

LAS CELULAS T CITOTÓXICAS Y LAS SECUELAS PULMONARES POST-COVID-19

Por Dr. Miguel Alfonso

INTRODUCCIÓN

Muchos pacientes que han debido ser hospitalizados por grave compromiso de su sistema respiratorio (generalmente por neumonía) como consecuencia de la infección de COVID-19, después de darle de alta, presentan secuelas pulmonares a largo plazo que, en algunos casos pueden ser mortales, pero aún se desconocen los mecanismos subyacentes o los procesos inmunitarios locales y sistémicos asociados a este cuadro clínico.

A medida que aumenta el número de este tipo de pacientes con síntomas que persisten después de la resolución de la enfermedad aguda (el llamado COVID-19 crónico), existe una necesidad urgente de identificar las características celulares, moleculares y fisiopatológicas de las secuelas pulmonares crónicas en convalecientes de COVID-19. Se han planteado dos posibles causas de estas secuelas respiratorias: la presencia del virus en un reservorio del pulmón o por los procesos celulares que han sido alterados

durante la infección.

En este artículo trataremos de las últimas evidencias que están surgiendo de la investigación, cuyos objetivos están relacionados con el esclarecimiento de los mecanismos específicos por los cuales se desarrolla la lesión pulmonar crónica, lo cual es esencial para el desarrollo de futuras intervenciones preventivas y / o terapéuticas para los síntomas crónicos de COVID-19. Hasta ahora, se está evidenciado que las células T CD8 (un tipo de glóbulo blanco), llamadas

también células T citotóxicas, están jugando un papel importante en la patología pulmonar post COVID-19. En este sentido, gran parte del contenido está basado en un artículo publicado recientemente (30 de septiembre) en la revista Science (Cheon y col. Science Immunol. 2021, DOI: 10.1126 / sciimmunol. abk174) cuyos resultados dan evidencias de lo afirmado previamente.

Haremos el esfuerzo de ser lo más claro posible, debido a que la información suministrada es altamente especializada y compleja, por lo cual usaremos un lenguaje acorde al público lector pero manteniendo la rigurosidad del conocimiento. Esto nos va a permitir que el contenido sea mejor comprendido, para un tema de suma importancia.

El principal determinante de los resultados clínicos en personas con infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es la edad, y la mayor parte de la morbilidad y la mortalidad ocurren en los ancianos [MC Polidori, H. Sies, L. Ferrucci, T. Benzing, Res. Rev. 67, 101308 (2021); X. Yang, y col. Lancet Respir. Med. 8, 475-481 (2020)] (Figura 1). Más allá de la morbilidad aguda inducida por la infección por SARS-CoV-2, los datos han demostrado que los pacientes con enfermedad aguda grave por COVID-19 tienen el mayor riesgo de desarrollar secuelas pulmonares crónicas y anomalías persistentes en las imágenes del tórax (X. Wu, y col.

Lancet Respir. Med. 9, 747-754 (2021); A. Nalbandian, y col. Nat. Med. 27, 601-615 (2021); YH Xu, y col. J. Infect. 80, 394-400 (2020)]. Sin embargo, los mecanismos que subyacen al desarrollo de secuelas pulmonares crónicas después de la infección aguda por SARS-CoV-2 siguen siendo esquivos.

A medida que ha avanzado la epidemia en estos dos años, ha aumentado el número de convalecientes con secuelas pulmonares, entre otras de igual, mayor o menor importancia clínica, por lo que existe una necesidad urgente de identificar las características celulares, moleculares y fisiopatológicas

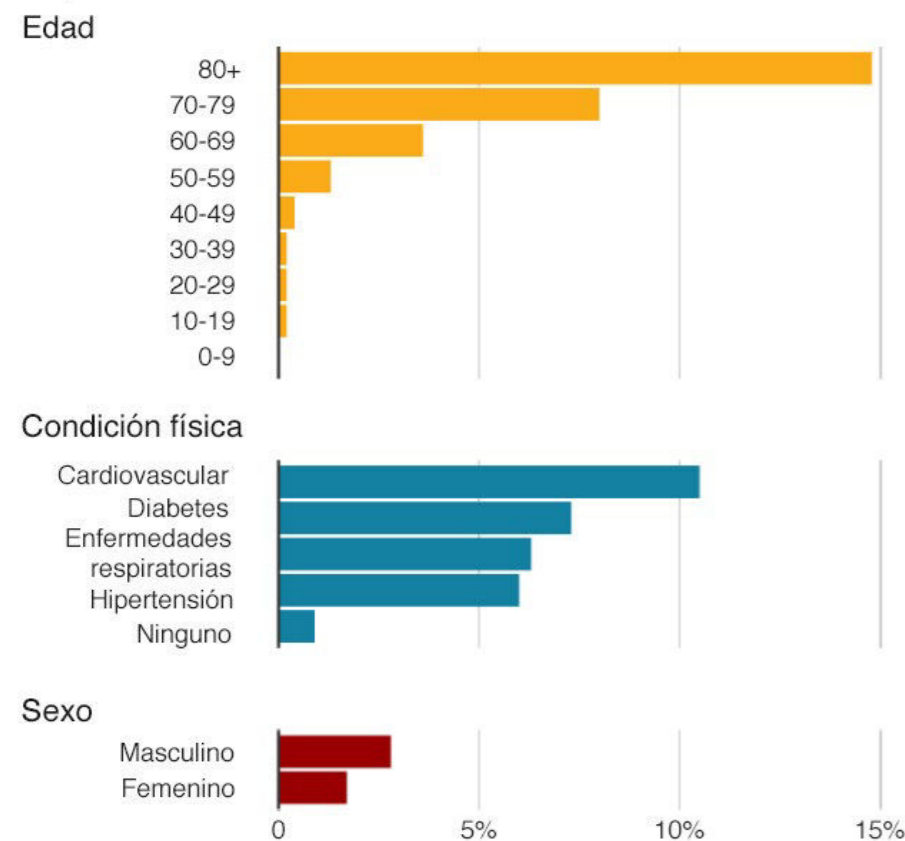
de las secuelas pulmonares crónicas en convalecientes de COVID-19. El esclarecimiento de los mecanismos específicos por los cuales se desarrolla la lesión pulmonar crónica es esencial para el desarrollo de futuras intervenciones preventivas y / o terapéuticas para los síntomas crónicos de COVID-19.

