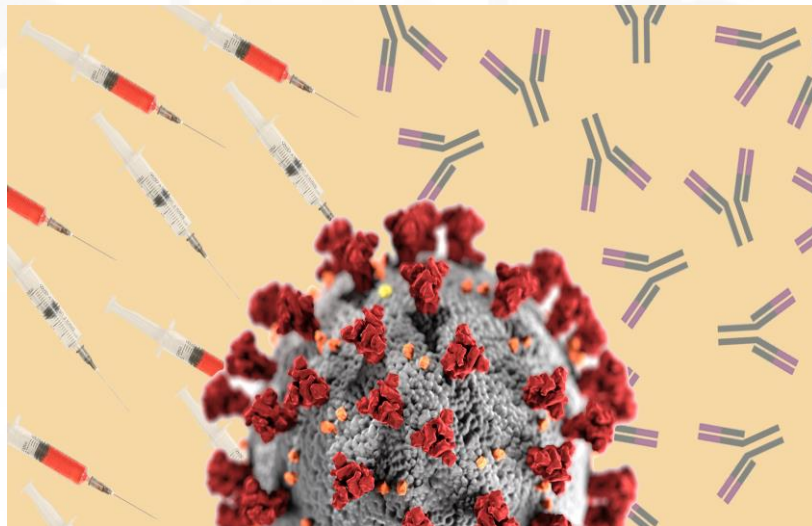


# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **BIOTECNOLOGÍA**

**Evidencias y propuestas de estudio de la respuesta inmunitaria humana frente al SARS-CoV-2**

**Evidence and study proposals of the human immune response to SARS-CoV-2**



**Ana Villar Miyar**

**Departamento de Biología Funcional**

**Área de Inmunología**

**Junio/2020**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**





## Resumen

El virus SARS-CoV-2 apareció por primera vez en Wuhan a finales de 2019. Desde entonces se ha convertido en una pandemia mundial provocando la enfermedad conocida como COVID-19. Este virus de ARN pertenece a la familia de los coronavirus humanos y tiene un tropismo por células que expresan el receptor-enzima convertidora de angiotensina II (ECA2). El contagio ocurre mayoritariamente por contacto directo y los periodos de incubación son de 1-14 días. En todo el proceso de la enfermedad, el mecanismo de defensa del sistema inmunitario resulta fundamental para combatir la infección. En el trabajo presente, se realiza una revisión bibliográfica sobre la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2 donde se ha visto que los casos severos de la enfermedad se asocian con una desregulación del sistema inmunitario, en parte, relacionada con mecanismos de evasión desarrollados por el coronavirus actual, que da lugar a procesos inflamatorios y/o trombosis. Asimismo, se han propuesto algunos marcadores de esta enfermedad como el recuento de linfocitos y mediadores de la inflamación. Por otro lado, la seroconversión aparece aproximadamente a los 10 días desde el inicio de la infección, pero la duración de esta respuesta protectora todavía se desconoce. La respuesta inmunitaria también puede ser estudiada mediante algoritmos bioinformáticos basados en la predicción de epítomos que son reconocidos por anticuerpos y linfocitos T. Respecto al desarrollo de una vacuna frente a este virus, se están utilizando diferentes diseños racionales y plataformas que permitan conseguir una vacuna segura, efectiva y que ofrezca protección a toda la población. Como alternativa a corto plazo, se proponen algunas opciones terapéuticas basadas en la inmunización pasiva como transfusiones de plasma o anticuerpos recombinantes. Aunque el futuro del SARS-CoV-2 es incierto, el conocimiento de las epidemias de coronavirus anteriores y la actual respuesta científica permitirán, entre otros fines, contener su expansión.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, pandemia, COVID-19, coronavirus, sistema inmunitario, respuesta inmunitaria, desregulación, marcadores, seroconversión, predicción, epítomos, vacuna.

## Abstract

The SARS-CoV-2 virus first appeared in Wuhan in late 2019. It has since become a global pandemic causing the disease known as COVID-19. This RNA virus belongs to the family of human coronaviruses and has a tropism by cells expressing the angiotensin II converting enzyme-receptor (ACE2). Transmission occurs mostly by direct contact and incubation periods are 1-14 days. Throughout the disease process, the defence mechanism of the immune system is critical to combat the infection. In the present work, a literature review on the immune response to SARS-CoV-2 is carried out, where it has been seen that severe cases of the disease are associated with a deregulation of the immune system, partly related to avoidance mechanisms developed by the current coronavirus, which leads to inflammatory processes and/or thrombosis. Likewise, some markers of this disease have been proposed such as lymphocyte count and inflammation mediators. On the other hand, seroconversion appears approximately 10 days after the beginning of the infection, but the duration of this protective response is still unknown. The immune response can also be studied by means of bioinformatic algorithms based on the prediction of epitopes that are recognized by antibodies and T lymphocytes. Regarding the development of a vaccine against this virus, different rational designs and platforms are being used to achieve a safe and effective vaccine that offers protection to the entire population. As a short-term alternative, some therapeutic options based on passive immunization are proposed, such as plasma transfusions or recombinant antibodies. Although the future of SARS-CoV-2 is uncertain, knowledge of past coronavirus epidemics and the scientific response will make it possible, among other things, to contain its spread.

**Keywords:** SARS-CoV-2, pandemic, COVID-19, coronavirus, immune system, immune response, deregulation, biomarkers, seroconversion, prediction, epitopes, vaccines.





## ÍNDICE

<b>1. Introducción .....</b>	<b>4</b>
1.1. Clasificación de los coronavirus .....	4
1.2. Organización genómica .....	5
1.3. Manifestaciones clínicas de la COVID-19 .....	6
1.4. Diagnóstico SARS-CoV-2.....	7
<b>2. Sistema inmunitario e infección por SARS-CoV-2.....</b>	<b>8</b>
2.1. Sistema inmunitario innato.....	8
2.2. Sistema inmunitario adaptativo.....	9
<b>3. Respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2.....</b>	<b>9</b>
3.1. Inmunopatología de la enfermedad COVID-19.....	11
3.1.1. Coagulación y activación de fagocitos mononucleares.....	12
3.2. Marcadores en la enfermedad COVID-19 .....	13
<b>4. Inmunodiagnóstico .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Predicción bioinformática de epítomos.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Vacunas para la COVID-19 .....</b>	<b>19</b>
<b>7. Terapias basadas en anticuerpos .....</b>	<b>23</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>25</b>
<b>9. Bibliografía .....</b>	<b>26</b>
<b>10. Anexos .....</b>	<b>31</b>
Anexo I .....	31
Anexo II .....	31
Anexo III .....	32
Anexo IV .....	34
Anexo V .....	35
Anexo VI .....	35
Anexo VII .....	36





## Listado de abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CLIA</b>	<i>Chemiluminescent Immunoassay</i> / Inmunoensayo por quimioluminiscencia
<b>CoV</b>	Coronavirus
<b>ECA2</b>	Enzima convertidora de angiotensina 2
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> / Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>HCoV</b>	<i>Human Coronavirus</i> / Coronavirus humanos
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex / Complejo Principal de Histocompatibilidad
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Open Reading Frame / Pauta abierta de lectura
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> / Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PRR</b>	<i>Pattern Recognition Receptor</i> / Receptores de reconocimiento de patrones
<b>RBD</b>	<i>Receptor Binding Domain</i> / Dominio de unión al receptor
<b>RTC</b>	<i>Replication and Transcription Complex</i> / Complejo de transcripción y replicación
<b>SDRA</b>	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
<b>TC</b>	Tomografía computarizada





## 1. Introducción

En los últimos años se ha alertado de la llegada de una pandemia para la que el mundo no estaría preparado. La pérdida de la biodiversidad, así como también la globalización favorecen el contacto entre humanos y virus emergentes. Sin embargo, durante toda la historia, la población se ha visto afectada por infecciones virales, pero también ha coevolucionado con ellas. El 31 de diciembre de 2019 aparecieron en Wuhan, capital central de la provincia de Hubei, China, una serie de casos de neumonía provocados por un agente infeccioso de etiología desconocida. Posteriormente, fue identificado como un nuevo coronavirus y diez días después se publicó la secuencia del genoma completo para que toda la comunidad científica dispusiera de esta información [1]. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, <https://talk.ictvonline.org/>) lo clasificó dentro de la especie de *coronavirus causantes del síndrome respiratorio agudo grave* (SARS-CoV) y el Grupo de Estudio de Coronavirus lo denominó como SARS-CoV-2. Respecto a la enfermedad causada por este patógeno, la Organización Mundial de la Salud (OMS), le dio el nombre de COVID-19. En enero, un mes después de los primeros casos, esta enfermedad fue designada por la OMS como una emergencia sanitaria de preocupación internacional (PHEIC, por sus siglas en inglés) y en marzo fue declarada una pandemia [2]. En la actualidad, (30/06/2020), la OMS (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>) ha confirmado 10 021 401 casos y 499 913 muertes.

Una vez conocidas las principales características de la familia de los coronavirus, el objetivo de este trabajo, centrándose en el coronavirus actual SARS-CoV-2 y teniendo como referencia a sus otros parientes más cercanos, es conocer la respuesta inmunitaria que desencadena, por un lado, desde un punto de vista inmunopatológico conociendo el funcionamiento del sistema inmunitario ante la infección y su trastorno, y, por otro, desde una perspectiva inmunotecnológica a través de la predicción de epítomos, desarrollo de vacunas y opciones terapéuticas. En conjunto, se consigue una visión global acerca de un nuevo agente infeccioso que parece haber nacido para quedarse.

### 1.1. Clasificación de los coronavirus

Los coronavirus pertenecen al orden: *Nidovirales*, familia: *Coronaviridae* y subfamilia: *Orthocoronavirinae*.

Se distinguen cuatro géneros según características genómicas y tropismo celular:

1. Los coronavirus pertenecientes a los géneros *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* infectan especies aviares [3].





2. Los coronavirus que infectan a humanos (HCoVs, por sus siglas en inglés) son siete, y se encuentran en los géneros:
- *Alfacoronavirus*: HCoV-NL63 y HCoV-229E. Este último fue el primer coronavirus humano aislado en 1965 [3].
  - *Betacoronavirus*: HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 (linaje A), SARS-CoV-1 (linaje B), MERS-CoV (linaje C). El nuevo SARS-CoV-2 pertenece a este género de los *Betacoronavirus*, al subgénero de *Sarbecovirus* y, en concreto, al linaje B [3].

Los patógenos humanos que causan resfriados comunes son: HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 y HCoV-229E; mientras que los coronavirus SARS-CoV-1 y MERS-CoV junto con el actual SARS-CoV-2, son un grupo de patógenos emergentes que principalmente causan enfermedades respiratorias graves [4]:

Tabla 1. Origen e impacto de los dos coronavirus patogénicos anteriores al SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 y MERS-CoV

<b>SARS-CoV-1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Apareció en noviembre de 2002 en Guangdong, China</li><li>• Tasa de mortalidad del 10% (8437 contagios y 813 muertes)</li><li>• Desde el 2003 no se ha vuelto a comunicar ningún contagio</li></ul>
<b>MERS-CoV</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Primeros casos detectados en Arabia Saudí en 2012</li><li>• Tasa de mortalidad del 35,5% (2229 contagios y 791 muertes)</li><li>• Se han documentado algunos casos esporádicos desde su aparición</li></ul>

En el Anexo I, se discuten algunas características que explicarían la patogenicidad del SARS-CoV-2 que se relacionan con un sitio de escisión para una proteasa de tipo furina.

