

## Gestión y Economía de la Salud

Producir información, conocimiento y discusión sobre gestión sanitaria y economía de la salud

### **La enfermedad por covid se puede explicar por las ciencias de la complejidad.**

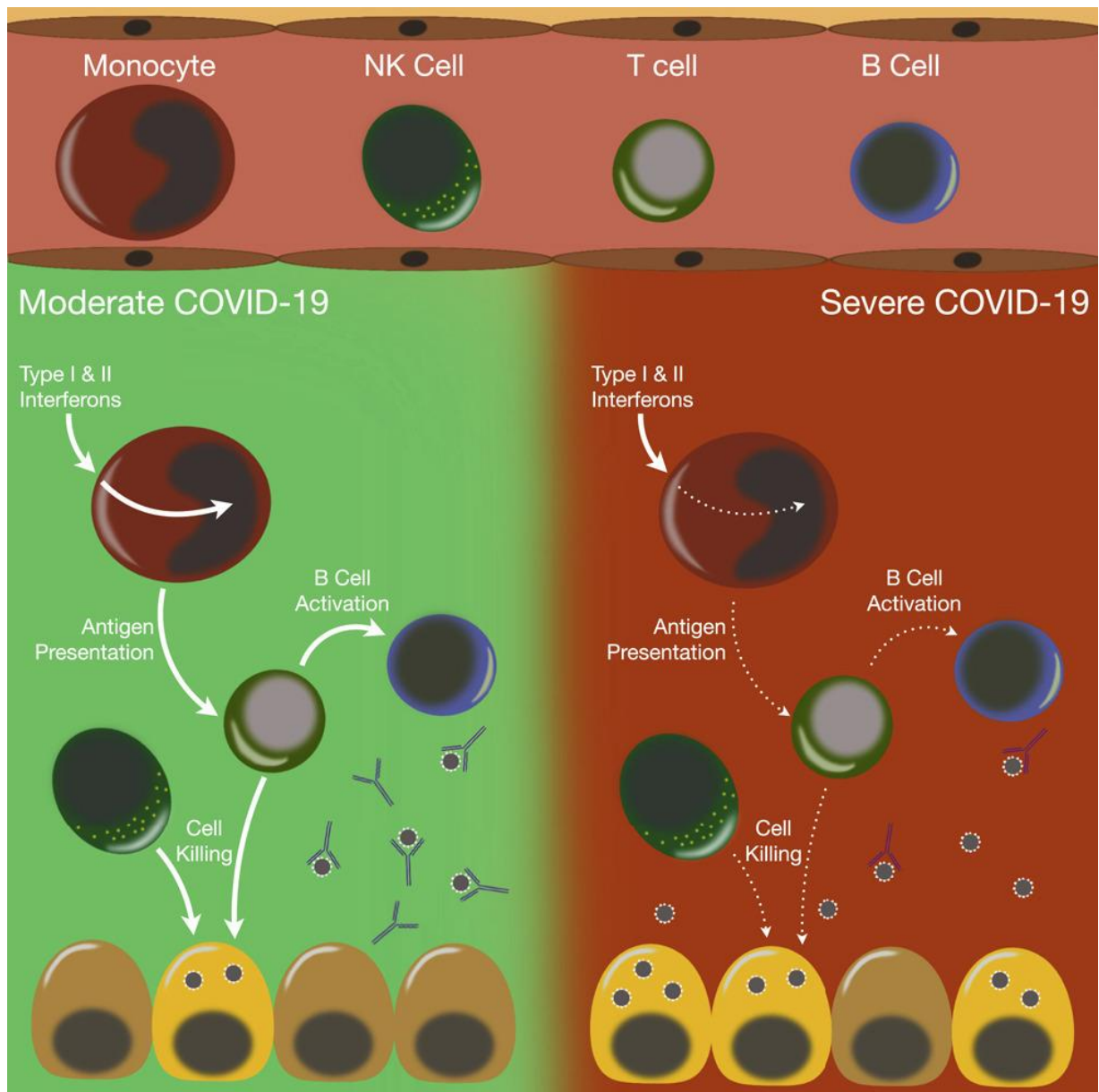
Publicado por [saludbydiaz24 enero, 2021](#) Publicado en [Políticas de Salud en la Pandemia](#)

### **Desequilibrio inmunológico por covid 19 y enfermedad grave.**

El sistema inmunitario adaptativo es importante para el control de la mayoría de las infecciones virales. Los tres componentes fundamentales del sistema inmunitario adaptativo son las células B (la fuente de anticuerpos), las células T CD4 y las células T CD8. El armamentario de células B, células T CD4 y células T CD8 tiene diferentes roles en diferentes infecciones virales, y en las vacunas, y por lo tanto es fundamental estudiar directamente la inmunidad adaptativa al SARS-CoV-2 para entender COVID-19. El conocimiento ya está disponible sobre las relaciones entre las respuestas inmunitarias específicas del antígeno y la infección por SARS-CoV-2

Un estudio científico publicado recientemente en Cell demuestra que los pacientes con COVID-19 grave con SDRA tienen un estado de desequilibrio inmunológico en el que la desregulación de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas puede estar contribuyendo a un curso más grave de la enfermedad. **En un abordaje claro de las ciencias de la complejidad se estudiaron las interrelaciones complejas en la inmunidad humoral y celular, afectando la transcripción del mensaje antigénico del virus, como consecuencia de ello disminuye la capacidad de la CD 8 y también de la inmunidad innata, esto no es una tormenta citokínica, que es la expresión de la fenotipia de la noxa el covid 19, el coronavirus, con una injuria pulmonar que desencadena un distress respiratorio.**

Este trabajo, tremendamente esclarecedor y detallado, permite analizar la complejidad de la ruptura de la respuesta inmune, que **no es una parálisis inmunológica**, sino una **disfunción, fundamentalmente en la transcripción, en la traducción de los antígenos y con que defensas deben ser atacados**. Esta complejidad permite explicarnos por qué algunos medicamentos, que intervienen en las respuestas inadecuadas no han tenido efecto, porque la tormenta citoquinica es una consecuencia, de la obnubilación y desregulación inmunológica, la causa es anterior es los problemas con la transcripción, con la modulación, luego si las citoquinas integran un círculo vicioso.



En lugar de una inmunidad antiviral beneficiosa en respuesta a la infección, el COVID-19 severo se caracteriza por respuestas inmunes desreguladas que permiten que el virus persista, causando daño pulmonar, SDRA e inflamación sistémica ( [Giamarellos-Bourboulis et al., 2020](#) ).

**Si bien los mecanismos que subyacen a la evasión de la inmunidad antiviral y la inflamación patógena por el SARS-CoV-2 no están claros en este momento, los puntos en común en la respuesta patogénica con este nuevo coronavirus y el SARS-CoV-1 y MERS-CoV se han hecho evidentes ( [Felsenstein et al., 2020](#) ; [Ye et al., 2020](#) ).**

**Las células detectan los virus de ARN utilizando receptores de reconocimiento de patrones (PRR) endosómicos y citosólicos que envían señales a través de otros mediadores, incluido el factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAF3) y TRAF6 para activar los factores reguladores (IRF) y el factor nuclear del interferón (IFN).  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que da como resultado la transcripción de IFN de tipo I antivíricos tempranos por macrófagos alveolares residentes (AM) y**

**células epiteliales en los pulmones, lo que establece una respuesta inmune que elimina el virus y resuelve la inflamación** ( [Lester y Li, 2014](#) ).

El SARS-CoV-1, y probablemente el SARS-CoV-2, **inhibe múltiples PRR de detección viral y señales posteriores, bloqueando eficazmente el reconocimiento del virus y el IFN antivírico temprano tipo I e iniciando una cascada inflamatoria desregulada que puede conducir a ARDS e inflamación sistémica** ( [Hu y col., 2017](#) ; [Li et al., 2016](#) ; [Siu et al., 2009](#) ).