Las células T (Figura 2) y las células B (tipos de glóbulos blancos) pueden formar una memoria inmunológica de larga duración después de la eliminación de la infección viral primaria para proteger al hospedador de la reinfección del mismo virus o virus relacionados (NN Jarjour, D. Masopust, SC Jameson. Immunity 54, 14-18 (2021)]. Los linfocitos de memoria generalmente se dividen en células de *memoria circulantes* que patrullan el cuerpo y células de *memoria residentes* que residen en el tejido periférico no linfóide [NN Jarjour, D. Masopust, SC Jameson. Immunity 54, 14-18 (2021); SP Weisberg, BB Ural, DL Farber. Cell 184, 1517-1529 (2021)]. El tejido residente de células T (T RM) y células B (B

Figura 1. La tasa de mortalidad por la infección COVID-19 depende de la edad, de la salud y del sexo. A medida que se tenga mayor edad, aumenta el porcentaje de mortalidad en el paciente por el virus. Asimismo, si el paciente presenta una enfermedad crónica de base, aumenta la tasa, y en los hombres, se produce una mayor tasa con relación a la tasa en mujeres.

La tasa de mortalidad depende de la edad, salud y sexo

Proporción de fatalidad



Fuente: Centro Chino para el Control y Prevención de Enfermedades

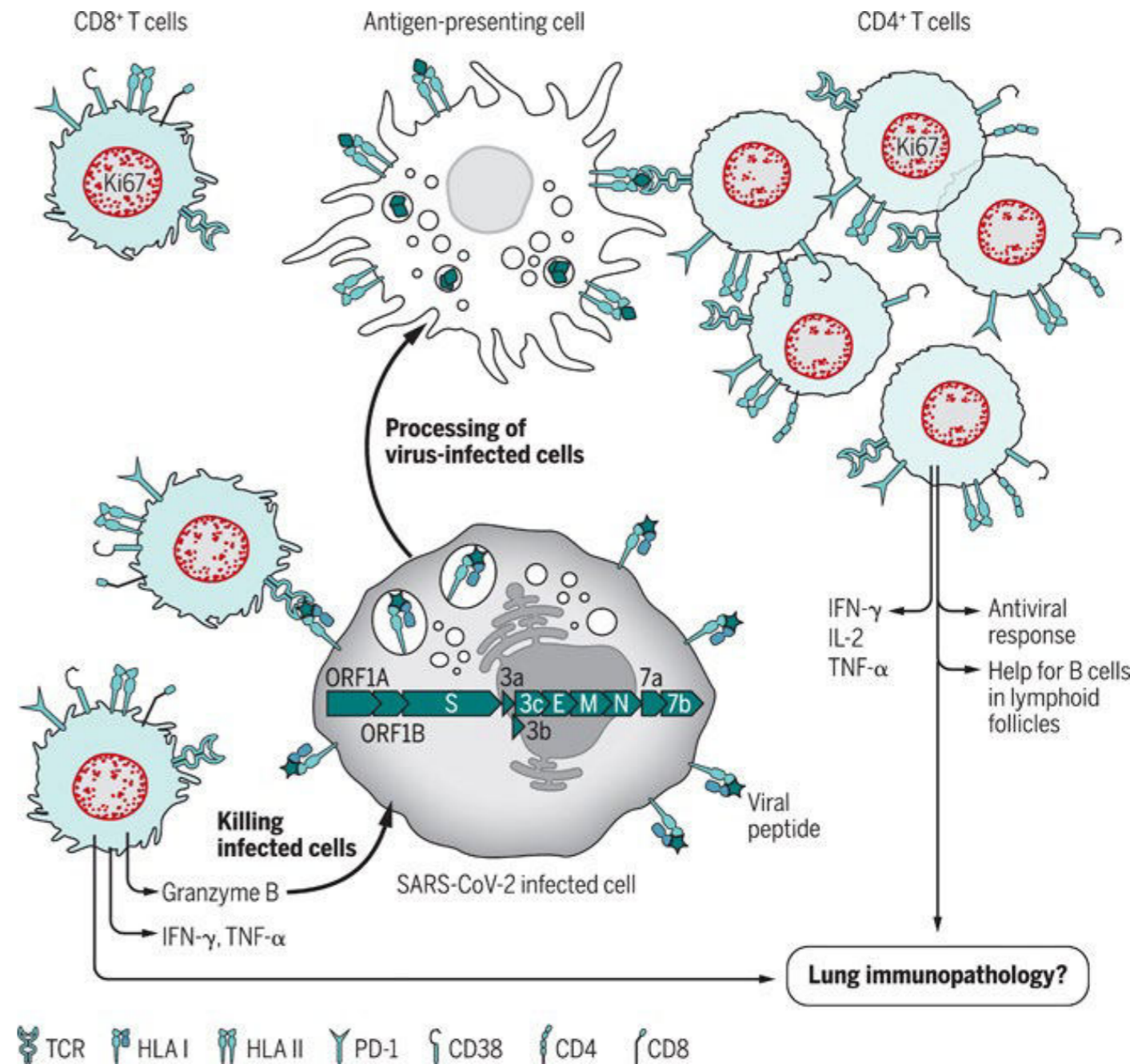


Figura 2. Efecto de las Interacciones hipotéticas entre células infectadas con SARS-CoV-2, células presentadoras de antígeno y células T CD4 y CD8. Los péptidos virales (que se muestran en verde oscuro) se procesarán de todas las partes del proteoma del SARS-CoV-2 y se presentarán al repertorio de TCR en los surcos de las moléculas de HLA I en la célula infectada y por las moléculas de HLA II de las células presentadoras de antígeno que han recogido restos de células infectadas. Las células CD4 reactivas al SARS-CoV-2 parecen ser en gran parte similares a TH1, que secretan IFN- γ , TNF- α e IL-2. Las células T CD8 pueden secretar un perfil de citocinas similar pero también lisar las células diana infectadas. Actualmente, no conocemos datos que indiquen claramente un papel de las células T CD4 o CD8 en la inmunopatología pulmonar, pero ilustran aquí la probabilidad hipotética de esto. Tomado de [Altmann, D. and Boyton, R. Science Immunol. (2020). Vol 5, 49. DOI: 10.1126 / sciimmunol.abd6160]

RM) que residen en el tracto respiratorio proporcionan alterados sus mecanismos en hospedadores de mayor edad [Z. Wang, S. y col. Sci. Immunol. 4, eaaw1217 (2019)] (Figura 3). Es de destacar que la evidencia ha sugerido que la memoria de las células B y T específicas de antígeno se forma y puede persistir en la