## 1.2. Organización genómica

Los coronavirus son virus de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. Tienen un tamaño de ~30 kb y una estructura 5'-cap 3'-polyA abarcando al menos seis pautas de lectura abiertas (ORF, por sus siglas en inglés) a diferencia de otros virus de ARN que poseen solo una [5]. La primera de ellas, ORF (ORF1a/b), constituye dos tercios del genoma total y sintetiza dos polipéptidos, pp1a y pp1ab, que son procesados por proteasas (Mpro, 3CLpro) para generar 16 proteínas no estructurales que dan lugar al complejo de replicación y transcripción del virus (RTC, por sus siglas en inglés) [2]. El otro tercio del genoma codifica para proteínas estructurales como se muestra en la Figura 1: espícula (S), membrana (M), nucleocápsida (N), envuelta (E); y proteínas accesorias. En concreto, la proteína S, expresada en la superficie de las partículas virales, ofrece una apariencia característica en forma de corona que da el nombre a esta familia de virus. Es necesaria para la





fusión, entrada y transmisión del virus y presenta dos subunidades: S1, conformada por el dominio de unión al extremo amino terminal y el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés), determina el tropismo celular. La subunidad S2 media la fusión del virus con la membrana de la célula receptora a través de dos dominios en tándem HR1 y HR2 (repeticiones de siete aminoácidos) y un péptido de fusión [1]. Referido al resto de proteínas estructurales, la proteína E se relaciona con la formación de poros en las membranas de células infectadas mediante un canal iónico, la proteína M se encarga del ensamblaje de la partícula viral y la proteína N, que es la más abundante en los coronavirus, se encarga del empaquetamiento del ARN en la partícula viral [6].

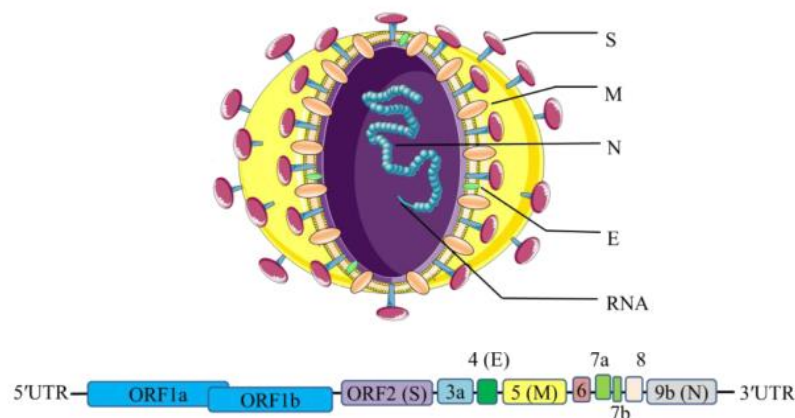


Figura 1. Proteínas estructurales características de los coronavirus junto con su secuencia codificante. [7]

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139247/>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Por otro lado, el genoma de los coronavirus se conserva gracias al complejo RTC que codifica para diferentes enzimas de ARN entre las que se encuentra una 3'-5' exoribonucleasa, única en este tipo de virus de ARN, con función de corrección que permite a los coronavirus tener una tasa de mutación más baja que otros virus de ARN [5]. Esta estabilidad genómica puede ser considerada como una ventaja en el desarrollo de vacunas. En el Anexo II, se discuten otros aspectos como el posible origen y transmisibilidad del SARS-CoV-2.

### 1.3. Manifestaciones clínicas de la COVID-19

El contagio de SARS-CoV-2 ocurre mayoritariamente por contacto directo, mediante secreciones respiratorias en forma de pequeñas gotas o aerosol, entre personas que están infectadas. Una vez que se produce el contagio de este coronavirus, el período de incubación es de 1-14 días, aunque mayoritariamente la sintomatología suele aparecer entre los tres y siete primeros días [1]. El espectro clínico en el que se presenta la enfermedad COVID-19 varía entre [2]:





- **Asintomático/leve:** el 80% son casos leves con síntomas característicos de una infección viral: fiebre, dolor de garganta, congestión nasal o dolor de cabeza entre otros, puesto que el virus infecta células que expresen el receptor-enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), entre las que se encuentran células alveolares (neumocitos) [1], células calciformes y ciliadas del epitelio nasal [6].
- **Moderado:** se muestran síntomas como disnea, tos, mialgia o trastornos gastrointestinales como vómito (el receptor ECA2 también está presente en enterocitos del epitelio intestinal) [1].
- **Severo:** aparece en pacientes de edad avanzada o que padecen alguna comorbilidad (enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedad pulmonar crónica, etc.). Se destaca una pérdida de la capacidad de coagulación, desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria agudo (SDRA), sepsis y, en el peor pronóstico, fallo respiratorio o fallo orgánico múltiple y muerte [2].

#### 1.4. Diagnóstico SARS-CoV-2

Tabla 2. Diferentes métodos para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

<b>Técnicas moleculares (RT-PCR)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) es la técnica más utilizada para la detección de este virus. Las muestras se toman de la zona superior del tracto respiratorio en la zona nasofaríngea y orofaríngea.</li><li>• Para la detección del SARS-CoV-2, deben utilizarse cebadores que sean capaces de reconocer secuencias específicas del genoma viral. Se están utilizando cebadores dirigidos a la ORF1ab y la nucleocápsida.</li><li>• Para el diagnóstico de confirmación se necesitan dos resultados positivos de PCR en la amplificación de dos genes diferentes del SARS-CoV-2 [8].</li></ul>
<b>Detección de antígeno</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prueba rápida de diagnóstico basada principalmente en inmunoensayos en los que se utilizan anticuerpos monoclonales capaces de reconocer proteínas virales.</li><li>• La sensibilidad de estos test suele ser baja y es necesario que la carga viral en las muestras sea alta para que la detección sea posible [9].</li></ul>
<b>Exploración TC</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Realización de radiografías de tórax y tomografía computarizada (TC).</li><li>• Método complementario que permite la detección del SARS-CoV-2.</li><li>• Opacidades de tipo esmerilado (granular o reticular) con consolidación en los casos más severos (bloqueo de la corriente de oxígeno que atraviesa los bronquios) [10].</li></ul>







## 2. Sistema inmunitario e infección por SARS-CoV-2

Los virus, pese a ser parásitos intracelulares obligados y necesitar de la maquinaria celular del hospedador para replicarse, son capaces de activar la respuesta del sistema inmunitario, que tiene como objetivo combatir la infección. Esto es posible, en primer lugar, a través del sistema inmunitario innato, y, posteriormente, del sistema inmunitario adaptativo, que a su vez se divide en la respuesta humoral y celular.

### 2.1. Sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato ofrece, como primera línea de defensa, barreras epiteliales como la piel y mucosas capaces de secretar sustancias químicas que protegen de la infección viral, aunque a veces el virus es capaz de traspasarlas y comenzar a infectar aquellas células que posean el receptor adecuado. En ese momento, el virus comienza a replicarse en el interior de las células y liberar nuevas partículas virales para continuar la infección. En concierto, el sistema inmunitario innato, de forma instintiva, desencadena una respuesta para frenar la propagación del virus a través de células fagocíticas, células efectoras y bloqueando la replicación viral. El ARN viral y los intermediarios generados durante su replicación constituyen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) capaces de ser reconocidos por unos receptores específicos que median las respuestas del sistema inmunitario innato, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) que se encuentran en varios tipos celulares. Tras este reconocimiento, se induce la expresión de varias citocinas y quimiocinas, proteínas encargadas de la señalización intracelular y comunicación que tienen, entre otras funciones, regular la proliferación celular y las respuestas inflamatorias. Por una parte, estas citocinas y quimiocinas van a reclutar monocitos y neutrófilos circulantes en sangre hasta el sitio de la infección, como son las vías respiratorias, para que se encarguen de fagocitar las células infectadas por el virus. Los monocitos se diferencian a macrófagos en los tejidos y también se encargan de secretar citocinas. Por otro lado, el control de la replicación viral ocurre mediante la producción de un tipo de citocina especial: el interferón de tipo I (IFN-I). A través de los diferentes receptores se induce una cascada de señalización en la que intervienen diferentes factores de transcripción que inducen la expresión de esta molécula. Al unirse a sus receptores, el IFN de tipo I tiene un efecto autocrino y paracrino en las células vecinas; ambos con la finalidad de producir proteínas antivirales capaces de bloquear la replicación del virus [11]. Por último, el sistema inmunitario innato actúa a través de unas células efectoras: las células *natural killer* (NK). Estas se





encargan de eliminar a las células infectadas y producir otras citocinas como el IFN- $\gamma$  que recluta a macrófagos para que desempeñen su actividad fagocítica. El interferón de tipo I también puede unirse a las células NK, activándolas y potenciando su actividad lítica.

## 2.2. Sistema inmunitario adaptativo

El sistema inmunitario innato también genera diferentes señales coestimuladoras, que, junto con las citocinas producidas, son capaces de mediar la activación del sistema inmunitario adaptativo tras cuatro o siete días después del comienzo de la infección viral. Para ello, existen las células dendríticas que constituyen un puente de unión entre ambas respuestas inmunitarias y son capaces de procesar los antígenos virales y emigrar hacia los órganos linfoides. En estas localizaciones, se produce la activación de los linfocitos T CD4+ o colaboradores y linfocitos T CD8+ mediante diferentes señales coestimuladoras y la presentación de los antígenos en la superficie de las células dendríticas a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). En la infección por SARS-CoV-2, los linfocitos T CD4+ expresan IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF que indican el desarrollo de una respuesta Th1 característica de las infecciones virales [12]. Por su parte, los linfocitos T CD8+ se diferencian a linfocitos T citotóxicos gracias a las citocinas producidas por los linfocitos T CD4+ y, al igual, que las células NK del sistema inmunitario innato, son capaces de eliminar células infectadas mediante componentes granulosos que contienen en su interior como perforinas y granzimas. La fase efectora de la respuesta inmunitaria celular se continúa con la apoptosis de linfocitos T específicos del virus. Tras esto, aparecen linfocitos T de memoria, un grupo estable de linfocitos que se mantiene de forma prolongada en el tiempo y es capaz de hacer frente a una infección posterior generando una respuesta más rápida al precisarse un menor número de señales coestimuladoras. Por su parte, la respuesta inmunitaria adaptativa humoral se encarga de producir anticuerpos gracias a los linfocitos B activados cuando se unen al antígeno viral y reciben señales de los linfocitos T colaboradores. De esta forma, estos linfocitos B pueden dar lugar a anticuerpos que pueden ser de alta afinidad si son capaces de neutralizar el virus en su fase extracelular, además de proteger en una futura reinfección (anticuerpos neutralizantes). Sin embargo, pueden generarse otros anticuerpos no neutralizantes que se unen al virus y promuevan su aglutinación o medien la fagocitosis de las células infectadas a través de células del sistema inmunitario innato como macrófagos.