Además, el análisis transcriptómico de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con COVID-19 encontró vías proinflamatorias reguladas al alza en monocitos y células T CD4, lo que sugiere que las características básicas de la «tormenta de citocinas» en COVID-19 son paralelas al SARS y al MERS ( [Wen et al., 2020](#) ). Sin embargo, ahora también estamos apreciando las disfunciones inmunológicas que pueden estar causando un curso de la enfermedad más severo ( [Hadjadj et al., 2020](#) ; [Lee et al., 2020](#) ; [Wilk et al., 2020](#) ).

Los pacientes con COVID-19 tienen niveles circulantes más altos de interleucina-6 (IL-6), TNF- $\alpha$  y ligando 10 de quimiocina del motivo CXC (CXCL10), en particular aquellos con enfermedad grave, y estas citocinas «tempranas» se mantienen durante semanas después de la infección, sugiriendo una incapacidad para resolver la inflamación ( [Xiong et al., 2020](#) ; [Yang et al., 2020](#) ).

**Las células inmunitarias adaptativas reclutadas** de los ganglios linfáticos cercanos (a través de los sistemas circulatorio y linfático) **también pueden contribuir a la inflamación patógena en el pulmón**, particularmente si están polarizadas a las respuestas T helper 1 (Th1) y Th17 que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos y a los monocitos / macrófagos proinflamatorios activación ( [Wong et al., 2019](#) ). Sin embargo, el daño pulmonar severo debido a neumonía o sepsis se caracteriza con mayor frecuencia por una falta de células inmunes adaptativas en la periferia ( [Bermejo-Martin et al., 2017](#) ; [Roth et al., 2003](#) ). **Esto se debe no solo a la migración de las células a los sitios de inflamación, sino también a la disfunción y muerte de las células T** ( [Hotchkiss et al., 2005](#) ; [Nakajima et al., 2010](#) ; [Roth et al., 2003](#) ).

La estimulación prolongada del antígeno y la exposición a citocinas proinflamatorias causan el agotamiento y la apoptosis de las células T, lo que conduce a una activación insuficiente de las células B y a la pérdida de las funciones de resolución inmunitaria de las células T y B ( [De Biasi et al., 2020](#) ; [Erickson et al., 2015](#) ; [Kahan et al., 2015](#) ). A pesar de la exuberante inmunidad innata, se ha observado linfopenia en COVID-19 y se correlaciona con un mal resultado ( [De Biasi et al., 2020](#) ; [Diao et al., 2020](#) ).

La caracterización de las células T de los pacientes con COVID-19 encontró un aumento de la expresión superficial de los marcadores de agotamiento, inmunoglobulina de células T y dominio de mucina que contiene-3 (Tim-3) y proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), disminución de la expresión de las vías involucradas en T expansión celular y mayor expresión de vías apoptóticas ( [Diao et al., 2020](#) ; [Wen et al., 2020](#) ; [Xiong et al., 2020](#) ).

Por lo tanto, la disfunción de las células T y B circulantes durante el SDRA puede resultar en una incapacidad para resolver la injuria y perpetuar la inflamación sistémica causada por la tormenta de citocinas.

### **La inflamación patógena de origen innato y la inmunidad adaptativa suprimida durante el SDRA en pacientes con COVID-19 indican una disfunción en la regulación inmunitaria y el cambio de inmunidad innata a adaptativa.**

Para comprender mejor esta respuesta inmune desregulada que lleva a los pacientes a tener una enfermedad más grave por la infección por SARS-CoV-2, utilizamos la secuenciación de ARN de una sola célula (scRNA-seq) para analizar el **transcriptoma** de PBMC recolectadas de pacientes COVID-19 hospitalizados con un curso moderado de la enfermedad (grupo moderado) y aquellos que desarrollaron SDRA (grupo grave).

Se recolectaron muestras dentro de los primeros 5 días de la hospitalización para minimizar la posibilidad de que las intervenciones terapéuticas confundieran la interpretación de los datos.

Como se esperaba, cuando comparamos las muestras de pacientes con COVID-19 con enfermedades agudas (grupos moderados y graves) con muestras de controles sanos, encontramos un enriquecimiento de las vías inmunológicas inducidas por virus.

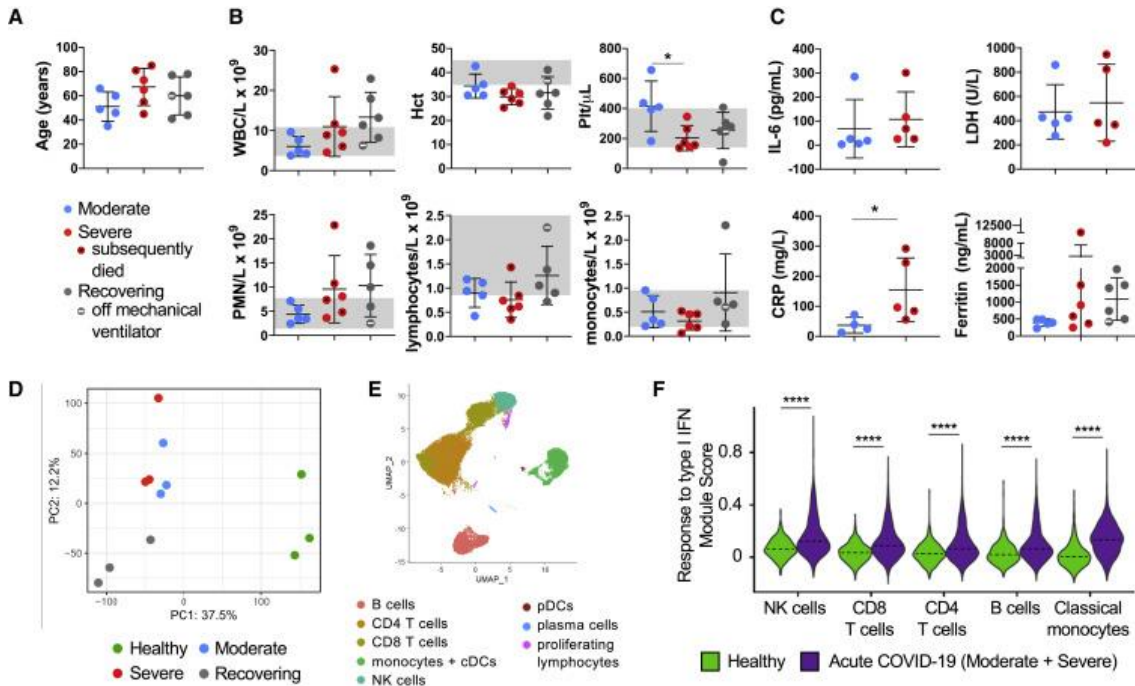
A continuación, enfocamos nuestro análisis en los grupos de pacientes con COVID-19 e investigamos las señales que impulsan la inflamación pulmonar en el SDRA. También delineamos nuevas vías activadas durante la resolución de la inflamación pulmonar al comparar el grupo grave con el grupo en recuperación (es decir, los que se recuperan del SDRA). Los pacientes gravemente enfermos tenían una activación general mayor de las vías inflamatorias que los pacientes moderados y en recuperación. Sin embargo, inesperadamente descubrimos que los pacientes con infección grave por SARS-CoV-2 tenían monocitos con **perfiles transcriptómicos compatibles** con una respuesta de IFN atenuada y desregulación de la presentación de antígenos, así como una actividad citotóxica humoral y linfocitaria defectuosa que podría estar contribuyendo al aclaramiento viral retrasado que se encuentra en casos graves pacientes enfermos de COVID-19. Las implicaciones de estos resultados son clínicamente relevantes e indican que el tratamiento de pacientes con SDRA por infección por SARS-CoV-2 puede requerir un enfoque dirigido en lugar de una terapia inmunosupresora amplia.

