID-19 grave contrasta con el concepto de inmunidad protectora que se les había atribuido a los anticuerpos formados contra SARS-CoV-2. Es posible por tanto que en pacientes con COVID-19 leve se desarrolle de manera paralela otro tipo de respuesta inmune, por ejemplo, celular, que fuera protectora. De igual manera, puede que

los hallazgos encontrados se deban solamente a que en pacientes graves la muestra de suero se obtuvo durante el curso de la infección cuando la respuesta inmune se acababa de formar, al contrario que en los pacientes con COVID-19 leve que fueron reclutados 4 meses después de la infección. Otra posible explicación sería el distinto patrón de respuesta inmune que tiene lugar en los casos más severos, en el que mayor expresión de citoquinas e inflamación no solo no se asocia a protección, sino que se relaciona con la propia fisiopatología de la infección. Por último, al no estar estos pacientes emparejados con el resto de los grupos, no es posible atribuir las diferencias en los valores de anticuerpos a la severidad, siendo necesario valorar factores como la edad u otras comorbilidades como causantes de ello.

Otros estudios que han investigado las diferencias en la respuesta inmune entre casos leves y graves han encontrado que niveles altos de IgG contra proteína N tenían más riesgo de complicaciones e ingreso en UCI, ya que podrían, al no tener capacidad neutralizante pero sí de reconocimiento y unión, facilitar al virus la entrada en las células inmunes en un proceso conocido como amplificación de la infección dependiente de anticuerpos, que ha sido descrito previamente en el virus del dengue⁴⁹. Es posible que un alto número de anticuerpos dirigidos contra la proteína S, pero que no fueran neutralizantes, pudiera ocasionar el mismo fenómeno. Además de ello, es posible que el establecimiento de una respuesta inmune celular y humoral específica pero no coordinada contra SARS-CoV-2 no sea capaz de establecer una protección efectiva⁵⁰, causando daño adicional al estimularse excesivamente la acción inflamatoria. Se ha descrito que la respuesta T a la infección puede tardar entre 7-10 días en formarse y expandirse, que es el mismo tiempo que los pacientes tardan en recuperarse de la infección o tener complicaciones, lo que sugeriría un papel activo de la respuesta inmunológica en la modulación de la severidad.

La elevación temprana de citoquinas al comienzo de la infección se ha asociado también a mayor gravedad. Como comentamos previamente, en pacientes con clínica moderada se ha descrito¹⁷ un aumento de citoquinas con patrón inmunológico tipo 1 (linfocitos Th1, CD8+, NK) y tipo 3 (linfocitos Th17, IL-17, IL22), que posteriormente se ha reducido progresivamente a medida que evolucionaba el cuadro. En contraste, los pacientes con clínica severa mantuvieron esas respuestas y además presentaron un incremento de citoquinas con patrón inmunológico tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-13, aumento de IgE y acción de mastocitos, eosinófilos y basófilos). En ese mismo estudio también se describió que

un aumento de IFN- α , IFN- γ , IL-1RA y citoquinas asociadas con el reclutamiento de monocitos y células T como CCL1, CCL2, M-CSF, IL-2, IL-16 y CCL12 durante los 12 primeros días del inicio de la infección se asoció con mayor severidad y mortalidad.

Estos hallazgos muestran que la presencia de una actividad inmunitaria cuantitativamente superior no se asociaría necesariamente a protección o menor severidad de la infección por SARS-CoV-2, lo que sugiere que una respuesta inmunológica descoordinada y desadaptada tendría un papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad, y sería una explicación plausible a las diferencias descritas.

Correlación entre IgG contra proteína S de SARS-CoV-2 y proteína N de NL63

Al examinar la relación que tienen los títulos de anticuerpos contra cada coronavirus en cada paciente, encontramos que existe una correlación positiva, aunque débil, entre los anticuerpos reactivos a *Betacoronavirus* endémicos (HKU1 y NL63) y entre los *Alphacoronavirus* (OC43 y 229E). Estos hallazgos podrían explicarse por la gran homología de su estructura proteica, que favorece que anticuerpos formados contra uno de ellos reaccionen al encontrarse con un coronavirus del mismo género. Sin embargo, la única correlación que se ha encontrado con SARS-CoV-2 ha sido con el *Alphacoronavirus* NL63, lo cual contrasta con los resultados de otros estudios¹⁸ que han encontrado una correlación en los títulos de IgG reactiva a proteína S de SARS-CoV-2 con el *Betacoronavirus* OC43.