## 3. Respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2

Para el estudio de la respuesta inmunitaria es necesario el desarrollo de modelos animales que sean capaces de mimetizar la enfermedad desencadenada en humanos. Hasta que este recurso





esté disponible, las formas inmediatas para conocer al nuevo coronavirus SARS-CoV-2 son a través de los conocimientos previos sobre el SARS-CoV-1, su pariente más lejano, así como también del gran número de estudios que se han ido realizando a lo largo de estos meses.

En el caso del SARS-CoV-2, la seroconversión (aparición de anticuerpos tras la primera exposición a una infección) sigue una tendencia similar a la de otras infecciones virales, y, aunque varía en cada individuo, a los 10 días desde el inicio de la infección las inmunoglobulinas pueden ser detectadas. Dentro de este grupo, las inmunoglobulinas de tipo IgM proporcionan la primera línea de defensa durante la infección viral junto con las inmunoglobulinas IgA presentes en la mucosa; indican una exposición reciente al virus y son de corta duración [13]. Por su parte, las inmunoglobulinas IgG suelen aparecer en la segunda semana, tienen una afinidad alta, ofrecen una inmunidad a largo plazo y memoria inmunológica [14]. Asimismo, las IgG pueden utilizarse como predictores de los niveles de anticuerpos neutralizantes en una fase de convalecencia temprana [13]. En estudios de seroprevalencia se ha demostrado que la mayoría de los individuos que superan la enfermedad COVID-19 desarrollan una respuesta inmunitaria primaria que parece proteger de una reinfección. Sin embargo, en algunos individuos no se ha llegado a observar esta respuesta humoral, lo que se relaciona con episodios leves o asintomáticos de la enfermedad. Por el contrario, los casos más severos se correlacionan con una mayor seroconversión [15]. Respecto a la duración de la respuesta adaptativa humoral frente al SARS-CoV-2, resulta fundamental conocerla en el supuesto de una posible reinfección próxima en el tiempo. Sin embargo, aún no se ha determinado el título de anticuerpos neutralizantes que ofrece protección frente al coronavirus actual. Sin embargo, las evidencias de la respuesta inmunitaria adaptativa y memoria inmunológica desencadenada por el coronavirus humano más cercano al actual, el SARS-CoV-1, permiten inferir algunos aspectos que podrían suceder en el SARS-CoV-2:

- En pacientes que han superado la enfermedad de SARS, los linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ persisten hasta seis años después de la infección. Asimismo, en reinfecciones por coronavirus, se ha visto que existen linfocitos T de memoria en el tejido intersticial del pulmón y en las vías respiratorias [16].
- En la respuesta inmunitaria humoral, se han detectado anticuerpos neutralizantes hasta dos años después de la infección [17].

Debe destacarse también, que, los mecanismos de evasión del SARS-CoV-2 evitan que se desencadene una respuesta inmunitaria temprana. Esto hace que la respuesta de los linfocitos T se demore en el tiempo permitiendo que el virus se siga replicando y se alcancen títulos virales





altos en los pulmones [12]. En el Anexo III, se explican qué características permiten a los coronavirus evadir el reconocimiento por parte del sistema inmunitario.

### 3.1. Inmunopatología de la enfermedad COVID-19

En la mayoría de los casos de infección por SARS-CoV-2, las personas son asintomáticas, o, apenas presentan síntomas. Esto indica que la respuesta del sistema inmunitario innato es capaz de resolver la infección. Sin embargo, en otros casos la infección puede persistir, resultando en un tráfico de citocinas y quimiocinas que comienzan a activar el resto de los mecanismos que median la infección viral. En los casos más graves, se ha visto que esta respuesta se asocia con episodios de sepsis donde también están implicados procesos hemostáticos e inflamatorios.

Debido a la infección y replicación viral, se dan cambios citopáticos que inducen daño o apoptosis en las células y en tejidos de la vía respiratoria. Un ejemplo de ello es el fenómeno de piroptosis que se ha visto en la infección por SARS-CoV-1. La piroptosis es una forma de muerte celular programada altamente inflamatoria que depende de la caspasa-1, que activa citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 y, que, en pacientes con SARS-CoV-2 se han visto aumentadas. La muerte celular ocurre a través de lisis osmótica mediante la formación de poros que provocan la liberación del contenido celular, PAMPs (como el ARN viral) y patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs, por sus siglas en inglés) también conocidos como alarminas. Todos estos componentes son reconocidos por células epiteliales, células endoteliales y macrófagos alveolares vecinos que desencadenan vías de señalización para reclutar más células inmunitarias (macrófagos y linfocitos T citotóxicos) provocando, de esta forma, una cascada de moléculas inflamatorias. Mediante este proceso se eliminan nichos de replicación y se mejora la respuesta defensiva. Sin embargo, este mecanismo genera inflamación local al aumentar la secreción de citocinas y quimiocinas como IFN- $\gamma$ , MCP-1, IP-10 y, principalmente, IL-6. En pacientes con una respuesta inmunitaria adecuada, el reclutamiento de estas células hacia el sitio de la infección permite eliminar las células infectadas. Sin embargo, en otro porcentaje de pacientes, la respuesta inmunitaria se produce de forma exacerbada y acaba derivando en casos de enfermedad severa. Asimismo, pueden aparecer enfermedades nosocomiales que producen una infección secundaria. En consecuencia, la gran cantidad de citocinas que se liberan por parte del sistema inmunitario en respuesta a la infección viral y la aparición de infecciones secundarias pueden resultar en un bucle inflamatorio de retroalimentación positiva que da lugar a una tormenta de citocinas. Además del daño local en el pulmón, la inflamación descontrolada puede extenderse a otros órganos del cuerpo causando sepsis y fallo multiorgánico (fallos cardíacos, hepáticos y del sistema renal). Estos





casos constituyen el 28% de las muertes en los casos de enfermedad severa [18].

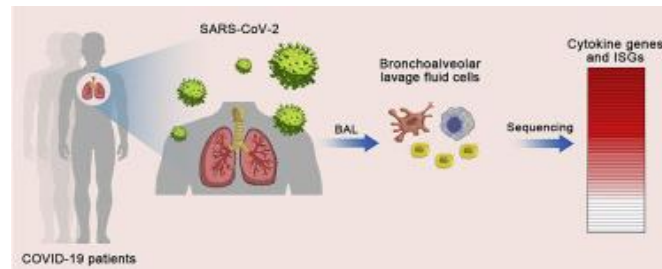


Figura 2. Muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con infección por SARS-CoV-2 tienen perfiles de expresión génica de citocinas elevados. [19] (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312820302444#undfig1>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

### 3.1.1. Coagulación y activación de fagocitos mononucleares

Durante infecciones por patógenos también existe un riesgo trombótico debido a la respuesta inmunitaria innata capaz de formar trombos en vasos sanguíneos que permiten o favorecen la destrucción del agente invasor, fenómeno que se conoce como inmunotrombosis [20]. La presencia de receptores ECA2 en los capilares alveolares, y, en concreto, en los neumocitos tipo II encargados de la producción de surfactante, provocan una lesión pulmonar aguda (ALI). Como respuesta a ese estímulo, se produce la liberación de mediadores inflamatorios que terminan alterando el endotelio pulmonar aumentando la permeabilidad de los capilares y dificultando el intercambio gaseoso que hace que ciertas personas requieran intubación y ventilación mecánica. Esta respuesta inflamatoria aguda hace que los macrófagos que están en la zona de la infección secreten enzimas y citocinas que activan al endotelio y la cascada de coagulación. En el Anexo IV, se explica cómo se desarrolla dicha cascada. El tráfico y la infiltración de moléculas inflamatorias se manifiestan como un síndrome de dificultad respiratoria agudo (SDRA) responsable de un fallo respiratorio hipoxémico y, que, es la causa principal de muerte en los casos severos de la COVID-19. Además, en pacientes con esta enfermedad se han detectado aumentos en los niveles de productos de degradación de la fibrina conocidos como dímero-D. Este puede ser utilizado como biomarcador de la severidad de esta enfermedad ya que es un indicador de la activación de la coagulación y la hiperfibrinólisis. Si la inflamación progresa hacia otros órganos, esta puede acabar desencadenando otras coagulopatías como microtrombos en el cerebro o corazón, así como también un síndrome de desfibrinación o coagulación intravascular diseminada (CID) que representan una de las causas principales de daño en los órganos y muerte en casos severos [21].





### 3.2. Marcadores en la enfermedad COVID-19

Al tratarse de una enfermedad emergente es necesario encontrar diferentes marcadores que permitan establecer un diagnóstico temprano y monitorear la evolución del paciente. La linfopenia y la prevalencia de algunas citocinas proinflamatorias y proteínas del sistema inmunitario innato se relacionan con la severidad de la enfermedad y se proponen como posibles marcadores. Por otro lado, existen otros factores, como el género o el envejecimiento, que también están implicados en la susceptibilidad individual a padecer esta enfermedad. Aunque no se propone como marcador, en el Anexo V se explica la importancia que tiene el receptor ECA2 en el desarrollo de la enfermedad.

**Linfopenia:** una característica de la infección por SARS-CoV-2 que también se ha manifestado en los casos de SARS-CoV-1 y MERS-CoV es la linfopenia, un número bajo de linfocitos en sangre periférica [22]. Algunos hechos que tratan de explicar este desorden son:

- La presencia del receptor CD147 conocido como EMMPRIN facilita la invasión del SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 en linfocitos. Este receptor, perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas, se expresa en tejidos tumorales, tejidos inflamados y durante infecciones virales [23].
- Niveles altos de expresión del receptor FAS en localizaciones linfoides. Este receptor participa en la muerte celular mediada por apoptosis conocida como muerte celular inducida por activación (AICD) [22].
- La mejora dependiente de anticuerpos (ADE). Este mecanismo permite la infección de linfocitos que expresen un receptor Fc al cual se unen anticuerpos no neutralizantes del virus [24].

**Interleucina-6:** los niveles de esta interleucina experimentan cambios drásticos en comparación con el de otras citocinas proinflamatorias, estando altamente elevados en aquellos pacientes en estado grave y cuidados intensivos [18]. Estos aumentos se relacionan con la inhibición de la expresión de moléculas efectoras como la perforina y la granzima B, lo que a su vez parece estar asociado, en algunos pacientes, con el desarrollo de un síndrome de activación macrofágica en el contexto de una tormenta de citocinas [25]. Asimismo, la IL-6 puede promover la apoptosis de linfocitos T contribuyendo a la linfopenia, que, junto con la hipercitoquemia (niveles elevados de citocinas proinflamatorias), son los marcadores principales en los casos severos de la enfermedad COVID-19 [26].