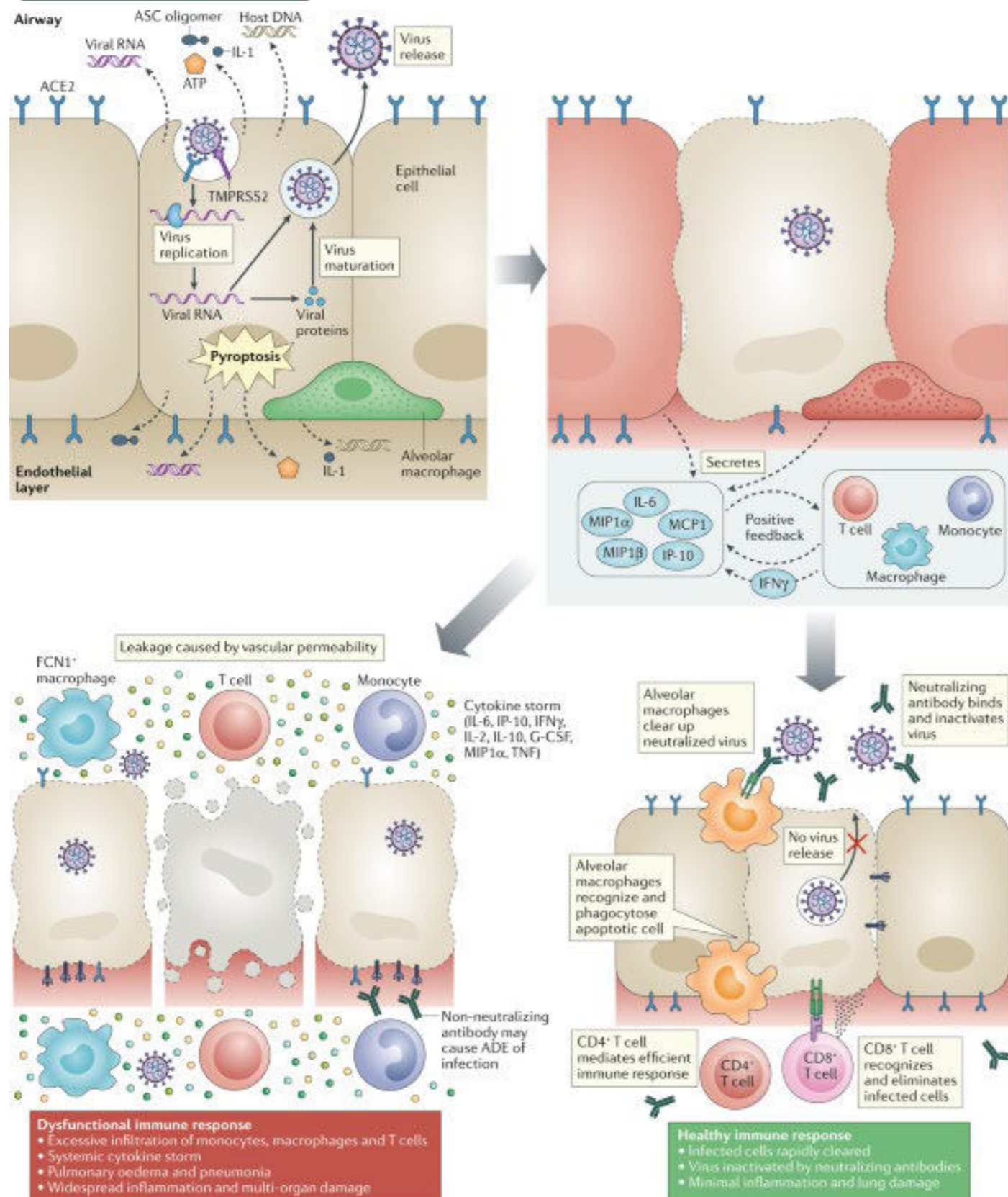


Figura 3. Cronología de eventos durante la infección de SARS-CoV-2. Cuando el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), el virus infecta las células que expresan los receptores de superficie de la enzima convertidora de angiotensina 2, denominados ACE2 y TMPRSS2, se activa la replicación del virus ocasionando que la célula hospedadora sufra muerte, llamada piroptosis y libere moléculas asociadas con daño, incluidos ATP, ácidos nucleicos y oligómeros ASC. Estos son reconocidos por las células epiteliales vecinas, las células endoteliales y los macrófagos alveolares, lo que desencadena la generación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (incluidas IL-6, IP-10, proteína inflamatoria de macrófagos 1α (MIP1α), MIP1β y MCP1). Estas proteínas atraen monocitos, macrófagos y células T al sitio de la infección, promoviendo una mayor inflamación (con la adición de IFNγ producido por las células T) y estableciendo un circuito de retroalimentación proinflamatorio. En una respuesta inmunitaria defectuosa (lado izquierdo), esto puede conducir a una mayor acumulación de células inmunitarias

en los pulmones, provocando una sobreproducción de citocinas proinflamatorias, que eventualmente dañan la infraestructura pulmonar. La tormenta de citocinas resultante circula a otros órganos, lo que provoca daños en múltiples órganos. Además, los anticuerpos no neutralizantes producidos por las células B pueden potenciar la infección por SARS-CoV-2 a través de la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE), exacerbando aún más el daño orgánico. Alternativamente, en una respuesta inmune saludable (lado derecho), la inflamación inicial atrae a las células T específicas del virus al sitio de la infección, donde pueden eliminar las células infectadas antes de que el virus se propague. Los anticuerpos neutralizantes en estos individuos pueden bloquear la infección viral, y los macrófagos alveolares reconocen virus neutralizados y células apoptóticas y los eliminan por fagocitosis. En conjunto, estos procesos conducen a la eliminación del virus y un daño pulmonar mínimo, lo que resulta en la recuperación. G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos; TNF, factor de necrosis tumoral. Tomado de [Tay, MZ, Poh, CM, Rénia, L. et al. *Nat Rev Immunol* 20, 363-374 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>]

circulación durante más de 6 meses después de la infección por SARS-CoV-2 [JM Dan, y col. *Science* 371 (2021); LB Rodda, y col. *Cell* 184, 169-183.e17 (2021)]. Sin embargo, las respuestas de memoria específicas de tejido en el tracto respiratorio no se han caracterizado previamente después de la infección por SARS-CoV-2.

Bajo este escenario, en la revista *Science* se publicó un estudio reciente (Cheon y col.

Science Immunol. 2021, DOI: 10.1126 / sciimmunol.abk174), cuyos autores describen la caracterización detallada de los perfiles inmunes circulantes (células del sistema inmunológico) y respiratorios y los parámetros funcionales y patológicos pulmonares cuantitativos en una cohorte de convalecientes COVID-19 de edad avanzada. Los resultados obtenidos sugieren que las respuestas inmunitarias pulmonares desreguladas, en particular las respuestas exuberantes de ciertos subconjuntos de células T CD8+ respiratorias pueden contribuir al desarrollo de secuelas pulmonares crónicas tras la resolución de la infección aguda por COVID-19 en personas de edad avanzada.