Una posible explicación para esta diferencia sería que, ya que tanto SARS-CoV-2 como NL63 reconocen ECA-2 como su diana celular, podría haber cierta similitud en su proteína S que favoreciese un reconocimiento de NL63 por anticuerpos contra SARS-CoV-2. El mismo fenómeno, como se ha descrito anteriormente, ha sucedido entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1, que también comparten su diana^{19,41}. También podría ser posible una infección reciente o coinfección por NL63 en el momento de tomar la muestra, ya que, dentro de todos los coronavirus endémicos, es uno de los que más incidencia tienen. Esta correlación ha sido más frecuente entre los pacientes que tuvieron COVID-19 grave, por lo es posible que este fenómeno solo suceda cuando la respuesta inmunitaria está más desarrollada.

Este hallazgo, el hecho de que empleen la misma diana celular a pesar de las diferencias en la conformación de sus proteínas, y otras similitudes entre SARS-CoV-2 y NL63 deberán ser tenidas en cuenta y valoradas en futuros estudios sobre reactividad cruzada humoral entre los distintos coronavirus.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que existe inmunidad cruzada contra SARS-CoV-2 por parte de anticuerpos formados por infección por coronavirus endémicos, cuyos niveles se encuentran habitualmente elevados por la alta incidencia de las infecciones por estos virus. Sin embargo, no parece ser una respuesta protectora ni asociarse a menor gravedad clínica, quizás por evaluar la reactividad a la proteína S, y no específicamente a RBD, donde se ha demostrado más capacidad neutralizante en pacientes convalecientes de COVID-19. Las diferencias en la respuesta inmunológica humoral específica contra SARS-CoV-2 formada en el curso de la infección, con mayores niveles de anticuerpos en los casos más graves, puede ser un factor en sí que se asocie a peor evolución clínica en esos casos. La diferencia de intensidad y patrón inmunológico observada en otros estudios en el caso de infecciones graves sugiere que una respuesta inmunológica desadaptada pudiera tomar parte en la fisiopatología de la infección, agravándola.

En futuros estudios, sería necesario evaluar el comportamiento de la reactividad humoral cruzada de manera más específica contra RBD en suero de pacientes que no han tenido COVID-19, ya que la respuesta inmunológica ante estas regiones proteicas si se ha asociado a protección, al menos en suero de pacientes convalecientes. Además, otros estudios para caracterizar mejor la respuesta inmunológica que sucede en casos graves y el mecanismo fisiopatológico con el que podría empeorar la clínica podrían esclarecer los motivos de la heterogeneidad clínica.

Las principales limitaciones de este estudio fueron que, al tratarse de un estudio longitudinal, no se pudo evaluar la evolución de la respuesta humoral, no pudiendo estudiar la causalidad. El grupo de casos graves no se apareó con el resto de participantes, por lo que las diferencias no se pueden atribuir a la diferencia de gravedad en la clínica, al no haber tenido en cuenta posibles factores de confusión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2021 May 12];323(11):1061–9. Available from: [/pmc/articles/PMC7042881/](#)
2. Haehner A, Draf J, Dräger S, De With K, Hummel T. Predictive Value of Sudden Olfactory Loss in the Diagnosis of COVID-19. *ORL* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 May 24];82(4):175–80. Available from: [/pmc/articles/PMC7360503/](#)
3. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siaty DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* [Internet]. 2020 Aug 6 [cited 2021 May 24];277(8):2251–61. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00405-020-05965-1>
4. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 May 24];77(6):683–90. Available from: [/pmc/articles/PMC7149362/](#)
5. Li X, Luk HKH, Lau SKP, Woo PCY. Human Coronaviruses: General Features [Internet]. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier Inc.; 2019. 1–6 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95704-0>
6. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. Vol. 1866, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V.; 2020. p. 165878.
7. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):155–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