**Otros marcadores:** por su parte, el complemento sérico es el componente central del sistema inmunitario innato, y, mediante tres vías, lleva a cabo la eliminación de patógenos invasores o





células apoptóticas. El complemento también contribuye en la patología de esta enfermedad ya que se ha visto que en casos severos está involucrado en las lesiones pulmonares mediante la liberación de proteínas séricas cuyos niveles son heterogéneos, pero pueden ser medidos y utilizados como marcadores de la activación del complemento [22].

En casos severos también se han detectado niveles altos de dos proteínas de reacción de la fase aguda que forman parte de la respuesta inmunitaria innata. Una de ellas, la proteína C reactiva (PCR), es considerada un mediador soluble de reconocimiento de patrones que activa y promueve la lisis mediada por el complemento. La ferritina es la otra proteína que está elevada; se trata de una proteína intracelular que almacena hierro y es capaz de liberarlo, pero que en cantidades altas actúa como una proteína inflamatoria participando en el desarrollo de estados fibrogénicos [22].

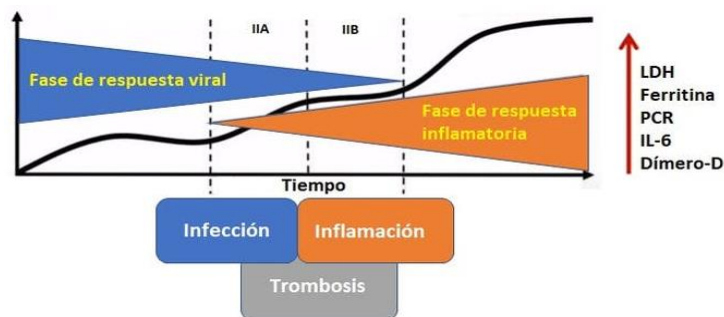


Figura 3. A la derecha, el aumento de IL-6 o dímero D puede ser utilizado como un marcador que indique el desarrollo hacia una fase inflamatoria de la enfermedad que puede derivar en trombosis. [27]

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7118652/>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

**Envejecimiento:** se destaca, principalmente, la prevalencia de otras comorbilidades que hacen empeorar el pronóstico. Por su parte el sistema inmunitario va perdiendo la capacidad de respuesta frente a las infecciones y desarrollo de memoria a largo plazo, fenómeno que se conoce como inmunosenescencia. En concreto, la activación de linfocitos T para combatir la infección, así como también regular las respuestas inmunitarias innatas, se ve disminuida. Una de las causas es la regulación negativa en la expresión de receptores que definen la migración de las células dendríticas hacia los órganos linfoides (donde se producirá la activación de los linfocitos) debido al aumento de mediadores de la inflamación durante el envejecimiento [16].

**Género-morbilidad:** un mayor porcentaje de hombres se ven afectados por la enfermedad COVID-19 en comparación con el de las mujeres. Esto puede relacionarse con hábitos más nocivos como el tabaco o el alcohol [28]. Atendiendo a explicaciones más rigurosas, se sabe que el gen que





codifica para el receptor ECA2 se encuentra en el cromosoma X lo que podría relacionarse con la presencia de algún polimorfismo que, en el caso de las mujeres, otorgue resistencia a la enfermedad COVID-19 [18]. Por otra parte, las hormonas sexuales también tienen diferentes actividades inmunoregulatoras [28]. Asimismo, el receptor ECA2 se encuentra en las células del endotelio vascular de los testículos, zona inmunoprivilegiada (se tolera la presencia de antígenos sin provocar una respuesta inmunitaria inflamatoria). Esta localización del receptor permitiría la migración del virus dificultando la detección del mismo [18].

#### 4. Inmunodiagnóstico

Las pruebas serológicas son necesarias para determinar respuestas inmunitarias protectoras en la población, realizar estudios epidemiológicos y de vigilancia e identificar donantes de plasma sanguíneo. Las pruebas de inmunodiagnóstico para uso clínico deben ser previamente autorizadas, por ello, la OMS recomienda que aquellas que se están desarrollando en la actualidad sean solo utilizadas en investigación. Los ensayos más comunes para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 basados en la respuesta de anticuerpos son: ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), ensayos de quimioluminiscencia (CLIA, por sus siglas en inglés) y ensayos de flujo lateral o inmunocromatografía. Los ensayos de flujo lateral, comúnmente conocidos como pruebas o test rápidos, resultan un método útil de diagnóstico en situaciones de emergencia como la actual en la que se necesitan hacer pruebas de forma masiva para conocer el estado de protección que tienen los individuos frente a la infección. Esto es así pues ofrecen el resultado en pocos minutos y solo es necesario un volumen mínimo de sangre, plasma o suero. Sin embargo, este resultado solo es cualitativo y debe ser confirmado mediante otras técnicas como ELISA o CLIA, que, además, ofrecen una predicción cuantitativa. Como se muestra en la Figura 4, estas pruebas inmunocromatográficas en formato de tira combinan la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, así como también la separación basada en la capacidad de movimiento a través de una membrana adsorbente. Principalmente, tienen un diseño tipo sándwich en el que el anticuerpo a detectar se une al antígeno marcado presente en la membrana y mediante una corriente de flujo lateral alcanzan una zona de captura donde se encuentran anticuerpos inmovilizados anti-IgG o anti-IgM humanos constituyendo la línea de prueba. El exceso de antígeno con el conjugado que no se ha unido al anticuerpo migra a la zona de control [29].





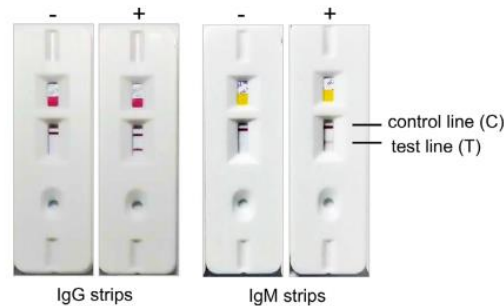


Figura 4. Pruebas inmunocromatográficas de diagnóstico. Se muestran los posibles resultados que determinan ausencia y presencia de las inmunoglobulinas IgG e IgM. [24] ([https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(20\)30175-4/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(20)30175-4/fulltext)). reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Entre las proteínas estructurales del SARS-CoV-2, se ha visto que el dominio de unión al receptor (RBD) perteneciente a la glucoproteína S, está menos conservado en el conjunto de los coronavirus y esta especificidad le permite ser utilizado como antígeno de reconocimiento en pruebas serológicas. La validación de estas pruebas es necesaria para evitar resultados “falsos positivos” debido a reacciones cruzadas frente a otros coronavirus patogénicos o que causan resfriado común. Sin embargo la seroprevalencia para el SARS-CoV-1 y MERS-CoV es baja en humanos, por tanto, es poco probable que las personas expuestas a infecciones por coronavirus varios años atrás desarrollen anticuerpos que reaccionen de forma cruzada y sean los responsables de resultados falsos [30]. La identificación de las inmunoglobulinas IgG e IgM en estas pruebas rápidas permiten conocer de forma aproximada la fase de la infección como así se muestra en la Tabla 3; sin embargo, si el nivel de anticuerpos presentes es bajo pueden producirse resultados “falsos negativos” [14].

Tabla 3. Posibles resultados de una prueba rápida de inmunodiagnóstico e interpretación de los resultados.

Resultados		Interpretación
IgM	IgG	
-	-	No existe infección/ La infección está en un estadio temprano. Debe realizarse otra técnica de confirmación como RT-PCR
+	-	Infección en fase aguda
+	+	Infección en fase aguda desarrollada
-	+	Infección pasada

Estos resultados deben ser analizados con precaución ya que algunos estudios sugieren que, en el caso del coronavirus actual, la seroconversión no se relaciona con la eliminación del virus,





pudiendo llegar a permanecer en el organismo hasta un mes después de la infección (Zhao et al., 2020). Asimismo, con el fin de evitar resultados “falsos positivos”, pueden realizarse pruebas serológicas de confirmación frente a dos antígenos diferentes [30].

La Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores (FIND, por sus siglas en inglés) recoge información sobre las pruebas de diagnóstico, inmunoensayos y ensayos moleculares actuales para el SARS-CoV-2 (<https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>).

## 5. Predicción bioinformática de epítomos

El estudio de la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2 puede comenzar *in silico* a través de algoritmos basados en la predicción de epítomos o determinantes antigénicos que son secuencias proteicas cortas (8-11 aminoácidos) pertenecientes al antígeno, inmunológicamente activos, capaces de ser reconocidos por los receptores de linfocitos T y B y desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa protectora. Esto permite el desarrollo de vacunas (vacunología reversa), pruebas de inmunodiagnóstico y producción de anticuerpos terapéuticos:

- **Epítomos B:** pueden ser clasificados como lineales, regiones continuas de aminoácidos en una secuencia proteica, o discontinuos, residuos separados en la secuencia, pero cercanos físicamente debido al plegamiento de la proteína [31]. La mayoría de los epítomos reconocidos por anticuerpos son de tipo conformacional.
- **Epítomos T:** son lineales. Estos epítomos son reconocidos tras ser procesados por las células presentadoras de antígeno (CPAs) y expuestos en su superficie mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que, en humanos, es conocido como el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés).

Para el análisis y predicciones bioinformáticas de epítomos se dispone de bases de datos que almacenan información, previamente verificada y en un formato adecuado, así como también cuentan con diferentes algoritmos. Para dicha predicción, estos algoritmos se fundamentan principalmente en modelos computacionales basados en redes neuronales artificiales y matrices de peso que estudian las frecuencias de los residuos aminoácidos en cada posición y se asocian con sitios funcionales de la proteína, que, en este caso, es el antígeno y el correspondiente epítomo. Cada una de las predicciones presenta una puntuación o *score* que permite discriminar entre aquellas secuencias candidatas a epítomos. Asimismo, deben combinarse varios algoritmos ya que los resultados dependen mayoritariamente de los criterios de búsqueda.

La base de datos *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB, <https://www.iedb.org/>) contiene información sobre epítomos, así como también algoritmos bioinformáticos para el análisis y predicción de los mismos. Algunos de los epítomos de esta base de datos han sido caracterizados





mediante técnicas de mapeo de epítomos, que son la alternativa experimental a las predicciones bioinformáticas. En la IEDB, las diferentes herramientas para predecir epítomos T permiten inferir:

- La unión de epítomos a moléculas de clase I y II del MHC. Existen programas que cuentan con modelos moleculares y permiten simular la interacción entre el epítomo y la molécula del MHC indicando las diferentes afinidades de unión mediante puntuaciones.
- Epítomos basados en el procesamiento del antígeno en las células presentadoras de antígeno mediante métodos de predicción aditivos [32].
- La capacidad de los epítomos de desencadenar una respuesta inmunoprotectora.
- Un porcentaje alto de individuos entre la población que sea capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria frente al menos uno del conjunto de epítomos T seleccionado (cobertura poblacional) [33].