Se conoce que los hospedadores envejecidos desarrollan secuelas fibróticas e inflamatorias pulmonares crónicas después de una neumonía viral en un modelo animal [NP Goplen, y col. *Sci. Immunol.* 5, eabc4557 (2020)]. Con base a estos resultados previos, los autores del estudio plantearon la hipótesis de que los individuos de edad avanzada que sobreviven a una infección aguda por COVID-19 de moderada a grave pueden experimentar inflamación y fibrosis pulmonar persistente y deterioro de la función pulmonar. Con este fin, reclutaron una cohorte de personas sanas (controles) de

edad avanzada y convalecientes por COVID-19 (todos mayores de 60 años de edad) dados de alta del hospital y evaluados 60 a 90 días después del inicio de la infección por SARS-CoV-2 (Figura 4A y B). La mayoría de estos sujetos no estaban vacunados, de los cuales, hubo dos excepciones: uno en el control (CON) que completó dos dosis de vacuna de ARNm 4 semanas antes del procedimiento de broncoscopia, y uno en el grupo de convalecientes COVID-19 (CVD) que completó dos dosis de vacuna de ARNm una semana antes del procedimiento de broncoscopia. Ninguno de los convalecientes de COVID-19 albergaba el gen SARS-CoV-2 N1 en el líquido de lavado broncoalveolar (BAL). Tampoco había afecciones pulmonares preexistentes antes de la infección por SARS-CoV-2 en estos individuos, por lo que todas las anomalías detectadas en las pruebas de imagen o de función pulmonar probablemente se atribuyeron a la infección por SARS-CoV-2. Todos los convalecientes de COVID-19 tenían síntomas pulmonares y extrapulmonares persistentes en el momento de la inscripción en el estudio (Figura 4A), lo que sugiere que estaban experimentando secuelas posaguda de COVID-19 (PASC). Los investigadores obtuvieron BAL y de sangre de estos individuos y realizaron diversos análisis celulares mediante una técnica

denominada citometría de flujo espectral de alta dimensión y la técnica de secuenciación de ARN unicelular (scRNA-seq) en BAL y células inmunitarias sanguíneas. También realizaron pruebas de función pulmonar (espirometría y capacidad de difusión pulmonar) y tomografía computarizada cuantitativa (TC) utilizando la técnica automatizada de Informática Pulmonar Asistida por Computador para Evaluación y Calificación de Patología (CALIPER) (Figura 4C).

Los pulmones de los convalecientes de COVID-19 de edad avanzada mostraron características de imagen heterogéneas que sugerían inflamación y fibrosis en curso. Mientras que un par de personas se recuperaron casi por completo de la infección (CVD recuperado), la mayoría de los pacientes (> 70 %) presentaron anomalías en la capacidad pulmonar total, TC de moderadas (CVD moderadas) a graves (CVD graves) (regiones amarilla y naranja, Figura 4C) y función pulmonar deteriorada más de dos meses después del alta hospitalaria (Figura 4B). Los parámetros de función pulmonar fueron anormales en varios de la cohorte de COVID-19, con evidencia fisiológica de una anomalía restrictiva del parénquima pulmonar (TLC reducida (capacidad pulmonar total) y FVC (capacidad vital forzada) evidente en varios