8. Kaur N, Singh R, Dar Z, Bijarnia RK, Dhingra N, Kaur T. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2 [Internet]. Vol. 89, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V.; 2021 [cited 2021 May 18]. p. 104490. Available from: [/pmc/articles/PMC7395230/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/395230/)
9. Xu J, Zhao S, Teng T, Abdalla AE, Zhu W, Xie L, et al. Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses* [Internet]. 2020 Feb 22 [cited 2021 May 15];12(2):244. Available from: www.mdpi.com/journal/viruses
10. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2021 May 15];181(2):271-280.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
11. Vitiello A, Ferrara F. Therapeutic Strategies for SARS-CoV-2 acting on ACE-2 [Internet]. Vol. 156, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V.; 2021 [cited 2021 May 12]. p. 105579. Available from: [/pmc/articles/PMC7526529/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37526529/)
12. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020 Apr 1;176:104742.
13. Johnson BA, Xie X, Kalveram B, Lokugamage KG, Muruato A, Zou J, et al. Furin cleavage site is key to SARS-CoV-2 pathogenesis [Internet]. *bioRxiv*. bioRxiv; 2020 [cited 2021 May 15]. p. 2020.08.26.268854. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268854>

14. Zimmermann P, Curtis N. Coronavirus infections in children including COVID-19: An overview of the epidemiology, clinical features, diagnosis, treatment and prevention options in children [Internet]. *Pediatric Infectious Disease Journal*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020 [cited 2021 May 24]. p. 355–68. Available from: https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2020/05000/Coronavirus_Infections_in_Children_Including.1.aspx
15. Ejaz H, Alsrhani A, Zafar A, Javed H, Junaid K, Abdalla AE, et al. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. Vol. 13, *Journal of Infection and Public Health*. Elsevier Ltd; 2020. p. 1833–9.
16. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Patidar R, Younis K, Desai P, et al. Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. *SN Compr Clin Med* [Internet]. 2020 Aug [cited 2021 May 24];2(8):1069–76. Available from: </pmc/articles/PMC7314621/>
17. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2021 May 15];584(7821):463–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>
18. Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, Arevalo CP, Bolton MJ, Weirick ME, et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. *Cell* [Internet]. 2021;184(7):1858-1864.e10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.010>
19. Miyara M, Sterlin D, Anna F, Marot S, Mathian A, Atif M, et al. Pre-COVID-19 humoral immunity to common coronaviruses does not confer cross-protection against SARS-CoV-2 [Internet]. medRxiv. medRxiv; 2020 [cited 2021 May 24]. p. 2020.08.14.20173393. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.20173393>
20. Sagar M, Reifler K, Rossi M, Miller NS, Sinha P, White LF, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 Jan 4 [cited 2021 May 24];131(1). Available from: </pmc/articles/PMC7773342/>

21. Dijkman R, Jebbink MF, Gaunt E, Rossen JWA, Templeton KE, Kuijpers TW, et al. The dominance of human coronavirus OC43 and NL63 infections in infants. *J Clin Virol* [Internet]. 2012;53(2):135–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.011>
22. Nickbakhsh S, Nickbakhsh S, Ho A, Marques DFP, McMenamin J, Gunson RN, et al. Epidemiology of Seasonal Coronaviruses: Establishing the Context for the Emergence of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis* [Internet]. 2020 Jun 16 [cited 2021 May 23];222(1):17–25. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/222/1/17/5820656>
23. Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* [Internet]. 2020;26(11):1691–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-1083-1>
24. Khan S, Nakajima R, Jain A, de Assis RR, Jasinskas A, Obiero JM, et al. Analysis of serologic cross-reactivity between common human coronaviruses and SARS-CoV-2 using coronavirus antigen microarray [Internet]. *bioRxiv*. bioRxiv; 2020 [cited 2021 May 24]. p. 2020.03.24.006544. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.006544>
25. Wu J, Liang B, Chen C, Wang H, Fang Y, Shen S, et al. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2021 May 21];12(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22034-1>
26. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2021 May 24];370(6512):89. Available from: </pmc/articles/PMC7574914/>
27. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020;587(7833):270–4.

28. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15.
29. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* [Internet]. 2020;584(7821):457–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
30. Gallais F, Velay A, Nazon C, Wendling MJ, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without Seroconversion, France. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 May 24];27(1):113–21. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2701.203611>
31. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol*. 2020;5(48):1–14.
32. Bert N Le, Tan A, Kunasegaran K, Tham C, Hafezi M, Chia A, et al. Different pattern of pre-existing SARS-COV-2 specific T cell immunity in SARS-recovered and uninfected individuals. *bioRxiv* [Internet]. 2020 May 27 [cited 2021 May 23];2020.05.26.115832. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.05.26.115832>
33. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. Presence of SARS-CoV-2-reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors [Internet]. *medRxiv*. medRxiv; 2020 [cited 2021 May 23]. p. 2020.04.17.20061440. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440>
34. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Single-cell transcriptomic analysis of SARS-CoV-2 reactive CD4 + T cells. *bioRxiv* [Internet]. 2020 Jun 13 [cited 2021 May 23];2020.06.12.148916. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.12.148916v1>

35. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype of SARS-CoV-2-specific T-cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome [Internet]. medRxiv. medRxiv; 2020 [cited 2021 May 23]. p. 2020.04.11.20062349. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.20062349>
36. Heller T, Werner JM, Rahman F, Mizukoshi E, Sobao Y, Gordon AM, et al. Occupational exposure to hepatitis C virus: Early T-cell responses in the absence of seroconversion in a longitudinal cohort study. *J Infect Dis* [Internet]. 2013 Sep 15 [cited 2021 May 24];208(6):1020–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23801608/>
37. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 May 12];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
38. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* [Internet]. 2021 Mar 25 [cited 2021 May 12];591(7851):639–44. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>
39. Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications [Internet]. medRxiv. medRxiv; 2020 [cited 2021 May 12]. p. 2020.03.30.20047365. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
40. Kreer C, Zehner M, Weber T, Ercanoglu MS, Gieselmann L, Rohde C, et al. Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. *Cell* [Internet]. 2020;182(4):843-854.e12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.044>

41. Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Snitselaar JL, Aldon Y, Bangaru S, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Aug 7 [cited 2021 May 12];369(6504):643–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32540902/>
42. Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Aug 21 [cited 2021 May 12];369(6506):1014–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32540904/>
43. Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Aug 21 [cited 2021 May 12];369(6506):1010–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32540901/>
44. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development [Internet]. Vol. 586, *Nature*. Nature Research; 2020 [cited 2021 May 24]. p. 516–27. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
45. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 May 24];21(11):1336–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32887977/>
46. Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He WT, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Aug 21 [cited 2021 May 24];369(6506):956–63. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
47. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):1–8.

48. Feng Z, Diao B, Wang R, Wang G, Wang C, Tan Y, et al. The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) directly decimates human spleens and lymph nodes [Internet]. medRxiv. medRxiv; 2020 [cited 2021 May 24]. p. 2020.03.27.20045427. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045427>
49. Batra M, Tian R, Zhang C, Clarence E, Sacher CS, Miranda JN, et al. Role of IgG against N-protein of SARS-CoV2 in COVID19 clinical outcomes. Sci Rep [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2021 May 21];11(1):3455. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83108-0>
50. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. Cell [Internet]. 2020 Nov 12 [cited 2021 May 22];183(4):996-1012.e19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>

AGRADECIMIENTOS

Con especial dedicación y cariño al equipo del Hospital Ramón y Cajal por su trabajo y apoyo durante el estudio: Daniel Jiménez Navarro, Alejandro Mendieta Baro, Mario Rodríguez-Domínguez y Alfonso Muriel García. Al Dr. Santiago Moreno, por su tutelaje implicado desde el principio, gran actitud y disposición siempre abierta a discutir cualquier problema que tuviera.

A todos los buenos profesores que he tenido, por inspirarme y ser un modelo a seguir sobre lo que debería ser un buen médico y, sobre todo, una persona responsable y empática con los demás. A la Dra. de los Ríos, por motivarme para ser el mejor médico que puedo ser, y hacer del mundo un lugar mejor.

A mis padres, por el apoyo y ayuda incondicional que me han ofrecido toda mi vida y que me ha permitido llegar aquí.