Por su parte, la predicción de epítomos B lineales se fundamenta en escalas de propensión basadas en características como la hidrofilia, flexibilidad, superficie expuesta o la estructura secundaria. En el caso de los epítomos conformacionales, estos son solo activos en su forma nativa, por lo que es necesario conocer la estructura tridimensional del antígeno para poder realizar la predicción [32]. Algunos algoritmos aleatorios basados en la predicción de modelos estructurales son BeniPred (epítomos continuos) y Ellipro (epítomos discontinuos) [34].

Un recurso más especializado en el estudio de infecciones virales es *The Virus Pathogen Resource* (ViPR, <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>), un repositorio de referencia sobre familias de virus patogénicos humanos que también incluye información sobre epítomos [35]. Para el estudio de los coronavirus, a través de ViPR, se puede acceder a las secuencias de las proteínas estructurales y realizar alineamientos múltiples que permitan identificar regiones conservadas, así como también realizar un análisis predictivo de epítomos.

Respecto al repertorio de epítomos en las proteínas estructurales que sean inmunogénicas y capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria se destaca [6]:

- **Espícula (S):** altamente inmunogénica. Es capaz de desarrollar una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes, en especial, su dominio RBD.
- **Envuelta (E):** considerado como un factor de virulencia, pero es un inmunógeno débil.
- **Membrana (M):** altamente conservada entre los coronavirus.
- **Nucleocápsida (N):** suele estar conservada y es altamente inmunogénica.

Al comparar las secuencias aminoacídicas de las proteínas estructurales del SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 se ha visto que entre ellas comparten un porcentaje de identidad génica alto; de esta forma, epítomos dominantes en la respuesta inmunitaria del SARS-CoV-1 podrían estar conservados y





corresponderse también con el SARS-CoV-2 [35]. Esto se ha confirmado en estudios de caracterización de epítomos del SARS-CoV-2 en los que se han encontrado epítomos T y B (lineales y conformacionales) mayoritariamente en la proteína S seguidos de la proteína N en ambos coronavirus [33]. Sin embargo, la respuesta inmunitaria de linfocitos T para el SARS-CoV-2 también puede estar desencadenada por la proteína estructural M y proteínas accesorias (ORFs) [12].

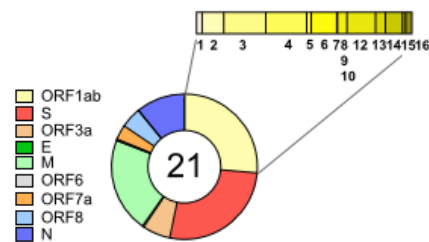


Figura 5. Posibles epítomos que se distribuyen en distintas regiones del SARS-CoV-2 y que son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria específica uniéndose a los linfocitos T CD4+. Principalmente, se destacan los de las proteínas S, M y la ORF1ab. [12] (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420306103?via%3Dihub>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

## 6. Vacunas para la COVID-19

La solución a la crisis mundial sanitaria, a largo plazo y para una prevención de la enfermedad COVID-19, es el desarrollo de una vacuna segura, efectiva y que ofrezca protección a toda la población; sin embargo, este proceso se ve limitado ya que no existen vacunas o procesos de producción de vacunas a gran escala frente a los coronavirus. Como se ha visto, en la respuesta inmunitaria frente a otros coronavirus patogénicos, SARS-CoV-1 y MERS-CoV, la respuesta inmunitaria celular, en comparación con la respuesta humoral, parece ser protectora y de larga duración [33]. Sin embargo, al desconocerse la duración de esa respuesta frente al propio SARS-CoV-2 y el hecho de que algunas personas apenas desarrollan una respuesta inmunitaria humoral protectora, debe tenerse en cuenta para que las vacunas desarrolladas desencadenen una respuesta inmunitaria celular robusta e induzcan un alto número de anticuerpos neutralizantes. De esta forma, también se disminuye la posibilidad de aparición de fenómenos como la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) o inflamación mediada por el receptor Fc de unión a inmunoglobulinas debido a la presencia de anticuerpos sin capacidad neutralizante del virus. Estos episodios inmunopatológicos inflamatorios, que también han aparecido en las enfermedades SARS y MERS, están vinculados a ciertos tipos de vacunas o antígenos (epítomos no protectores) [36].





Una estrategia es la inmunización a largo plazo, es decir, la administración de la vacuna de forma escalada. Así el antígeno puede permanecer durante un mayor tiempo en localizaciones linfoides y aumentar el número de centros germinales de linfocitos B que se diferencien a anticuerpos [37]. Asimismo, también se propone el uso de adyuvantes que son utilizados para potenciar la respuesta inmunitaria y cierto tipo de vacunas los requieren para su formulación. Algunos de los más usados son: sales minerales, partículas lipídicas o adyuvantes estimuladores; se destaca la plataforma GlaxoSmithKine de adyuvantes para la producción de vacunas contra la COVID-19 ya que tiene la ventaja de que permite disminuir la cantidad de antígeno requerida para la formulación de la vacuna [5].

Igualmente, es necesario conocer los factores que pueden influir en el desarrollo de una vacuna eficaz:

- Capacidad de la vacuna de inducir anticuerpos neutralizantes.
- Capacidad para inducir una respuesta inmunitaria celular.
- Desarrollo de una respuesta Th2 (respuesta inmunitaria humoral ineficaz).

Para la vacuna de la COVID-19 esta información se irá conociendo a medida que se vayan realizando los ensayos. En todo caso, la mayoría de las vacunas que se están desarrollando frente al SARS-CoV-2 están enfocadas en la glicoproteína S ya que, entre otros motivos, al encontrarse en la superficie del virus hace que sea directamente reconocida como antígeno. En parte, esto es así, ya que durante la enfermedad de SARS, las vacunas que se desarrollaron basadas en la proteína S mostraron una respuesta favorable. Esta base científica ha permitido que se siga de nuevo esta estrategia para el SARS-CoV-2. Este diseño racional de algunas vacunas está basado en epítomos que se asocian con la producción de anticuerpos neutralizantes para prevenir que el virus entre, controlándose de esta forma la infección viral. Sin embargo, otras proteínas estructurales como la de la membrana y la nucleocápsida y proteínas accesorias también son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria en linfocitos T que mimetiza la infección natural [12].

Otra estrategia en el diseño racional de vacunas es el desarrollo de una vacuna frente a varios betacoronavirus como solución que pueda hacer frente a la situación actual, pero también a posibles infecciones por coronavirus nuevos o reemergentes. Esta alternativa está fundamentada en la producción de vacunas que contengan epítomos conservados en varios coronavirus que desencadenen una respuesta inmunitaria cruzada y protectora. Esta teoría se sustenta en la homología de secuencias entre diferentes coronavirus que, potencialmente, pueden contener epítomos conservados. Además, otra ventaja en el desarrollo de este tipo de vacunas es que estas regiones conservadas tendrán una menor tendencia a experimentar mutaciones espontáneas en





comparación con un determinante antigénico propio de un coronavirus en concreto, pese a que este último siempre es más específico [37]. Respecto a las vacunas desarrolladas frente al SARS-CoV-1, fueron probadas en modelos animales y se vio que eran protectoras, seguras e inducían anticuerpos neutralizantes. Pese a ello, muy pocas vacunas avanzaron más allá de ensayos clínicos en la fase I ya que en el caso de la epidemia del SARS en 2003 esta finalizó antes de que el desarrollo de la vacuna fuera completado [38]. Por tanto, basándose en esta estrategia, si estas vacunas hubieran llegado a ensayos clínicos en fases más avanzadas podrían haber sido rescatadas para su uso en la pandemia actual.

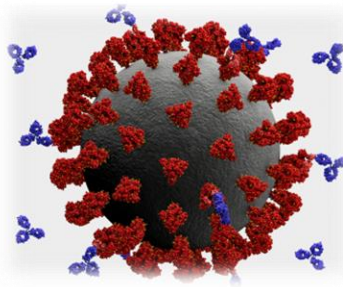


Figura 6. Ambos diseños racionales de la vacuna buscan epítomos, principalmente en la proteína S, capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria que neutralice al virus. En azul, se imitan anticuerpos, que, específicamente, se unen al determinante antigénico de la glucoproteína. [37] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7219357/>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

En la actualidad, se están utilizando, principalmente, cinco plataformas vacunales (tecnologías en las que se basa el desarrollo de la vacuna) que se pueden agrupar desde las más tradicionales a las más innovadora como así se muestra en la Tabla 4. Sin embargo, alguna de estas tecnologías no está totalmente probada, así como tampoco existe un proceso optimizado para la producción a gran escala. A la fecha de realización de esta trabajo, existen 132 candidatos vacunales en estudios preclínicos y 17 se encuentran en estudios clínicos (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>). En el Anexo VI, se explican las fases que debe superar una vacuna antes de ser autorizada.



Tabla 4. Plataformas que se están utilizando para la producción de una vacuna frente al SARS-CoV-2 y algunos de los candidatos vacunales que se han desarrollado actualmente.

Plataforma	Descripción	Vacuna Candidata	
<b>Vacunas con el virus completo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El virus puede estar atenuado o muerto.</li> <li>Inmunogenicidad alta y no precisan el uso de adyuvantes</li> <li>En las vacunas inactivadas el patógeno está muerto y no existe riesgo de que se desarrolle la enfermedad</li> <li>Almacenamiento y distribución sencilla</li> <li>Aquellas en las que el virus está atenuado son menos efectivas [6]</li> </ul>	<b>Vacuna Inactivada contra el nuevo coronavirus</b> Fase I/II Instituto de Productos Biológicos de Pekín y Wuhan/ Sinopharm	
<b>Vacunas de subunidades</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Basadas en el análisis de epítomos B y T inmunoprotectores</li> <li>Son accesibles, de producción rápida y seguras al no contener partículas virales vivas</li> <li>Desarrollo de una inmunidad no protectora. Suelen utilizarse en combinación con adyuvantes [6]</li> </ul>	<b>NVX-CoV2373</b> Novavax Fase I	
<b>Vacunas basadas en vectores virales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Combinan virus vivos que expresan antígenos heterólogos</li> <li>Inducen una respuesta inmunitaria robusta</li> <li>La existencia de una inmunidad previa frente a los vectores virales utilizados disminuiría la respuesta inmunitaria inducida. Deben seleccionarse serotipos que tengan una prevalencia baja en humanos</li> <li>La fabricación de este tipo de vacunas requiere de varias etapas y, actualmente, solo se ha autorizado una [6]</li> </ul>	<b>Ad5-CoV</b> CanSino/ Instituto de Biotecnología de Pekín Fase I/II	
		<b>AZD1222</b> Universidad de Oxford Fase II	
<b>Vacunas de ácidos nucleicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Basadas en plásmidos de ADN o ARN que codifican para uno o varios antígenos</li> <li>Requieren de ciclos cortos de producción y un bajo coste para su escalado</li> <li>A diferencia de las vacunas de ADN, las vacunas de ARN no se integran en el ADN cromosómico y no modifican genéticamente la célula</li> <li>No se ha autorizado ninguna vacuna basada en ácidos nucleicos para su uso en humanos [36]</li> </ul>	<b>ADN</b>	<b>INO-4800</b> Inovio Pharmaceuticals Fase I
		<b>ARNm</b>	<b>mRNA-1273</b> Moderna Fase I/II



También se están llevando a cabo estudios que utilizan **vacunas preexistentes** para demostrar su carácter protector frente a la COVID-19. Estas vacunas han demostrado ser inespecíficas, tener efectos moduladores sobre el sistema inmunitario y proporcionar protección frente a enfermedades infecciosas [36] y la aplicación es de tipo oral o nasal.