## **Resultados**

### **Los pacientes con COVID-19 tienen un estado inmunológico hiperinflamatorio**

Identificamos y recolectamos sangre para muestras de capa leucocitaria de pacientes hospitalizados confirmados con infección por SARS-CoV-2 ( [Tabla S1](#) ). No hubo diferencias significativas en la edad, el recuento de glóbulos blancos, los subconjuntos de células y el hematocrito entre los tres grupos: pacientes con enfermedad aguda con enfermedad moderada, pacientes con enfermedad aguda con enfermedad grave y pacientes en recuperación de SDRA, pero el recuento de plaquetas disminuyó en el grupo

severo versus moderado ( Figuras 1 A y 1B). Utilizando los datos clínicos disponibles, comparamos los niveles de varios marcadores inflamatorios en la sangre entre grupos en el momento de la recolección de la muestra e identificamos un nivel significativamente más alto de proteína C reactiva en pacientes con enfermedad grave, lo que refleja el estado hiperinflamatorio en relación con los pacientes con moderada enfermedad ( Figura 1 C).



Usando scRNA-seq, primero comparamos el transcriptoma de PBMC de controles sanos y pacientes con COVID-19. El análisis de componentes principales (PCA) de las muestras demostró una clara segregación entre los controles sanos y los pacientes con COVID-19, lo que indica que la infección por SARS-CoV-2 **provoca una profunda perturbación en el transcriptoma** de las células inmunitarias circulantes ( Figura 1 D), pero no lo hizo. separe claramente a los pacientes con COVID-19 moderado y grave. Para comprender las vías activadas por la infección por SARS-CoV-2, identificamos cada uno de los principales subtipos de células inmunitarias (células asesinas naturales [NK], células T CD8 y CD4, células B y monocitos; Figura 1 E; Figuras S1 A y S1B; Tabla S2) y realizó un análisis de Ontología Genética (GO) de los genes expresados diferencialmente regulados significativamente hacia arriba y hacia abajo entre pacientes con enfermedad aguda de COVID-19 (grupos moderados y graves) y controles sanos ( Figura S2 ; Tabla S3 ). De acuerdo con su escasez entre las células inmunes circulantes, se capturaron para el análisis insuficientes células dendríticas convencionales y plasmocitoides (cDC y pDC, respectivamente). Los neutrófilos no se identificaron porque, a diferencia de otros subconjuntos de sangre periférica, no toleran el proceso de congelación celular ( Wilk et al., 2020 ).

Como era de esperar, la respuesta al IFN de tipo I se activó en las células inmunitarias periféricas de los pacientes con COVID-19 en comparación con los controles sanos ( Figura 1 F; Figura S2 ; Tabla S3 ).

**Los linfocitos citotóxicos tienen una respuesta de IFN más alta en pacientes con enfermedad grave pero expresión reducida de genes destructores de células**

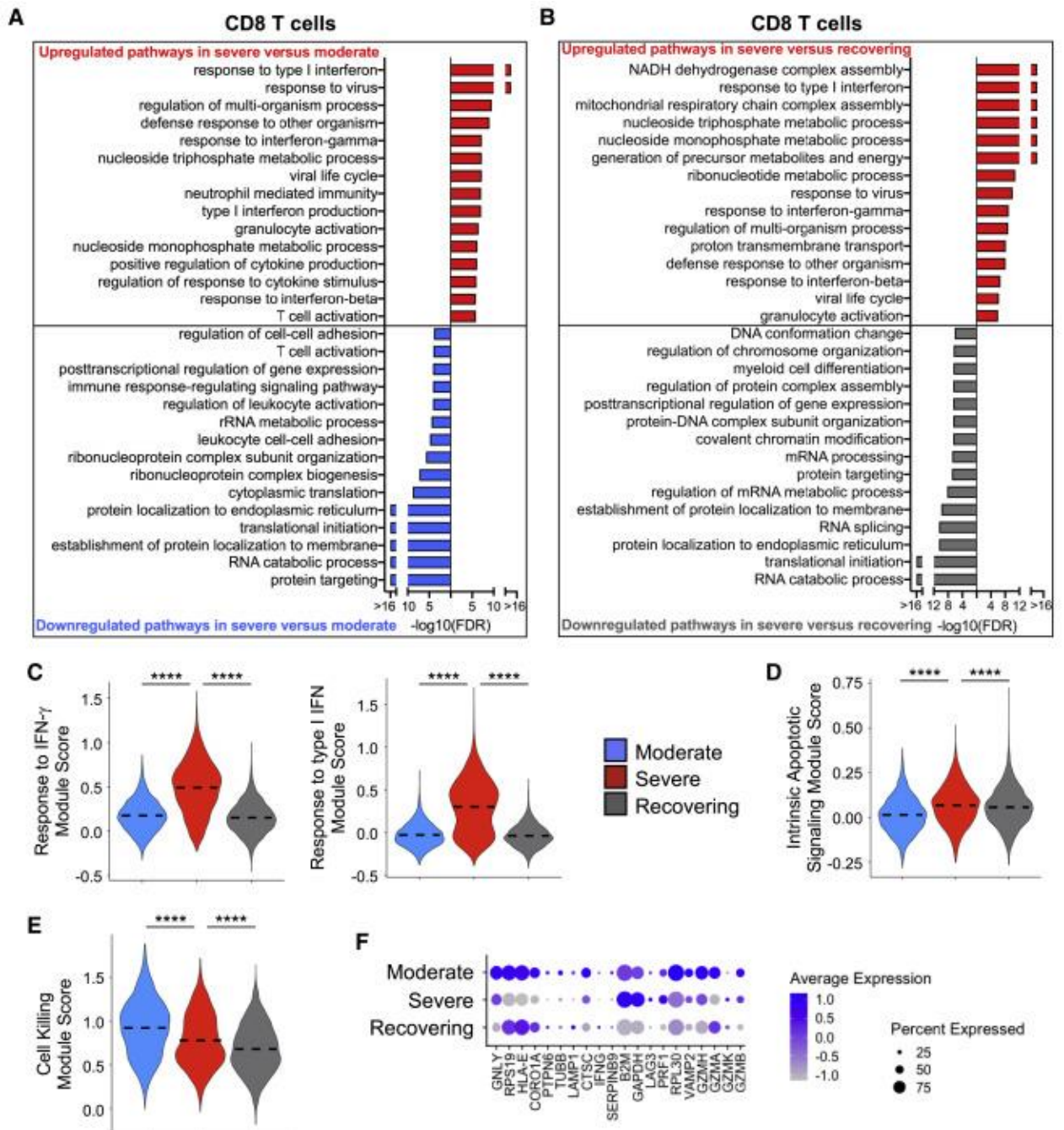
Para comprender por qué algunos pacientes tienen un curso de enfermedad menos grave, mientras que otros desarrollan SDRA, a continuación analizamos las poblaciones de células inmunitarias dentro de los datos de scRNA-seq de pacientes con COVID-19 moderado, grave y en recuperación ( [Figuras S1 C y S1D](#)). **Las células NK son un brazo importante de la respuesta antiviral linfocítica innata ( [Abel et al., 2018](#) ).** Comparamos el grupo moderado con el severo para identificar diferencias en la expresión génica de las células NK que pueden determinar por qué algunos tienen un curso más benigno de la enfermedad en comparación con aquellos que desarrollan SDRA ( [Figura 2](#) ; [Figuras S3 A-S3C](#); [Tabla S4](#)). El análisis de la vía reveló diferencias en el transcriptoma de células NK entre grupos. Se identificaron procesos biológicos que estaban altamente representados por genes regulados al alza y regulados a la baja en pacientes con enfermedad grave en comparación con pacientes con enfermedad moderada ( [Figura 2 A](#); [Tabla S4](#) ). Los pacientes con enfermedad grave tienen cargas virales respiratorias más altas ( [Zheng et al., 2020](#) ).