A todos los investigadores de SARS-CoV-2, cuya dedicación ha disminuido el impacto de la pandemia y ha permitido el desarrollo de este trabajo.

Al personal sanitario y no sanitario que ha trabajado en medidas de prevención y tratamiento de la COVID-19, evitando la pérdida de millones de vidas humanas.

Autor: Alejandro Rivera Delgado

Tutor: Santiago Moreno Guillén

Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Servicio de Enfermedades Infecciosas del HURyC. Universidad de Alcalá

INTRODUCCIÓN

La pandemia por COVID-19 constituye una auténtica emergencia sanitaria y económica mundial. Aun así, todavía no se comprende completamente los mecanismos detrás de la heterogeneidad en su severidad clínica.

Se ha propuesto que la respuesta inmunológica contra la infección, en concreto la existencia de inmunidad cruzada humoral por anticuerpos formados previamente contra coronavirus endémicos causantes de catarros podría ser un factor importante a la hora de explicar estas diferencias.

El objetivo de este estudio es evaluar la existencia de esa inmunidad cruzada, y conocer si dicha respuesta pudiera ser protectora, o si se relacionase positiva o negativamente con la gravedad.

De igual manera, también se evaluará cuantitativamente la respuesta inmune humoral en pacientes con clínica severa y clínica más leve, para estimar su papel en la fisiopatología de la COVID-19.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 221 trabajadores sanitarios y no sanitarios del Hospital Ramón y Cajal, y se dividieron en tres grupos:

- Grupo 0/control (n=85): nunca tuvieron COVID-19.
- Grupo 1 (n=92): tuvieron COVID-19 leve.
- Grupo 2 (n=45): sufrieron exitus por COVID-19.

En cada participante se midió con ELISA indirecto los títulos de IgG reactivos contra proteína N de nucleocápside de los coronavirus NL63, HKU1, 229E, OC43, y contra proteína S de SARS-CoV-2.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 26.0. Se valoró la normalidad en la distribución de los datos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk según tamaño muestral. Para el contraste de hipótesis se empleó la U de Mann-Whitney, y para analizar la correlación entre títulos de anticuerpos para un coronavirus u otro, se empleó el Coeficiente de Correlación de Spearman.

El nivel de significancia estadística se consideró con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los títulos de IgG contra proteína N de coronavirus endémicos y proteína S de SARS-CoV-2 se muestran en la figura 1 y figura 2.

Al comparar las medianas de IgG en cada grupo, no se encontraron diferencias entre HKU1, 229E u OC43. El grupo 2 tenía títulos de NL63 y SARS-CoV-2 significativamente más altos que el resto de grupos, mientras que el grupo 1 tenía títulos contra SARS-CoV-2 más altos que el grupo control.

35,7% de los participantes del grupo control fueron seropositivos para SARS-CoV-2, con 28,5% de ellos teniendo títulos >1 AU/ml.

Los resultados mostraron una correlación positiva débil entre NL63 y 229E (0,185, $p=0,006$), entre HKU1 y OC43 (0,238, $p<0,001$), y entre SARS-CoV-2 y NL63 (0,218, $p=0,001$)