La vacuna basada en el vector viral recombinante Ad5CoV ha sido la primera vacuna frente al SARS-CoV-2, hasta el momento, que se tiene conocimiento de que haya superado una primera parte del ensayo clínico en fase I en la que se ha probado la inmunogenicidad, tolerabilidad y seguridad en humanos. Los resultados se muestran en el Anexo VII.

Todas estas vacunas candidatas ofrecen varios enfoques inmunopreventivos, pero todavía es pronto para predecir cuál será exitosa. Por tanto, el camino hasta alcanzar una vacuna universal frente a la COVID-19 está abierto a varias alternativas. Pese a los esfuerzos por adelantar el desarrollo de una vacuna efectiva y protectora, las fechas previstas para completar los ensayos clínicos se estiman a finales del 2020 y mediados del 2021, aunque esta situación actual haya hecho que se reconsideren aspectos regulatorios y de obtención de licencias [38]. Por todo ello, el futuro de la vacuna de la COVID-19 todavía es incierto.

## 7. Terapias basadas en anticuerpos

Los anticuerpos son una elección prometedora como método preventivo y terapéutico frente a futuros rebrotes de enfermedades infecciosas. Como se ha visto, en la glicoproteína del SARS-CoV-2 se han encontrado epítomos que se asocian con la producción de anticuerpos neutralizantes que actúan interfiriendo en los cambios conformacionales que se originan al producirse la unión entre la partícula viral y su receptor, así como también dificultando la fusión mediada por la membrana [15]. Por tanto, estas regiones antigénicas pueden ser utilizadas como diana terapéutica en la enfermedad COVID-19 para la producción de anticuerpos con capacidad neutralizadora [37].

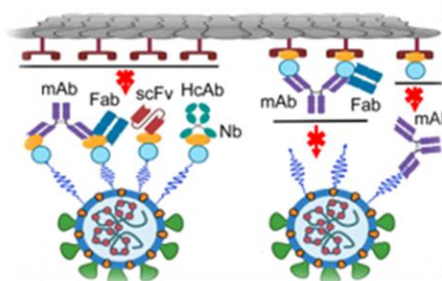


Figura 7. Diferentes tipos de anticuerpos monoclonales y recombinantes se unen al SARS-CoV-2 o al receptor celular para evitar la entrada del virus. [15] (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490620300570>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0

International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)







Algunas de estas formas de producción se definen a continuación. Además, constituyen una forma de inmunoterapia pasiva:

**Anticuerpos monoclonales:** este sistema está basado en la producción, principalmente en modelos murinos, de hibridomas B establemente productores de anticuerpos específicos. En la actualidad, no existen anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos para el SARS-CoV-2; pese a que están empezando a desarrollarse todavía tendrían que superar ensayos *in vitro* e *in vivo* hasta que finalmente sean aprobados. Una alternativa a corto plazo sería analizar aquellos anticuerpos monoclonales neutralizantes desarrollados frente a otros coronavirus que reaccionen de forma cruzada con el actual SARS-CoV-2 y sean capaces de neutralizarlo. De esta forma, se han encontrado anticuerpos monoclonales desarrollados frente al RBD de la subunidad S1 del SARS-CoV-1 que reaccionan de forma cruzada frente al RBD del SARS-CoV-2 y, además, tienen actividad neutralizante [39].

**Ingeniería genética de anticuerpos:** permite confeccionar distintos formatos de anticuerpos. Pese a utilizarse como tratamientos dirigidos al control de otras enfermedades, principalmente de carácter autoinmune, debido a manifestaciones clínicas similares con la COVID-19 se proponen en la Tabla 5 como posibles terapias:

Tabla 5. Diferentes anticuerpos recombinantes que se han propuesto como agentes terapéuticos para la COVID-19.

<b>Anticuerpos monoclonales humanizados</b>	Tocilizumab se une al receptor, tanto soluble como de membrana, de la IL-6. En la actualidad, se están llevando a cabo ensayos clínicos (NCT04306705, NCT04320615, NCT04317092) para determinar su eficacia en pacientes con la COVID-19 [40].
<b>Anticuerpos monoclonales humanos</b>	La producción de IFN- $\gamma$ en estadios avanzados de la enfermedad puede conducir a una hiperactivación macrofágica. Anticuerpos monoclonales humanos como Emapalumab están siendo sometidos a estudios en fase clínica (NCT04324021) en aquellos pacientes con la COVID-19 que presentan hiperinflamación y dificultad respiratorio [21].
<b>Anticuerpos quiméricos</b>	Infliximab es un inhibidor del TNF- $\alpha$ (citocina altamente inflamatoria) relacionado con la inmunopatología de la COVID-19) [21].

**Anticuerpos policlonales:** la inmunización sucesiva de animales (hiperinmunización) permite obtener antisueros policlonales, es decir, anticuerpos específicos frente a diferentes epítopos:

- Son fáciles de producir, pero tienen una disponibilidad limitada.
- Durante la enfermedad de MERS, se desarrollaron inmunoglobulinas G (IgGs) humanas en animales transcromosómicos. Ensayos clínicos en fase I demostraron que las





infusiones de estos anticuerpos policlonales eran seguras. En relación con el coronavirus actual, este método sería efectivo ya que es rápido (una duración de tres meses) y fácilmente escalable [41].

- La terapia con inmunoglobulinas de administración intravenosa puede ser utilizada para prevenir infecciones secundarias en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos que presenten la enfermedad COVID-19, sin embargo, en algunos pacientes puede contribuir al desarrollo de hipercoagulopatías [42].

**Sueroterapia:** este método se basa en el uso de plasma procedente de pacientes convalecientes que han superado la enfermedad y han desarrollado una respuesta inmunitaria policlonal con actividad neutralizante. A diferencia de los métodos anteriores, esta terapia constituye una alternativa terapéutica a la que recurrir de forma casi inmediata en situaciones de emergencia y, en la actualidad, es el único tratamiento en uso basado en anticuerpos para la COVID-19. Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio a gran escala para evaluar la seguridad de este tratamiento y han concluido que las transfusiones de plasma son seguras y su administración en los estadios iniciales de la enfermedad pueden reducir la mortalidad [43]. Sin embargo, todavía debe determinarse la eficacia de esta terapia ya que en muchos casos los pacientes también son tratados con fármacos experimentales [44].

## 8. Conclusiones

- El conocimiento previo sobre los coronavirus, y, principalmente sobre el SARS-CoV-1 han permitido guiar los estudios y la forma de actuación frente al nuevo agente infeccioso SARS-CoV-2.
- El funcionamiento del sistema inmunitario, así como también su respuesta, son la base para conocer los mecanismos que desencadena el nuevo coronavirus en el organismo y desarrollar vacunas que ofrezcan una inmunidad artificial protectora. Además, propone marcadores específicos que indican la evolución de la enfermedad.
- El conocimiento de la secuencia genómica ha permitido, desde los primeros meses del inicio de la pandemia, el desarrollo, principalmente, de test diagnósticos y diseño de vacunas.
- Los recursos bioinformáticos que comprenden bases de datos, programas y algoritmos permiten conocer el pasado evolutivo del SARS-CoV-2 y junto con la inmunoinformática predecir *in silico* qué epítomos de este virus son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria.





- El mundo no estaba preparado para una pandemia con las dimensiones de la actual. Sin embargo, la comunicación entre las comunidades científicas y la libre circulación de información sobre el nuevo coronavirus han permitido conseguir grandes avances en apenas seis meses tras el inicio de la pandemia, aunque el recorrido que queda todavía es largo.

Debe destacarse también la colaboración de la gente que ha superado la infección de SARS-CoV-2 y se ha ofrecido como voluntaria para estudios de seroprevalencia y donación de plasma que están permitiendo conocer la enfermedad COVID-19.

## 9. Bibliografía

- [1] Y.-R. Guo *et al.*, «The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status», *Mil Med Res*, vol. 7, mar. 2020, doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
- [2] M. Cascella, M. Rajnik, A. Cuomo, S. C. Dulebohn, y R. Di Napoli, «Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)», en *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- [3] S. N. J. Korsman, G. U. van Zyl, L. Nutt, M. I. Andersson, y W. Preiser, «Human coronaviruses», en *Virology*, Elsevier, 2012, pp. 94-95.
- [4] Y. Yan *et al.*, «The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment», *IJERPH*, vol. 17, n.º 7, p. 2323, mar. 2020, doi: 10.3390/ijerph17072323.
- [5] A. A. Rabaan *et al.*, «SARS-CoV-2/COVID-19 and Advances in Developing Potential Therapeutics and Vaccines to Counter this Emerging Pandemic Virus &ndash; A Review», *MEDICINE & PHARMACOLOGY*, preprint, abr. 2020. doi: 10.20944/preprints202004.0075.v1.
- [6] J. Zhang, H. Zeng, J. Gu, H. Li, L. Zheng, y Q. Zou, «Progress and Prospects on Vaccine Development against SARS-CoV-2», *Vaccines*, vol. 8, n.º 2, p. 153, mar. 2020, doi: 10.3390/vaccines8020153.
- [7] H. Li, S.-M. Liu, X.-H. Yu, S.-L. Tang, y C.-K. Tang, «Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives», *International Journal of Antimicrobial Agents*, p. 105951, mar. 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105951.
- [8] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, y S. Lu, «Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19», *Journal of Pharmaceutical Analysis*, p. S2095177920302045, mar. 2020, doi: 10.1016/j.jpha.2020.03.001.