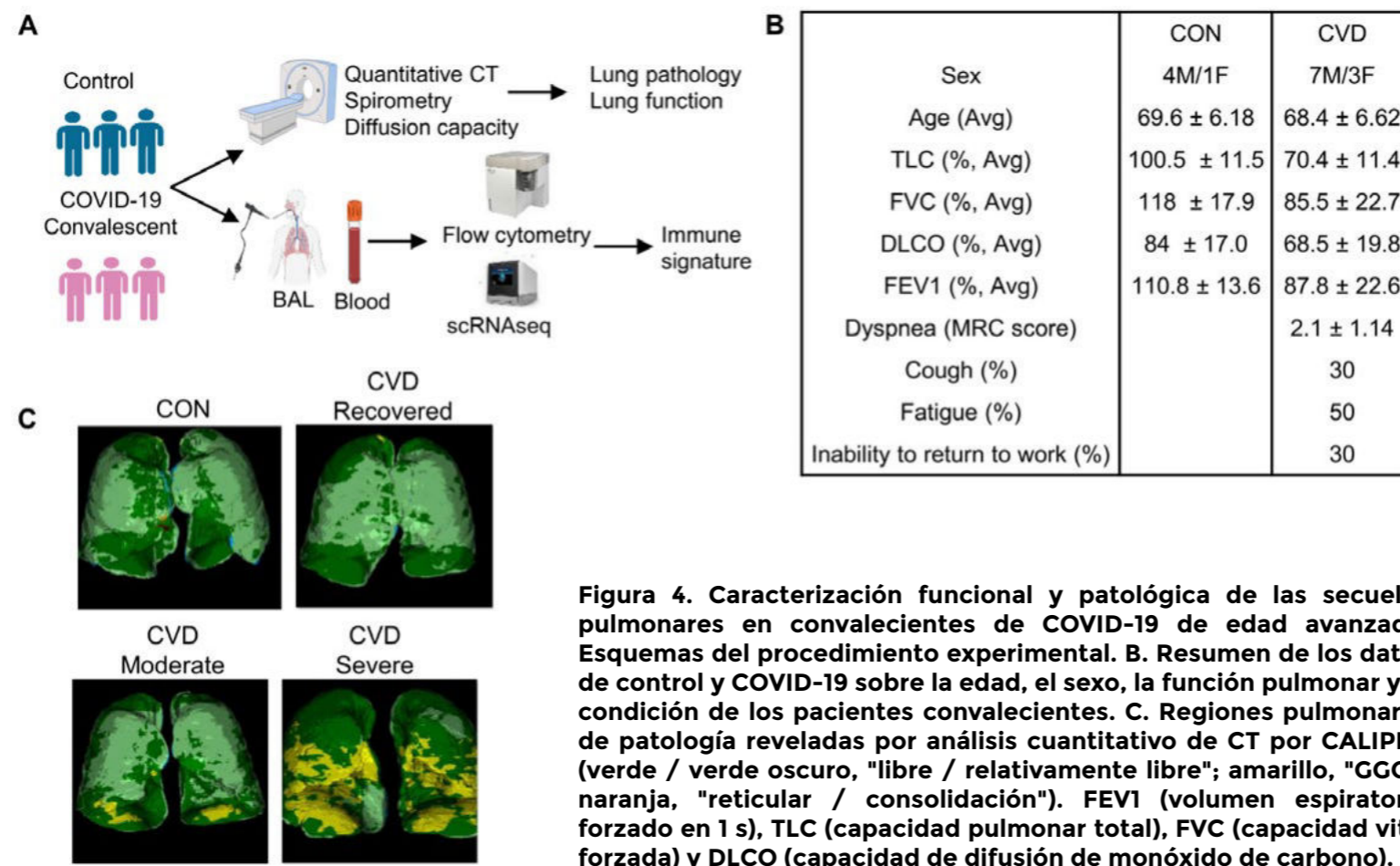


Figura 4. Caracterización funcional y patológica de las secuelas pulmonares en convalecientes de COVID-19 de edad avanzada. Esquemas del procedimiento experimental. B. Resumen de los datos de control y COVID-19 sobre la edad, el sexo, la función pulmonar y la condición de los pacientes convalecientes. C. Regiones pulmonares de patología reveladas por análisis cuantitativo de CT por CALIPER (verde / verde oscuro, "libre / relativamente libre"; amarillo, "GGO"; naranja, "reticular / consolidación"). FEV1 (volumen espiratorio forzado en 1 s), TLC (capacidad pulmonar total), FVC (capacidad vital forzada) y DLCO (capacidad de difusión de monóxido de carbono).

individuos. El estudio demuestra que la extensión de la patología tisular después del COVID-19 agudo determina la función de intercambio de gases pulmonares de los convalecientes de COVID-19 de edad avanzada. En particular, la mayoría de los convalecientes de COVID-19 de edad avanzada mostraron una disminución de las regiones pulmonares normales y un aumento de tejido que exhibe GGO, estructuras relacionadas reticulares y vasculares, acompañado de una disminución del FEV1, FVC, DLCO y otros parámetros funcionales pulmonares. En conjunto, la caracterización detallada de los parámetros fisiopatológicos pulmonares demuestra que la infección aguda por SARS-

CoV-2 resultó en imágenes pulmonares a largo plazo y secuelas funcionales en una cohorte de individuos de edad avanzada.

Adicionalmente, el estudio mostró que los niveles de la mayoría de las citocinas proinflamatorias fueron comparables en la sangre o el tracto respiratorio del control y los convalecientes de COVID-19, lo que contrasta con lo reportado durante la etapa aguda de COVID-19 [M. Liao, y col. *Nat. Med.* 26, 842-844 (2020); PA Szabo, y col. *Immunity* 54, 797-814.e6 (2021)]. e indica que las respuestas inflamatorias agudas se habían resuelto en gran medida en la etapa de convalecencia. Para determinar

las células T CD8+ parecían ser la población más abundante (3,54 a 12,29 %) (Figura 5B). Por lo tanto, la infección por SARS-CoV-2 conduce a alteraciones persistentes de los perfiles inmunitarios respiratorios en la etapa de convalecencia.

Se han detectado respuestas sostenidas de anticuerpos circulantes y linfocitos de memoria meses después de la infección aguda por SARS-CoV-2 [A. Sette and S. Crotty, *Cell* 184, 861-880 (2021)]. Sin embargo, no se han informado las características de las respuestas de anticuerpos y linfocitos de memoria en el tracto respiratorio inferior. Como se esperaba, se detectaron respuestas elevadas de anticuerpos IgG e IgA contra la proteína N, S1 y RBD (dominio de unión al receptor S) del SARS-CoV-2 tanto en el plasma como en los BAL de los convalecientes de COVID-19 en comparación con los del control. Las respuestas de IgM específicas de SARS-CoV-2 fueron menos distintas entre los controles sanos y el grupo convaleciente de COVID-19. Se detectaron células B específicas de RBD tanto en PBMC como en los BAL, y hubo una tendencia de aumento en los porcentajes de células B específicas de RBD dentro de la población total de células B de los BAL (Figura 5C). En comparación con los linfocitos B específicos de RBD circulantes, los linfocitos B específicos de RBD de los BAL tenían un aumento de CD69 y