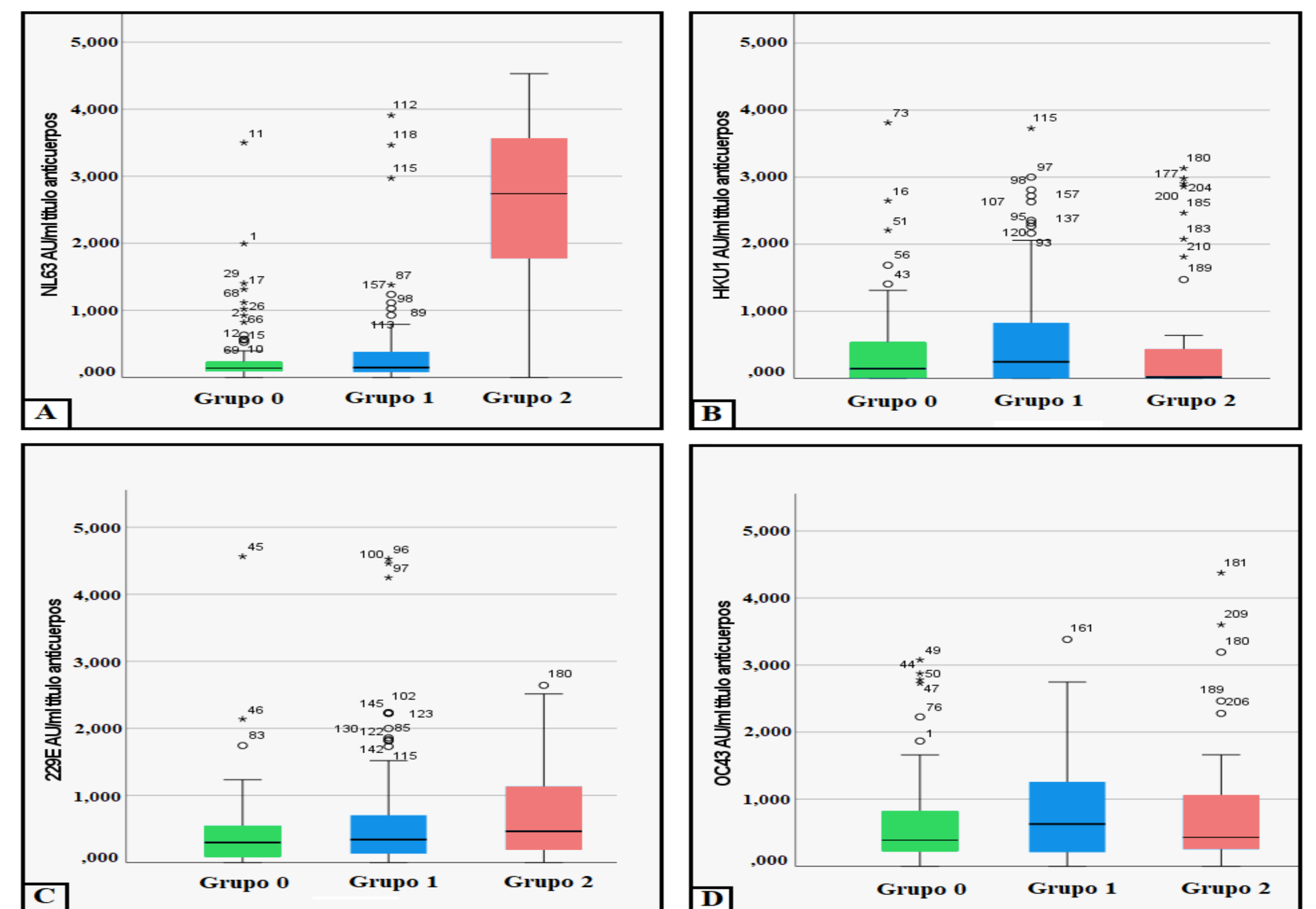


Figura 1. Títulos de IgG contra proteína N de los coronavirus endémicos en cada uno de los tres grupos, expresado en AU/ml. Grupo 0 corresponde al grupo control, grupo 1 a los casos leves y grupo 2 a los casos que sufrieron exitus. A. IgG contra NL63. B. IgG contra HKU1. C. IgG contra 229E. D. IgG contra OC43.