- [9] M. Onoda, «PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO DE COVID-19», p. 15.
- [10] S. Kang *et al.*, «Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment», *International Journal of Antimicrobial Agents*, p. 105950, mar. 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105950.
- [11] M. Frieman y R. Baric, «Mechanisms of Severe Acute Respiratory Syndrome Pathogenesis and Innate Immunomodulation», *MMBR*, vol. 72, n.º 4, pp. 672-685, dic. 2008, doi: 10.1128/MMBR.00015-08.
- [12] A. Grifoni *et al.*, «Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals», *Cell*, vol. 181, n.º 7, pp. 1489-1501.e15, jun. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
- [13] L. Premkumar *et al.*, «The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients», *Science Immunology*, vol. 5, n.º 48, jun. 2020, doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
- [14] di Mauro Gabriella, S. Cristina, R. Concetta, R. Francesco, y C. Annalisa, «SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment», *International Immunopharmacology*, vol. 84, p. 106519, jul. 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106519.
- [15] S. Jiang, C. Hillyer, y L. Du, «Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses», *Trends in Immunology*, p. S1471490620300570, abr. 2020, doi: 10.1016/j.it.2020.03.007.
- [16] R. Channappanavar, J. Zhao, y S. Perlman, «T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses», *Immunol Res*, vol. 59, n.º 1-3, pp. 118-128, ago. 2014, doi: 10.1007/s12026-014-8534-z.
- [17] A. Joshi, B. C. Joshi, M. A. Mannan, y V. Kaushik, «Epitope based vaccine prediction for SARS-COV-2 by deploying immuno-informatics approach», *Informatics in Medicine Unlocked*, vol. 19, p. 100338, 2020, doi: 10.1016/j.imu.2020.100338.
- [18] M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Rénia, P. A. MacAry, y L. F. P. Ng, «The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention», *Nat Rev Immunol*, abr. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
- [19] Z. Zhou *et al.*, «Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients», *Cell Host & Microbe*, vol. 27, n.º 6, pp. 883-890.e2, jun. 2020, doi: 10.1016/j.chom.2020.04.017.





- [20] L. E. Gralinski y R. S. Baric, «Molecular pathology of emerging coronavirus infections: Molecular pathology of emerging coronavirus infections», *J. Pathol.*, vol. 235, n.º 2, pp. 185-195, ene. 2015, doi: 10.1002/path.4454.
- [21] M. Merad y J. C. Martin, «Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages», *Nat Rev Immunol*, may 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0331-4.
- [22] E. Terpos *et al.*, «Hematological findings and complications of COVID -19», *Am J Hematol*, p. ajh.25829, may 2020, doi: 10.1002/ajh.25829.
- [23] K. Wang *et al.*, «SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein», *Microbiology*, preprint, mar. 2020. doi: 10.1101/2020.03.14.988345.
- [24] E. Prompetchara, C. Ketloy, y T. Palaga, «Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic», *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, vol. 38, n.º 1, pp. 1-9, mar. 2020, doi: 10.12932/AP-200220-0772.
- [25] L. Cunningham, I. Kimber, D. A. Basketter, y J. P. McFadden, «Why judiciously timed anti-IL 6 therapy may be of benefit in severe COVID-19 infection», *Autoimmunity Reviews*, p. 102563, may 2020, doi: 10.1016/j.autrev.2020.102563.
- [26] J. F. Bermejo-Martin, R. Almansa, R. Menéndez, R. Mendez, D. J. Kelvin, y A. Torres, «Lymphopenic community acquired pneumonia as signature of severe COVID-19 infection», *Journal of Infection*, vol. 80, n.º 5, pp. e23-e24, may 2020, doi: 10.1016/j.jinf.2020.02.029.
- [27] H. K. Siddiqi y M. R. Mehra, «COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal», *J Heart Lung Transplant*, vol. 39, n.º 5, pp. 405-407, may 2020, doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012.
- [28] M. Xie y Q. Chen, «Insight into 2019 novel coronavirus — An updated interim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV», *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 94, pp. 119-124, may 2020, doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.071.
- [29] Y. Pan *et al.*, «Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients», *Journal of Infection*, vol. 81, n.º 1, pp. e28-e32, jul. 2020, doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.051.
- [30] N. M. A. Okba *et al.*, «Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients - Volume 26, Number 7—July 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC», 2020, doi: 10.3201/eid2607.200841.





- [31] J. Chen, H. Liu, J. Yang, y K.-C. Chou, «Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale», *Amino Acids*, vol. 33, n.º 3, pp. 423-428, sep. 2007, doi: 10.1007/s00726-006-0485-9.
- [32] R. E. Soria-Guerra, R. Nieto-Gomez, D. O. Govea-Alonso, y S. Rosales-Mendoza, «An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development», *Journal of Biomedical Informatics*, vol. 53, pp. 405-414, feb. 2015, doi: 10.1016/j.jbi.2014.11.003.
- [33] S. F. Ahmed, A. A. Quadeer, y M. R. McKay, «Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies», *Viruses*, vol. 12, n.º 3, p. 254, feb. 2020, doi: 10.3390/v12030254.
- [34] V. Baruah y S. Bose, «Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV», *J Med Virol*, vol. 92, n.º 5, pp. 495-500, may 2020, doi: 10.1002/jmv.25698.
- [35] A. Grifoni, J. Sidney, Y. Zhang, R. H. Scheuermann, B. Peters, y A. Sette, «A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2», *Cell Host & Microbe*, vol. 27, n.º 4, pp. 671-680.e2, abr. 2020, doi: 10.1016/j.chom.2020.03.002.
- [36] A. Koirala, Y. Jin Joo, A. Khatami, C. Chiu, y P. N. Britton, «Vaccines for COVID-19: the current state of play», *Paediatric Respiratory Reviews*, p. S1526054220300956, jun. 2020, doi: 10.1016/j.prrv.2020.06.010.
- [37] D. R. Burton y L. M. Walker, «Rational Vaccine Design in the Time of COVID-19», *Cell Host & Microbe*, vol. 27, n.º 5, pp. 695-698, may 2020, doi: 10.1016/j.chom.2020.04.022.
- [38] F. Amanat y F. Krammer, «SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report», *Immunity*, vol. 52, n.º 4, pp. 583-589, abr. 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.007.
- [39] C. Wang *et al.*, «A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection», *Nat Commun*, vol. 11, n.º 1, p. 2251, dic. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
- [40] A. Tufan, A. Avanoğlu Güler, y M. Matucci-Cerinic, «COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs», *Turk J Med Sci*, vol. 50, n.º S1-1, pp. 620-632, 21 2020, doi: 10.3906/sag-2004-168.
- [41] J. H. Beigel *et al.*, «Safety and tolerability of a novel, polyclonal human anti-MERS coronavirus antibody produced from transchromosomal cattle: a phase 1 randomised, double-blind, single-dose-escalation study», *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 18, n.º 4, pp. 410-418, abr. 2018, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30002-1.





- [42] C. Mendoza-Pinto, M. García-Carrasco, P. Munguía Realpozo, y S. Méndez-Martínez, «Opciones terapéuticas en el manejo de la COVID-19 grave: una perspectiva de Reumatología», *Reumatología Clínica*, p. S1699258X2030108X, may 2020, doi: 10.1016/j.reuma.2020.05.002.
- [43] M. J. Joyner *et al.*, «Safety Update: COVID-19 Convalescent Plasma in 20,000 Hospitalized Patients», *Mayo Clinic Proceedings*, p. 15, 2020.
- [44] M. Rojas *et al.*, «Convalescent plasma in Covid-19: Possible mechanisms of action», *Autoimmunity Reviews*, vol. 19, n.º 7, p. 102554, jul. 2020, doi: 10.1016/j.autrev.2020.102554.
- [45] A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, y D. Veessler, «Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein», *Cell*, vol. 181, n.º 2, pp. 281-292.e6, abr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [46] K. G. Andersen, A. Rambaut, W. I. Lipkin, E. C. Holmes, y R. F. Garry, «The proximal origin of SARS-CoV-2», *Nat Med*, vol. 26, n.º 4, pp. 450-452, abr. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- [47] A. L. Totura y R. S. Baric, «SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon», *Current Opinion in Virology*, vol. 2, n.º 3, pp. 264-275, jun. 2012, doi: 10.1016/j.coviro.2012.04.004.
- [48] F.-C. Zhu *et al.*, «Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial», *The Lancet*, vol. 395, n.º 10240, pp. 1845-1854, jun. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)31208-3.



## 10. Anexos

### Anexo I

#### **Patogenicidad del SARS-CoV-2**

Algunas de las características patogénicas que se le atribuyen al SARS-CoV-2 se deben a la presencia de un sitio de escisión polibásico para la furina que media la entrada del virus en las células:

- Esta característica no se encuentra en el SARS-CoV-1 por lo que podría estar relacionada con que el nuevo coronavirus tenga una mayor infectividad y capacidad de transmisión horizontal.
- Se ha visto que si se bloquea el sitio de escisión polibásico, la entrada del virus en las células se ve afectada [45]. Además, debido a la expresión ubicua de las proteasas de tipo furina en varios tejidos como pulmones o hígado, este sitio de activación podría contribuir en su propagación a otros órganos del cuerpo [45].
- Este dominio polibásico está presente en otros virus altamente patogénicos como el virus de la gripe aviar, aunque, en este caso, el sitio de activación se encuentra en la proteína hemaglutinina [45].
- La presencia de diferentes residuos en ese sitio polibásico permiten la formación de enlaces O-glicosídicos que generan proteoglicanos, implicados en la formación de dominios de mucina. Estos podrían proteger epítopos o determinantes antigénicos del virus del reconocimiento por el sistema inmunitario lo que se relacionaría con fenómenos de inmuno-evasión [46].

### Anexo II

#### **Origen y transmisión del SARS-CoV-2**

Los primeros casos de infección por el nuevo coronavirus se relacionaron con la exposición a este agente infeccioso en un mercado de mariscos de Wuhan en el que también había animales salvajes vivos. Se pensó que el mecanismo de transmisión era exclusivamente a través de animales que portaban el virus, pero se vio que también podía transmitirse entre humanos. Asimismo, el número reproductivo para este virus es de 2.2 [1]. En comparación con los otros dos coronavirus zoonóticos, SARS-CoV-1 y MERS-CoV, el número reproductivo fue de 2-3 y 0,7 respectivamente [4]. Análisis filogenéticos demuestran que el genoma del SARS-CoV-2 presenta una similitud del ~96% con el coronavirus del murciélago bat/RaTG13 así como también con el



de otros como el bat-SL-CoVZC21 y bat-SL-CoVZC45 en un ~88% [4], lo que parece indicar que los murciélagos actuaron como un reservorio del nuevo coronavirus, en concreto, aquellos pertenecientes al género *Rhinolophus* [46]. Por otro lado, se han encontrado similitudes con el genoma del coronavirus del pangolín Pangolin/1 del ~ 90.5%. Además, seis del total de aminoácidos del RBD que difieren del resto de coronavirus, se mantienen conservados tanto en la secuencia del SARS-CoV-2 así como en la del Pangolin/1. También se destaca la existencia de una ARN polimerasa dependiente de ARN muy similar genéticamente entre los coronavirus del murciélago bat/RaTG13 , el del pangolín Pangolin/1 y el de SARS-CoV-2 [46]. Estos hechos apoyan la teoría del origen del SARS-CoV-2 como una posible selección natural en animales seguida de una transmisión zoonótica [46] para lo que sería necesario hallar la especie hospedadora intermedia en la que se produjo esa selección, ya que las similitudes que se dan con el coronavirus del pangolín no son suficientes. Esto se debe en parte a que en el nuevo SARS-CoV-2 se ha encontrado una estructura que no está presente en el coronavirus del pangolín. Se trata del sitio funcional de escisión polibásico para una proteasa de tipo furina situado en la frontera de las regiones S1 y S2 como resultado de una inserción de 12 nucleótidos (estos codifican para el sitio de escisión PRRA) [46]. Sin embargo, este no se ha observado en otros *Betacoronavirus* del linaje B, pero sí en algunos del linaje A. [46]. Esta nueva característica del SARS-CoV-2 apoya otra teoría en la que su antecesor saltara a humanos donde se produciría ese cambio, además de haberse adaptado transmitiéndose entre humanos sin ser detectado [46]. Con respecto a los otros dos coronavirus que causan enfermedades graves en humanos, SARS-CoV-1 y MERS-CoV, presentan una relación con el genoma del SARS-CoV-2 del 79% y 50 % respectivamente (Guo al., 2020). Asimismo, estos dos virus zoonóticos tienen su origen en coronavirus de murciélagos que utilizaron un animal intermedio como hospedador, civetas en el caso de SARS-CoV-1 y camellos en el MERS-CoV, para producir la enfermedad en humanos [4]. Pese a que el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV-1 comparten el mismo receptor celular (ECA2), se ha visto que el RBD del nuevo coronavirus se une con mayor afinidad, lo que verifica que este coronavirus pueda difundirse o extenderse eficientemente entre humanos [46].