CD27 (Figura 5D), pero una IgD y CD38 disminuida, lo que indica que estos linfocitos B específicos de SARS-CoV-2 tienen un fenotipo de memoria residente. Los niveles de respuestas de IgG específicas de BAL SARS-CoV-2 se correlacionaron con los niveles de linfocitos T CD4+ locales, particularmente la abundancia de linfocitos T CD69+ CD4+ de tipo residente en tejido, lo que indica que las células T CD4+ pueden ser necesarias para mantener las respuestas respiratorias de memoria de anticuerpos en la etapa después de la recuperación de la infección viral respiratoria primaria, como se observó en modelos animales [YM Son, y col. *Sci. Immunol.* 6, eabb6852 (2021); N. Swarnalekha y col. *Sci. Immunol.* 6, eabb6808 (2021)].

En particular, las células T CD8+ respiratorias se correlacionaron negativamente con los parámetros de función pulmonar y se correlacionaron positivamente con los parámetros patológicos pulmonares, lo que sugiere un papel potencial de las células T CD8+ respiratorias en la contribución al desarrollo de secuelas pulmonares después de COVID-19 agudo.

En conclusión, este estudio, utilizando un análisis cuantitativo automatizado, se encontró que las áreas de imágenes pulmonares anormales se correlacionaban