En consecuencia, los procesos biológicos como la «respuesta al IFN tipo I», la «respuesta al virus», la «respuesta al IFN- $\gamma$ » y la «respuesta al IFN- $\beta$ », entre varios otros característicos de una respuesta viral más importante, se regularon significativamente. en el grupo de enfermedad grave en comparación con el grupo de enfermedad moderada.

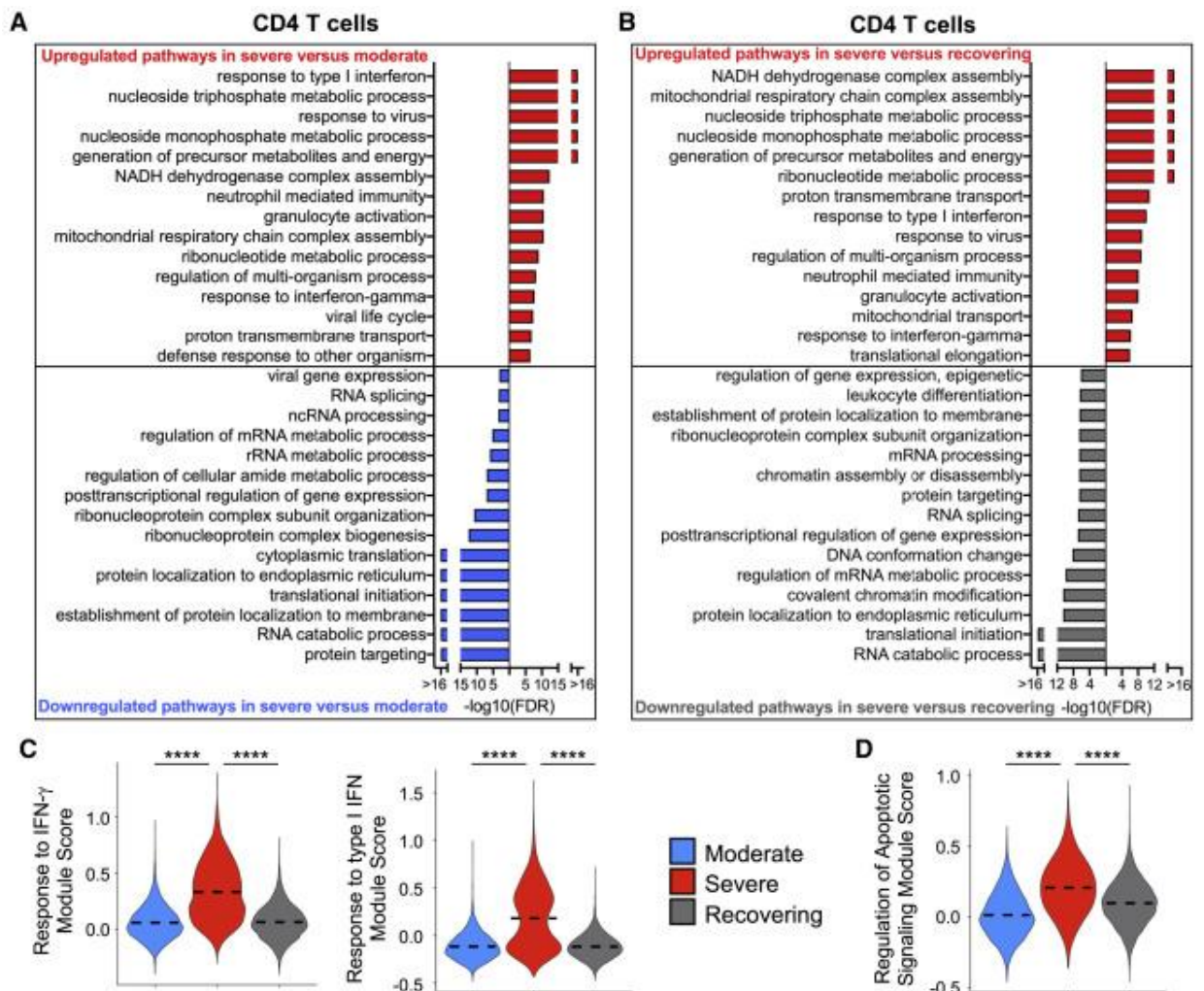
La comparación de los pacientes críticamente enfermos con SDRA durante su enfermedad aguda (es decir, grupo grave) con aquellos que se están recuperando de una enfermedad grave podría proporcionar información sobre las vías que impulsan la inflamación que no se resuelve en la patogénesis del SDRA ( [Matthay et al., 2012](#) ). Por lo tanto, comparamos los procesos biológicos que se vieron afectados por la evaluación de genes regulados tanto hacia arriba como hacia abajo entre los grupos graves y en recuperación ( [Figura 2 B](#); [Tabla S4](#) ). El grupo en recuperación mostró resolución de las vías antivirales, lo que se esperaría de la disminución de la carga viral respiratoria con el tiempo. **La respuesta transcriptómica a los IFN de los tipos I y II se incrementó claramente en las células NK del grupo grave en comparación con los grupos moderados y en recuperación ( [Figura 2C](#); [Figura S3 A](#)).** A pesar de esta respuesta, que refleja una mayor carga viral respiratoria en el grupo grave, **la expresión de genes asociados con la función citotóxica fue menor que en los grupos moderado y en recuperación, lo que sugiere una respuesta antiviral efectora disfuncional de las células NK en pacientes con SDRA ( [Figuras 2 D y 2E](#); [Figuras S3 B y S3C](#)).** La evaluación de los datos como pacientes individuales ( [Figuras S3 A y S3B](#)) en lugar de todas las células de los grupos de pacientes ( [Figuras 2 C y 2D](#)) reveló el mismo patrón de cambios en la señalización de IFN y la función citotóxica.

Realizamos una evaluación similar de los linfocitos T CD8 ( [Figura 3](#) ; [Figuras S3 D-S3G](#); [Tabla S5](#) ) para investigar los procesos biológicos que diferencian la gravedad de la enfermedad y los que se activan durante la fase de recuperación. Las células T CD8 tenían una activación apropiada de la señalización de IFN que se correlacionaba con la gravedad de la enfermedad ( [Figuras 3 A-3C](#); [Figura S3 D](#)). También encontramos una firma genética que indica un aumento de la apoptosis en las células T CD8 del grupo grave, lo que coincide con un informe anterior ( [Merad y Martin, 2020](#) ) y podría estar impulsando la linfopenia asociada con la enfermedad COVID-19 ( [Figura 3 D](#); [Figura S3MI](#)). Curiosamente, las células T CD8 tenían un patrón de expresión génica que sugería una deficiencia en la función citotóxica tanto en el grupo grave como en el de recuperación en comparación con los pacientes con enfermedad moderada ( [Figuras 3 E y 3F](#); [Figuras S3 F y S3G](#)). Aunque se espera este patrón en pacientes en recuperación que han resuelto

la infección por SARS-CoV-2, las vías funcionales citotóxicas alteradas en pacientes con SDR reflejan los hallazgos de las células NK ( Figuras 2 D y 2E).



Evaluaron también los linfocitos T CD4 para determinar las vías biológicas reguladas hacia arriba y hacia abajo en los grupos moderados versus severos y severos versus en recuperación ( Figura 4 ; Figuras S3 H y S3I; Tabla S6 ). De acuerdo con los linfocitos T NK y CD8, el grupo grave tenía un transcriptoma que era indicativo de una respuesta de IFN más alta en las células T CD4 que el grupo moderado, y esto se redujo adecuadamente en los pacientes en recuperación ( Figuras 4 A-4C; Figura S3 H ). Además de la respuesta antiviral, la expresión de conjuntos de genes en las vías metabólicas y apoptóticas se elevó en las células T CD4 en el grupo grave en comparación con los otros grupos ( Figuras 4 A, 4B y 4D; Figura S3YO).