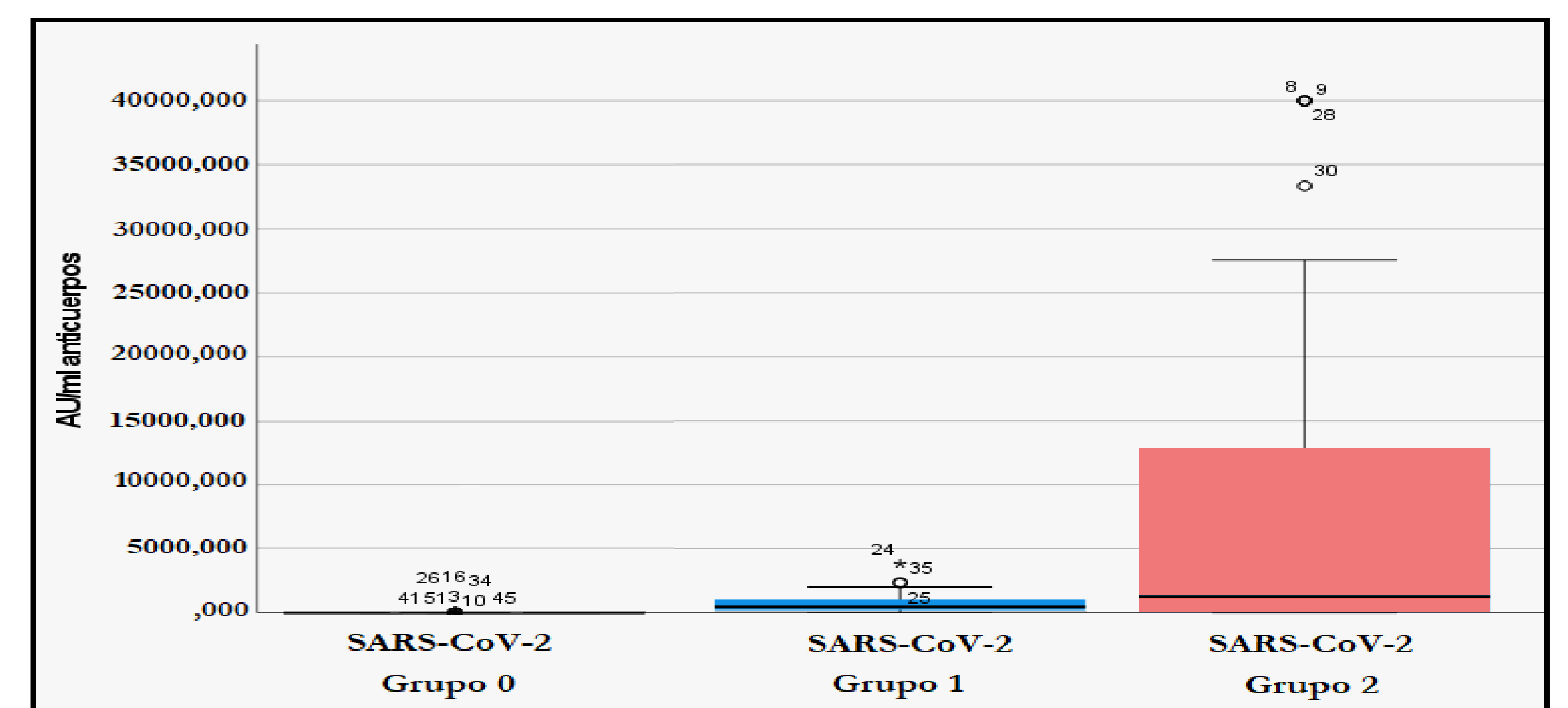


Figura 2. Títulos de IgG contra proteína S de SARS-CoV-2 en cada grupo, expresados en AU/ml. Grupo 0 corresponde al grupo control, grupo 1 a los casos leves y grupo 2 a los casos que sufrieron exitus.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La existencia de reactividad contra proteína S de SARS-CoV-2 en pacientes que no han tenido contacto con el virus, junto con los niveles elevados de IgG contra coronavirus endémicos, sugiere reactividad cruzada humoral de los anticuerpos formados durante una infección catarral estacional contra antígenos de SARS-CoV-2.

La ausencia de diferencias en los títulos de IgG reactivos a proteína N de coronavirus endémicos entre el grupo control, los casos leves y los casos graves sugiere que no protegen de la infección ni disminuyen la gravedad de la enfermedad. De manera llamativa, no obstante, los casos graves tuvieron títulos más elevados contra NL63.

Los niveles de anticuerpos más altos en casos graves que en casos leves pueden deberse a un patrón de respuesta inmunológica mayor, pero más descoordinado, en los casos de mayor severidad, que influiría negativamente en la evolución de la infección.

En conclusión, el estudio muestra que la infección previa por coronavirus endémicos circulantes no protege de la infección por SARS-CoV-2 ni disminuye la gravedad de la enfermedad, y que niveles más altos de anticuerpos contra SARS-CoV-2 no se asocian necesariamente a una clínica más leve.