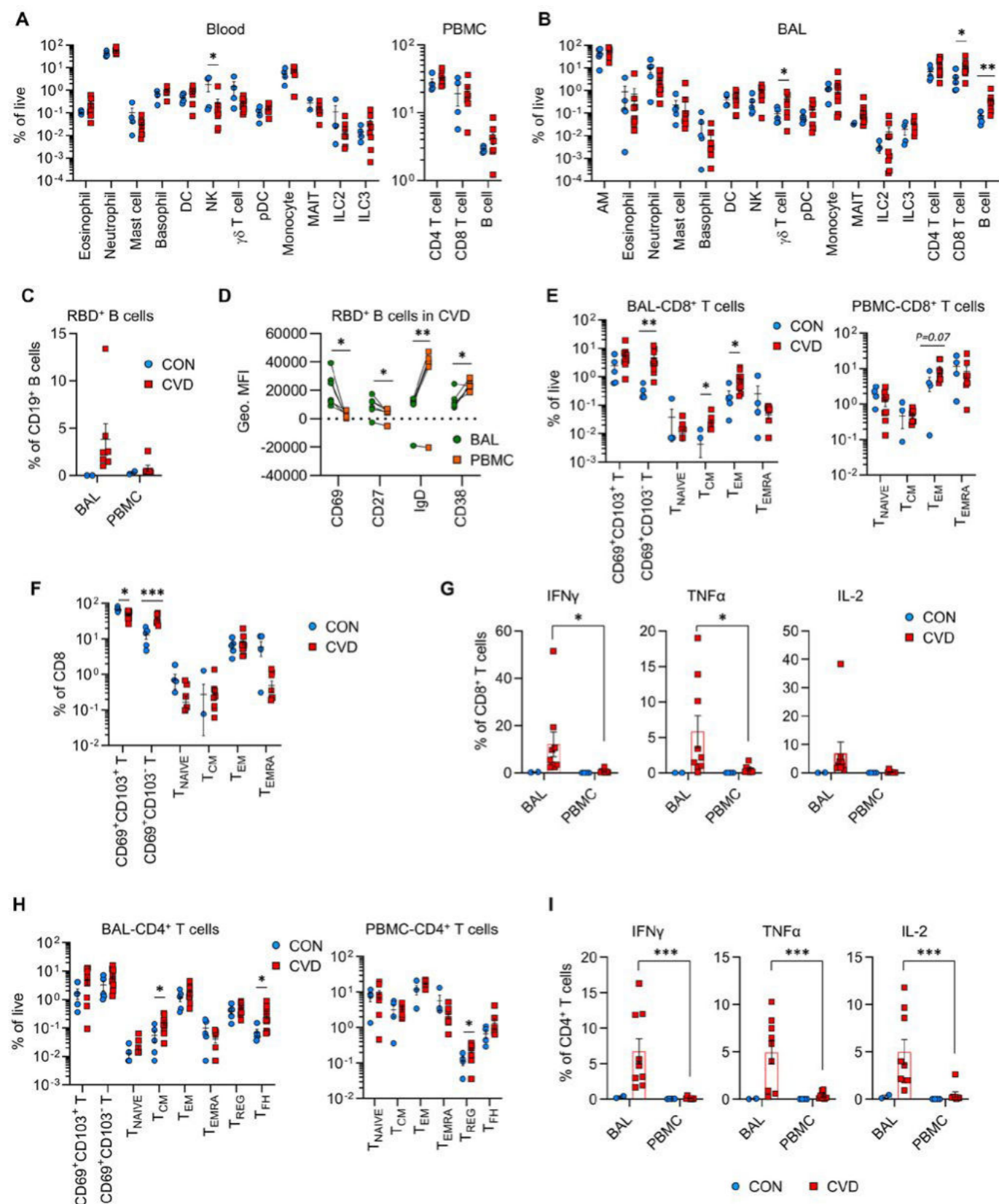


Figura 5. Caracterización de la memoria inmunitaria respiratoria y circulante en convalecientes por COVID-19. A. Porcentaje de tipos de células inmunitarias innatas indicadas en la sangre total (**panel izquierdo**) o células inmunitarias adaptativas en PBMC (**panel derecho**). **B.** Porcentaje de tipos de células inmunes indicados en los BAL. **C.** Porcentaje de células B específicas de RBD dentro del compartimento de células B de BAL o PBMC. **D.** Niveles de expresión de CD69, CD27, IgD y CD38 de células B específicas de RBD en BAL o PBMC. **E.** Porcentaje de subconjuntos de células T CD8+ indicados basados en células vivas en BAL o PBMC. **F.** Porcentaje de indicados CD8+ subconjuntos de células T en CD8 totales + células T. **G.** Porcentaje de IFN- γ , TNF o IL-2 Células T CD8+ en el BAL o PBMC después de la estimulación con grupos de péptidos SARS-CoV-2. **H.** Porcentaje de subconjuntos de células T CD4+ indicados basados en células vivas en BAL o PBMC. **I.** Porcentaje de linfocitos T de IFN- γ , TNF o IL-2 + CD4+ en el BAL o PBMC después de la estimulación con grupos de péptidos de SARS-CoV-2. **A, B, E, F y H.** La significación estadística se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney. * $p < 0,05$. **C.** La diferencia estadística se realizó mediante

ANOVA de dos factores. D. La significación estadística se calculó mediante la prueba t pareada. **G e I.** La significancia estadística se calculó usando ANOVA de dos vías siguiendo la prueba LSD de Fisher. * $p < 0,05$.

directamente con las pruebas de función pulmonar anormales, lo que sugiere que la recuperación tisular incompleta incluso 60 días después del inicio de la neumonía COVID-19 y / o la remodelación tisular persistente con fibrosis, dan como resultado la función respiratoria deteriorada observada en algunos convalecientes de COVID-19. En particular, no detectamos ARN de SARS-CoV-2 notable en el Lavado broncoalveolar (LBA) de convalecientes de COVID-19 en las cohortes estudiadas, lo que contradice la hipótesis de que la infección persistente por SRAS-CoV-2 en el pulmón causa secuelas pulmonares crónicas.

Las células T CD8+ proporcionan principalmente una función protectora durante la infección viral respiratoria aguda, incluida la infección por SARS-CoV-2 [A. Sette, and S. Crotty. *Cell* 184, 861-880 (2021)]. Sin embargo, debido a su potente capacidad para dañar los tejidos, las actividades prolongadas y / o desreguladas de las células T CD8+ pueden contribuir sustancialmente a la lesión pulmonar y / o al desarrollo de patologías después de una infección viral respiratoria (NP Goplen, IS Cheon, J. Sun.