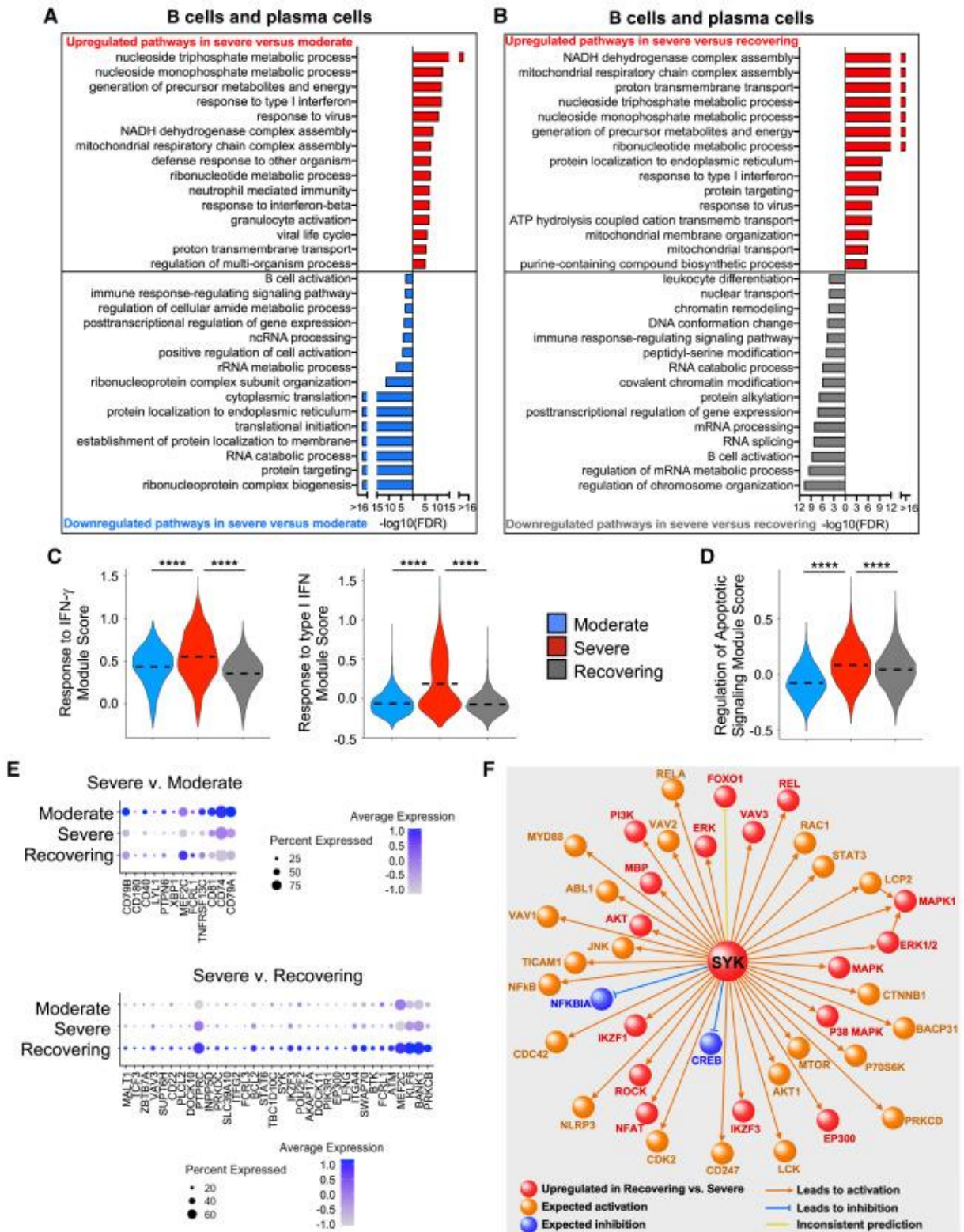
Tomados en conjunto, estos hallazgos transcriptómicos indican que los linfocitos NK y T en pacientes con COVID-19 gravemente enfermos, que tienen títulos virales respiratorios más altos y aclaramiento tardío del SARS-CoV-2 ( [Merad y Martin, 2020](#) ), tienen una respuesta más fuerte esperada al IFN. señalización. Además, los linfocitos T tienen una firma genética consistente con una mayor activación de las vías metabólicas y apoptóticas. Sin embargo, tanto los linfocitos citotóxicos innatos como los adaptativos tienen vías asociadas a la actividad citotóxica disfuncionales en pacientes con COVID-19 gravemente enfermos.

### Las células B tienen perfiles de expresión genética indicativos de activación desregulada en pacientes del grupo grave

Los linfocitos B también juegan un papel importante en la respuesta antiviral ( [Chiu y Openshaw, 2015](#) ). Evaluamos las células B y las células plasmáticas para determinar los genes expresados diferencialmente entre grupos de pacientes ( [Figura 5](#) ; [Figuras S4 A y S4B](#); [Tabla S7](#) ). De manera similar a los linfocitos NK y T, los linfocitos B también tenían cambios en su firma genética que eran consistentes con respuestas mediadas por IFN más altas y activación de señales apoptóticas en pacientes en el grupo grave en comparación con los del grupo moderado y en recuperación ( [Figuras 5 A – 5D](#); [Figuras S4A y S4B](#) ). Además, los cambios transcriptómicos sugirieron que la activación de las células B se incrementó en el grupo en recuperación en comparación con el grupo grave, que es la respuesta esperada durante la fase de recuperación ( [Figura 5 E](#) ). Por el contrario, los



genes de activación de las células B se redujeron en el grupo grave en comparación con los pacientes del grupo moderado, lo que apoya el concepto de que una respuesta humoral retardada podría contribuir a la gravedad de la enfermedad ( Figuras 5 B y 5E).