### Anexo III

#### **Mecanismos de evasión del SARS-CoV-2**

Los coronavirus han desarrollado diferentes mecanismos, en los que participan proteínas estructurales, accesorias y no estructurales, para evadir el reconocimiento del sistema inmunitario, así como también para interferir en la respuesta del sistema inmunitario innato.

Para poder explicar algunos de los modos de actuación del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 se procede a analizar diferentes actividades inmunomoduladoras de los betacoronavirus patogénicos SARS-CoV-1 y MERS-CoV [24].

Tabla 6. Evidencia de mecanismos de evasión desarrollados por algunos coronavirus.

<p><b>Reconocimiento de la partícula viral</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Algunos coronavirus, incluido el SARS-CoV-2, se replican en vesículas de doble membrana evitando el reconocimiento por parte de los PRR.</li> <li>• El ARNm del SARS-CoV-1 posee una caperuza metil-guanosin-trifosfato (5'cap) en el extremo 5' que es utilizada para diferenciar el ARN propio del exógeno [47].</li> <li>• La nsp16 mimetiza la actividad 2-O-metiltransferasa permitiendo metilar las partículas virales para que no sean reconocidas [47].</li> </ul>
<p><b>Producción de interferón</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nsp1 antagoniza la respuesta del IFN tipo I y degrada ARNm con función antiviral del hospedador [11].</li> <li>• ORF3b es un antagonista del IFN tipo I y la ORF6 junto con la proteína N bloquean la señalización de la vía del interferón [47].</li> <li>• ORF4a bloquea la inducción de interferón en la infección por MERS-CoV.</li> <li>• La expresión de genes involucrados en la presentación antigénica está regulada negativamente [8].</li> <li>• Durante infecciones por SARS-CoV-1 y MERS-CoV, se ha visto que los genes inducidos por interferón no se expresan hasta que se alcanza el pico de la carga viral [47].</li> </ul>

La evasión del reconocimiento y la función antagonista de algunas de las proteínas hacen que la respuesta inmunitaria innata se retrase en los estadios tempranos de la infección, permitiendo que el virus continúe replicándose y tenga mayor capacidad de infección. En el caso del SARS-CoV-2 esto podría explicar por qué las personas asintomáticas contribuyen potencialmente en la transmisión del virus (lo que dificulta el control de los contagios) y por qué los periodos de incubación pueden llegar a ser de hasta de 14 días [24]. La presencia viral continuada también compromete el control prematuro de la infección aumentando el flujo de neutrófilos y

macrófagos que son la fuente principal de citocinas proinflamatorias. Otros modos de evasión del sistema inmunitario pueden ser la variación antigénica a causa de mutaciones espontáneas que aparecen a medida que el virus se replica y se transmite entre personas. Sin embargo, los coronavirus tienen una tasa de mutación baja gracias a la capacidad de corrección de la exoribonucleasa que poseen. Por otra parte, el retraso en la respuesta del IFN también compromete la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa retrasando su función y prolongando de esta forma la infección viral [24].

## Anexo IV

### Activación de la vía de coagulación

El daño endotelial producido a causa de la infección induce la expresión de quimiocinas, moléculas de adhesión que atraigan a leucocitos para que fagociten al patógeno (extravasación leucocitaria) y factor tisular tanto en macrófagos como en células endoteliales. Por su parte, el factor tisular promueve la formación de fibrina responsable de los coágulos de sangre mediante la vía intrínseca de coagulación. Por otro lado, algunos de los leucocitos reclutados como neutrófilos, liberan unas redes extracelulares compuestas de ADN y gránulos conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos (NET) que inducen la vía de contacto o extrínseca de coagulación y unen y activan plaquetas para amplificar el coágulo de sangre. Además, las vías naturales anticoagulantes como la antitrombina o la inhibición de la vía del factor tisular están casi siempre detenidas durante procesos inflamatorios, lo que contribuye a una mayor propagación de la coagulación en el curso de infecciones virales [21]

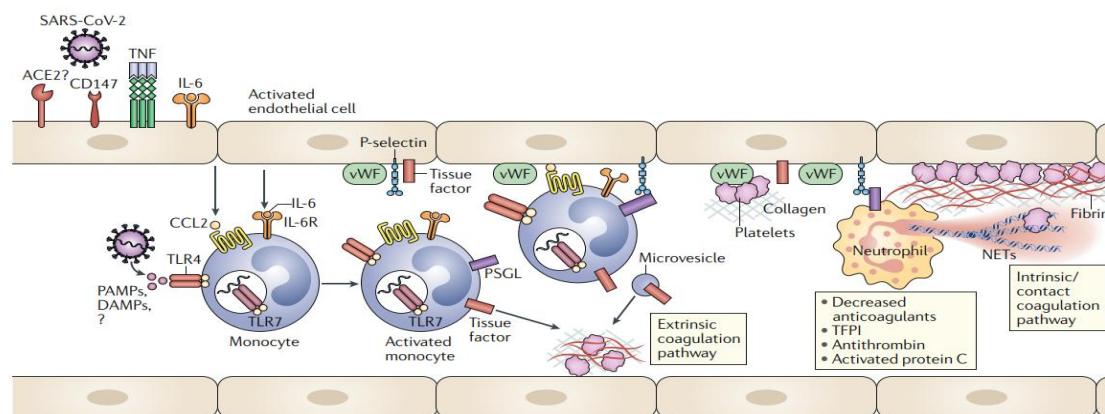


Figura 8. La activación del epitelio endotelial tras la infección por SARS-CoV-2 induce la expresión de factor tisular y el reclutamiento de neutrófilos. [21] (<https://www.nature.com/articles/s41577-020-0331-4>) reproducida de acuerdo con los términos y condiciones de una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

## Anexo V

### **Receptor ECA2**

La infección por SARS-CoV-1 induce una expresión negativa del receptor ECA2, el cual se encarga de regular la presión sanguínea y el balance electrolítico corporal a través del sistema renina-angiotensina. La alteración de este sistema puede derivar en una patología pulmonar severa debido al aumento de la inflamación y permeabilidad de las vías respiratorias [18]. La disminución de este receptor también puede ser debida a su internalización en el citoplasma celular cuando se produce la infección viral. Por otro lado, además de ofrecer protección a los tejidos durante problemas pulmonares severos, el receptor ECA2 es un gen estimulado por IFN, por lo que, el SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 que utilizan este receptor para mediar la entrada dentro de las células, se aprovechan de la respuesta protectora del sistema inmunitario innato para tener un mayor número de vías de entrada ya, que, según lo anterior, el IFN estimularía la expresión de receptores ECA2 [11].

## Anexo VI

### **Validación de una vacuna candidata**

Los procesos para seguir en la obtención de vacunas comprenden ensayos preclínicos, ensayos en fase clínica y por último su producción y distribución:

-En primer lugar, la vacuna debe probarse en modelos animales apropiados. Para el coronavirus actual no existen modelos animales que emulen la enfermedad que es desencadenada en humanos por lo que es necesario desarrollar modelos que respondan de la misma forma. Algunos de los estudios se han llevado a cabo utilizando modelos animales de ratones transgénicos que expresan el receptor humano ECA2, y, que, previamente habían sido utilizados para el estudio de los anteriores coronavirus. Como alternativa, se pueden realizar ensayos de neutralización *in vitro* con los sueros de animales inmunizados.

Otra posibilidad para la evaluación de vacunas son los ensayos con partículas similares a virus (*virus-like particle*), estructuras multiproteicas que mimetizan la estructura y conformación del virus nativo pero que carecen del material genético viral [38].

-Debe determinarse la inmunogenicidad, protección y potencial inmunopatogénico en primates no humanos.

Estos procesos requieren entre tres y seis meses para su evaluación. Sin embargo, al utilizarse plataformas vacunales previamente desarrolladas o que ya han sido testadas pueden omitirse alguno de esos ensayos.

En cuanto a los ensayos clínicos o evaluación los pasos son:

- **Fase I:** se evalúa la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de los candidatos vacunales en un grupo reducido de humanos.
- **Fase II:** se establecen las dosis adecuadas de la vacuna.
- **Fase III:** la eficiencia y la seguridad de la vacuna se demuestra en un número mayor de personas.

## Anexo VII

### **Vacuna Ad5-CoV**

El Instituto de Biotecnología de Pekín junto con la empresa CanSino, han desarrollado la vacuna Ad5-CoV que utiliza como plataforma un vector adenoviral de tipo 5 no replicativo que expresa la glicoproteína del SARS-CoV-2. El estudio comenzó a primeros de marzo y ha tenido una duración de 28 días, aunque los resultados continuarán siendo evaluados durante seis meses más. Se ha visto que una dosis única de esta vacuna induce una respuesta inmunitaria humoral y celular. La seroconversión y producción de anticuerpos neutralizantes aparece a los 14 días tras la vacunación, así como también la respuesta de linfocitos T. Se encontró una correlación positiva entre anticuerpos anti-RBD y el título de anticuerpos neutralizantes que confirma nuevamente la capacidad de este dominio de la proteína S para producir anticuerpos que neutralicen el virus. La vacuna se administró por vía intramuscular en tres dosis diferentes y las reacciones más comunes fueron fiebre, sensación de fatiga o dolores de cabeza, pero sin ninguna reacción adversa. En este primer ensayo no se han incluido individuos mayores de 60 años. Puesto que la población perteneciente a este grupo es de riesgo en la enfermedad COVID-19, en la fase II del estudio será considerada. Sin embargo, una de las limitaciones que presenta este estudio es que un gran número de los voluntarios tenía una inmunidad preexistente frente al adenovirus tipo 5. De esta forma, la inmunización por la vacuna puede verse ralentizada. Además, debe estudiarse si las respuestas inmunitarias desencadenadas han sido frente a la glucoproteína S, o, por el contrario, frente al adenovirus utilizado [48].