Immunol. 12, 636118 (2021)]. Se encontró que las células T de convalecientes de COVID-19 de edad avanzada expresan niveles más altos de moléculas citotóxicas o inflamatorias y se correlacionan con una función pulmonar disminuida y una patología pulmonar peor. Si estas células T humanas son realmente residentes en los tejidos o no en el tracto respiratorio, es necesario investigar más a fondo.

Por otra parte, Las células T CD103- se enriquecieron con genes asociados con la vía de señalización de TCR, lo que indica que pueden ser sostenidas por señalización tónica o antigénica dentro del pulmón lesionado. Cabe señalar que se ha demostrado que la señalización persistente de TCR causada por la deposición de antígeno residual en el pulmón impulsa el mantenimiento de las células T CD69+ CD103- después de la infección por el virus de la influenza murina [Z. Wang, *Sci. Immunol.* 4, eaaw1217 (2019)]. Por tanto, es posible que el antígeno del SARS-CoV-2 también pueda ser persistente durante un período de tiempo después de la eliminación del virus infeccioso, manteniendo y / o estimulando de ese modo las células T CD103 - RM causando daño tisular.

Finalmente, la destrucción de células T CD8+ dependiente de antígeno, se ha sugerido que

una población de células T CD8+ residentes en tejido con alta expresión de la molécula CXCR6^{hi} causa daño hepático a través de la autoagresión dependiente de ATP durante la EHNA [M. Dudek, y col. *Nature* 592, 444-449 (2021)]. El estudio actual identificó de manera similar un subconjunto de células T CXCR6^{hi} similares a las efectoras residentes en tejidos a niveles relativamente altos en el tracto respiratorio de convalecientes por COVID-19. Estas células expresan abundantes programas de genes efectores, inflamatorios y destructores de tejidos, lo que respalda su potencial como contribuyentes a la patología persistente del tejido respiratorio y la fibrosis tras la resolución de la infección aguda por COVID-19. Si su función patogénica es independiente de las señales antigénicas en el tracto respiratorio, como las de las células del hígado [M. Dudek, y col. *Nature* 592, 444-449 (2021)], merece una investigación futura.