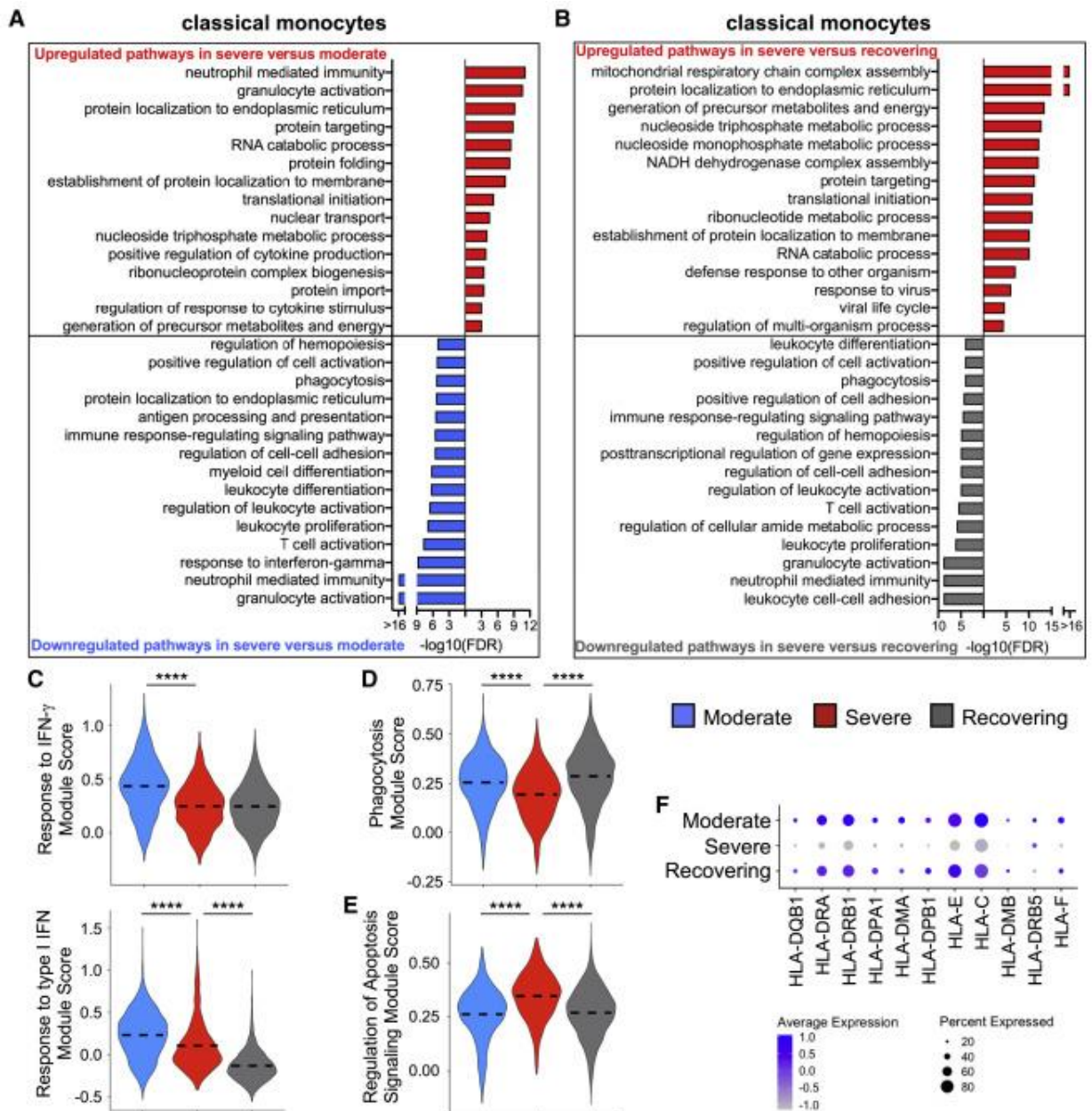


Para comprender las vías que se activan en las células B durante la resolución de la infección por SARS-CoV-2, utilizamos el análisis de la vía del ingenio (IPA) para evaluar las vías canónicas enriquecidas entre los 642 genes que se regularon positivamente en el

grupo en recuperación en comparación con el grupo severo. Las principales vías canónicas enriquecidas entre estos genes fueron la señalización del receptor de células B (tasa de descubrimiento falso [FDR] de  $2,5 \times 10^{-11}$ ), la señalización de IL-3 (FDR de  $4,0 \times 10^{-6}$ ) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) señalización (FDR de  $3,9 \times 10^{-7}$ ), que son señales importantes requeridas para la memoria de las células B y la respuesta humoral ( [Tabla S7](#)). Realizamos un análisis de red causal para comprender las señales ascendentes que regulan la regulación ascendente diferencial de genes en los pacientes del grupo en recuperación en relación con el grupo grave e identificamos la tirosina quinasa del bazo (SYK), que es un controlador crítico de la diferenciación, maduración y la transducción de señales por el receptor de células B, como el principal candidato a regulador aguas arriba entre los genes expresados diferencialmente ( [Figura 5 F](#)) ( [Mócsai et al., 2010](#) ).

### **Los perfiles de expresión génica de monocitos indican que son hiporeactivos en pacientes del grupo grave**

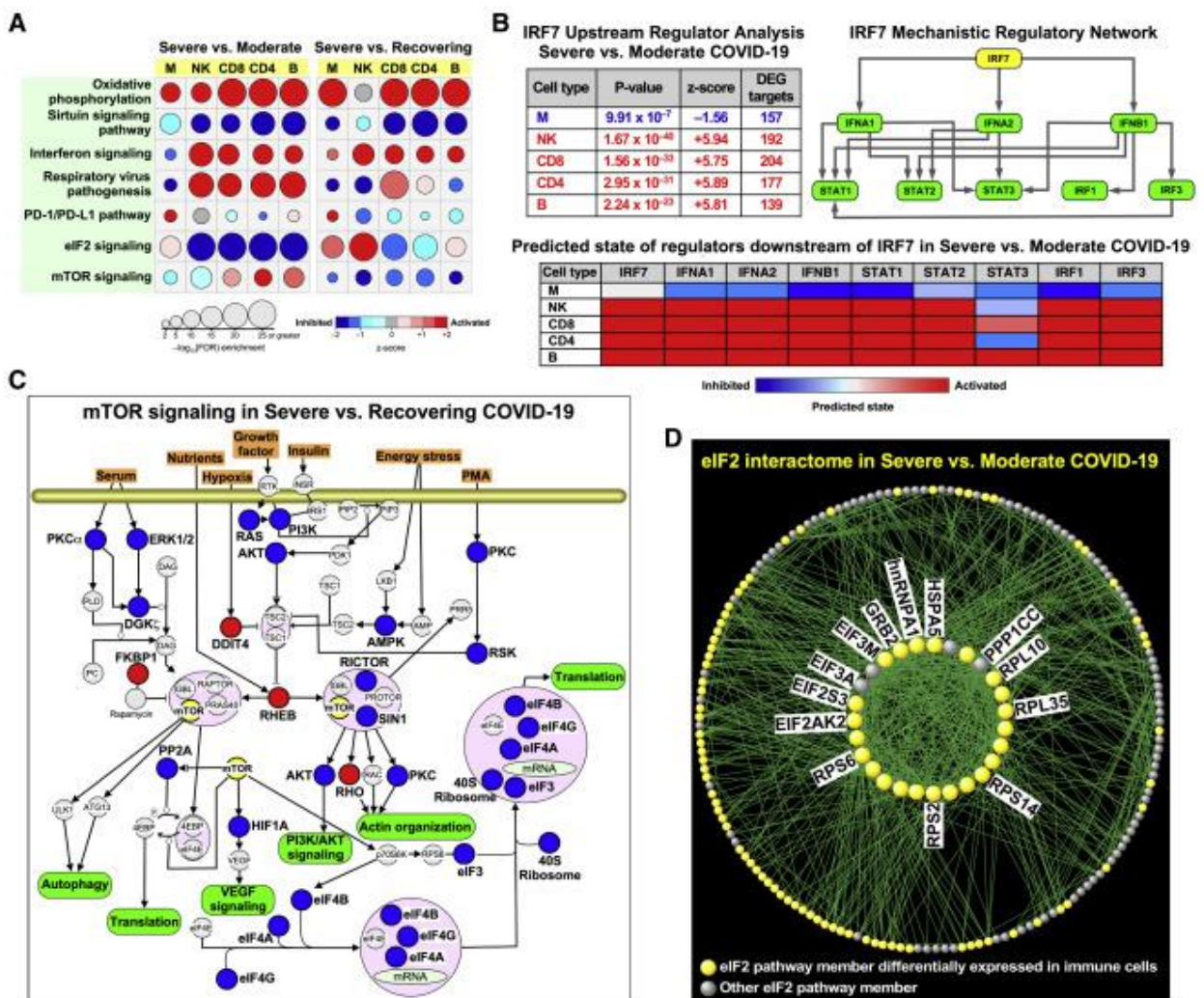
La evidencia emergente demuestra alteraciones en el compartimento mieloide en pacientes con COVID-19 ( [Wilk et al., 2020](#) ). Como era de esperar, los monocitos clásicos comprendían la mayoría de las células ( [Figuras S4 C y S4D](#)). Sorprendentemente, los monocitos clásicos tenían una firma genética consistente con un estado de activación disminuido, fagocitosis alterada y diferenciación alterada en el grupo severo en comparación con el moderado ( [Figuras 6 A y 6D](#) ; [Figura S4 E](#); [Tabla S8](#) ). Esta deficiencia funcional en los monocitos clásicos parece recuperarse durante la resolución del SDRA, lo que sugiere que la mejora en la función de los monocitos podría facilitar la resolución de la inflamación en pacientes con COVID-19 que desarrollan SDRA ( [Figuras 6B y 6D](#); [Figura S4 E](#)). Además, los monocitos del grupo grave tenían más activación de señales apoptóticas ( [Figura 6 E](#); [Figura S4 F](#)) y disfunción en el procesamiento y presentación de antígenos, incluida una menor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC clase I) y MHC clase II ( [Figuras 6 A y 6F](#)). Además, a diferencia de los linfocitos, los monocitos en pacientes gravemente enfermos tenían una respuesta transcriptómica deficiente a la señalización de IFN en comparación con sujetos moderadamente enfermos que podría explicar al menos parcialmente el estado hipofuncional que identificamos en este compartimento celular ( [Figura 6 C](#); [Figura S4 GRAMO](#)).



### Mecanismos potenciales que impulsan la inmunoparálisis de células inmunes específicas

Para evaluar más a fondo los posibles mecanismos que impulsaban las inmunodeficiencias selectivas identificadas dentro de varios compartimentos celulares, realizamos un análisis de la vía canónica con IPA. En contraste con el análisis estándar de GO, donde la activación o inhibición de un proceso se infiere de la regulación ascendente o descendente de sus genes miembros, respectivamente, el análisis de la vía canónica incorpora el conocimiento previo de las consecuencias generales de la regulación ascendente y descendente de los miembros individuales de un proceso en la activación, o suprimir esa vía (por ejemplo, la regulación a la baja de un inhibidor puede conducir a la activación de un proceso). En este análisis, encontramos patrones de enriquecimiento específicos de células; Por ejemplo, las células T CD4 y CD8 tuvieron una activación significativa de la vía de agotamiento de las células T en el grupo severo versus moderado ( [Tabla S9](#) ), que es consistente con otro informe ( [Wilk et al., 2020](#) ).

A continuación, exploramos patrones de cambios en la vía de señalización alterada en todos los compartimentos celulares ( [Figura 7 A](#)). Las vías de fosforilación oxidativa se elevaron uniformemente en el grupo grave en comparación con los grupos moderados y en recuperación, probablemente reflejando el aumento del estado metabólico con una infección más grave. Por el contrario, la señalización mediante sirtuinas, que son mediadores conocidos de las defensas antivirales ( [Budayeva et al., 2015](#) ; [Koyuncu et al., 2014](#)), se suprimió en condiciones severas en todos los compartimentos celulares. Al igual que con nuestra evaluación GO de los procesos biológicos, la señalización de IFN se redujo en los monocitos al comparar los grupos graves con moderados. De manera similar, las vías de señalización viral respiratoria también se suprimieron de manera única solo dentro de los monocitos cuando se compararon grupos graves con moderados. En particular, la señalización de PD-1 / ligando de muerte programada 1 (PD-L1), una vía inhibitoria de puntos de control inmunológico, fue mayor en los monocitos dentro del grupo grave, lo que podría estar contribuyendo a la respuesta suprimida de este compartimento celular.



La señalización de IFN (tipos I y II) fue una vía prominente que se enriqueció repetidamente en nuestra comparación de los grupos severos versus moderados. Usamos IPA para realizar un análisis de regulador aguas arriba para cada tipo de célula (severa versus moderada) basado en el patrón de expresión génica diferencial del tipo celular y también identificamos a IRF7 como uno de los reguladores más significativos constantemente enriquecido en linfocitos ( [Figura 7 B](#)). Construimos una red mecanicista con IRF7 como regulador maestro y encontramos que los componentes de señalización de

IFN tipo I se enriquecieron como nodos altamente interactivos ( [Krämer et al., 2014](#)). Usando este marco, evaluamos cuáles de los componentes jerárquicos se activaron o inhibieron en nuestros datos y descubrimos que los subconjuntos de linfocitos tenían la activación esperada, mientras que los monocitos tenían inhibición de las vías de IFN de tipo I ( [Figura 7 B](#)), lo cual es consistente con nuestro análisis anterior. . También compilamos los genes identificados por análisis de GO en todas las poblaciones de células inmunes para evaluar genes comunes que se enriquecieron en respuesta a la señalización de IFN ( [Figuras S5A – S5C](#)).

Los subconjuntos de linfocitos de pacientes con enfermedad grave tenían respuestas de IFN de tipo I igualmente elevadas (de acuerdo con la expresión mejorada de IRF7). Por el contrario, los monocitos clásicos de los pacientes del grupo grave no respondieron más que los del grupo moderado, con menor expresión de IRF1 e IRF9, quizás debido a la subversión del receptor tipo Toll (TLR) y el gen I inducible por ácido retinoico. (RIG-I) mediante el SARS-CoV-2, como se informó anteriormente para el SARS-CoV-1 ( [Hu et al., 2017](#) ; [Li et al., 2016](#) ; [Siu et al., 2009](#)). De acuerdo con este análisis, el análisis de la vía GO reveló una reducción en la respuesta a IFN- $\gamma$  en comparación con controles sanos y una respuesta de IFN tipo I más débil en monocitos de pacientes graves, lo que contrasta con las respuestas linfocíticas más fuertes ( [Figuras S5 D-S5H](#)).

Finalmente, la señalización del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (eIF2), un objetivo conocido de muchos virus respiratorios ( [Groskreutz et al., 2010](#) ; [Liu et al., 2020](#) ; [Rabouw et al., 2020](#) ), fue la vía más significativamente regulada a la baja en todos los casos células (excepto monocitos) cuando se comparan grupos severos a moderados, mientras que la señalización de la diana de rapamicina (mTOR) en mamíferos estaba deprimida en los grupos severos versus en recuperación ( [Figura 7 A](#)). Investigamos la vía canónica de mTOR en los grupos severos versus en recuperación y notamos que varios procesos de respuesta al estrés y de detección de nutrientes estaban regulados a la baja en pacientes con COVID-19 grave en comparación con aquellos con enfermedad moderada ( [Figura 7C](#)). Para definir mejor cómo se alteraron los componentes de la vía eIF2 en las células inmunes, realizamos un análisis de interacción del producto genético utilizando IPA. Esta red se construyó al incluir inicialmente a todos los miembros asociados a eIF2 y limitar las relaciones de productos genéticos a aquellos con interacciones directas validadas experimentalmente. Observamos que muchos miembros de esta red se expresaron de manera diferencial en pacientes con COVID-19 severo versus moderado, incluidos eIF1 y eIF2, así como una serie de genes ribosómicos como la proteína ribosómica S6 (RPS6) que se informó anteriormente que estaban regulados a la baja en el virus de la influenza. infección ( [Figura 7 D](#); [Tabla S9](#) ) ( [Zhai et al., 2015](#)). Esta sobrerrepresentación fue más pronunciada cuando se evaluaron los nodos de red más conectados, es decir, los concentradores, lo que sugiere que los impulsores clave de la vía eIF2 se ven afectados en la infección grave por SARS-CoV-2.

## Discusión

El SDRA es impulsado por una respuesta inflamatoria desregulada que se ha descrito en gran medida como una «tormenta de citocinas» asociada con pacientes gravemente enfermos infectados con SARS-CoV-2. **Una característica única de la lesión pulmonar que perpetúa el SDRA es una inflamación que no se resuelve incluso después de que el factor desencadenante, en este caso la infección por SARS-CoV-2, se haya resuelto** ( [Matthay et al., 2012](#) ).

Una creciente literatura ha proporcionado una mejor comprensión de cómo la disfunción de las células inmunes contribuye a la respuesta inflamatoria en pacientes con COVID-19 ( [Giamarellos-Bourboulis et al., 2020](#) ).

Varios grupos han adoptado scRNA-seq como un enfoque para interrogar funcionalmente distintos compartimentos inmunes ( [Hadjadj et al., 2020](#) ; [Lee et al., 2020](#) ; [Wen et al., 2020](#); [Wilk et al., 2020](#) ).

Nuestros datos son en gran medida consistentes con esos hallazgos, pero nuestro estudio delinea aún más la profunda desregulación inmunológica en pacientes con COVID-19 con enfermedad grave en comparación con aquellos con síntomas moderados y aquellos que se recuperan de SDRA. Además, nuestros hallazgos fueron consistentes con estudios previos de scRNA-seq que compararon las transcriptomas de PBMC de controles sanos versus pacientes con COVID-19 e identificaron una señal inflamatoria que aumentó con la gravedad de la enfermedad ( [Hadjadj et al., 2020](#) ; [Wilk et al., 2020](#) ).

Centrar nuestro análisis en pacientes con COVID-19 con diversa gravedad nos permitió interrogar en profundidad la disfunción de las células inmunitarias y diferenciar los que tienen una enfermedad moderada de los pacientes que desarrollan SDRA. Nuestro análisis reveló que, aunque la mayoría de los compartimentos de células inmunes tenían una respuesta hiperinflamatoria esperada en pacientes graves, varias vías clave eran disfuncionales en pacientes gravemente enfermos, lo que podría estar contribuyendo a su incapacidad para controlar la infección viral. De hecho, las PBMC del grupo grave tenían una señal transcriptómica que sugería deficiencias en las funciones necesarias para eliminar el virus: destrucción citotóxica en células T NK y CD8, activación de células B y presentación de antígenos alterada por los monocitos. Juntos,

**Una de las primeras características inmunológicas identificadas en los pacientes con COVID-19 fue la disminución de los linfocitos pero hiperactivos** ( [Song et al., 2020](#) ; [Xu et al., 2020](#) ). Nuestros datos sugieren que tanto los linfocitos T CD4 como CD8 tienen una respuesta normal al patógeno viral con la activación de las vías antivirales y un estado hipermetabólico resultante.

En particular, **encontramos un aumento en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en el grupo grave, que podría reflejar una respuesta de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) a la infección por SARS-CoV-2** ( [Moreno-Altamirano et al., 2019](#) ; [Shi et al., 2014](#) ).

También se ha sugerido que la linfocitopenia es el resultado de un aumento de la apoptosis, lo cual es consistente con nuestros hallazgos ( [Vabret et al., 2020](#) ; [Xiong et al., 2020](#) ). Además, nuestro análisis indica que los **linfocitos T CD8 tienen una deficiencia en la destrucción de células que podría estar contribuyendo a la patobiología** del SDRA en pacientes con COVID-19. De manera similar, las células NK tenían una firma transcriptómica que indicaba la muerte efectora defectuosa de las células infectadas por virus en pacientes con enfermedad grave. Los datos clínicos sobre pacientes con COVID-19 informaron una carga viral respiratoria alta y un aclaramiento deficiente en casos de enfermedad grave en comparación con casos moderados ( [Shi et al., 2020](#) ).

Además, los estudios en pacientes con COVID-19 han encontrado que el SARS-CoV-2 persistió más tiempo en muestras respiratorias de pacientes con enfermedad grave que en aquellos con síntomas más leves, y este aclaramiento viral retrasado coincide con más daño pulmonar por la infección ( [Chang et al., 2020](#); [Zheng et al., 2020](#) ).

En conjunto, estos resultados demuestran un defecto funcional en las respuestas linfocíticas citotóxicas innatas y adaptativas en pacientes con COVID-19 con SDRA que podría estar contribuyendo a la gravedad de la enfermedad.

El aclaramiento viral exitoso depende de la inmunidad adaptativa de las células T y de las células B. Mientras que los linfocitos T citotóxicos inducen la apoptosis de las células infectadas por virus, las células T CD4 activan las células B para diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos y células B de memoria ( [Liao et al., 2017](#) ; [Vos et al., 2000](#) ).

**Se ha informado de inmunoglobulina M (IgM) tardía en pacientes con COVID-19 gravemente enfermos, lo que sugiere un defecto en la función de las células B, aunque no está claro si esto se debe a defectos directos en las células B o en las células CD4 Th ( [Shen et al., 2020](#) ).**

**Nuestros hallazgos sugieren que los linfocitos T CD4** tienen una actividad normal a pesar del número reducido descrito en pacientes con COVID-19. Por el contrario, las vías implicadas en la activación de las células B se regularon negativamente en el grupo grave, lo que sugiere una disfunción inherente en el compartimento de los linfocitos B que limita su actividad. Además, SYK, que es esencial para la activación de las células B, se identificó como el regulador aguas arriba más importante que estaba regulado negativamente en las células B dentro del grupo grave ( [Cheng et al., 1995](#) ; [Cornall et al., 2000](#) ). Aunque la recuperación de la infección por SARS-CoV-2 no depende completamente de la función de las células B y la producción de anticuerpos ( [Fallet et al., 2020](#) ), es probable que estas células inmunitarias sigan teniendo un papel importante en el control de la gravedad de la enfermedad, y una respuesta humoral disfuncional puede resultar en títulos virales más altos y aclaramiento viral retardado que podría contribuir al desarrollo de SDRA durante la infección por SARS-CoV-2.

Se ha prestado mucha atención a la disfunción de los linfocitos en COVID-19, en particular a la importancia de las células T citotóxicas para superar la infección viral ( [De Biasi et al., 2020](#) ; [Diao et al., 2020](#) ; [Song et al., 2020](#) ); sin embargo, la diferencia más dramática que encontramos en el grupo grave fue una marcada disminución en la función de los monocitos. Identificamos una activación excesiva del estrés del retículo endoplásmico (RE) en los monocitos con un aumento concomitante de la apoptosis, lo que podría aumentar la muerte de estas células inmunitarias en el grupo grave. Los monocitos de sangre periférica también tenían una deficiencia en su respuesta a la señalización de IFN. La actividad del IFN de tipo I es importante durante una respuesta inmune antiviral adecuada ( [Acharya et al., 2020](#) ), pero un estudio reciente demostró que los pacientes con COVID-19 grave tienen una aparente deficiencia en la señalización del IFN tipo I ( [Hadjadi et al., 2020](#) ). Nuestros hallazgos son congruentes con este hallazgo, pero revelan además que la respuesta deficiente de IFN tipo I emana del compartimento monocítico en contraste con los linfocitos, que tuvieron una respuesta apropiada. Los monocitos circulantes del grupo grave pueden estar mostrando inmunoparálisis ( [Giamarellos-](#)

[Bourboulis et al., 2020](#) ), ya que nuestros resultados implican que no respondían a la señalización de IFN. La pérdida repentina de monocitos y su expresión de MHC es un indicador de enfermedad aguda grave en otras condiciones caracterizadas por una «tormenta de citocinas» como la sepsis y las infecciones adquiridas en la comunidad ( [Cajander et al., 2016](#) ; [Lekkou et al., 2004](#) ). También encontramos que los monocitos se caracterizaron por una disminución de la expresión de genes MHC de clase I y II en el grupo grave, en consonancia con otras descripciones ( [Giamarellos-Bourboulis et al., 2020](#) ; [Wilk et al., 2020](#) ), que puede estar relacionado con una capacidad de respuesta reducida tanto al IFN de tipo I como al IFN- $\gamma$ . En los monocitos se encontró un aumento concomitante de la señalización de PD-1 / PD-L1, lo que podría conducir a una inmunosupresión selectiva en esta población. Además, postulamos que la traducción de proteína suprimida por una respuesta de proteína desplegada aumentada en monocitos puede contribuir aún más al fenotipo de inmunoparálisis identificado en el compartimento mielóide. También identificamos al IRF7 como un regulador maestro que podría estar impulsando la respuesta aberrante del IFN tipo I en condiciones severas, tal vez como consecuencia de la supresión del SARS-CoV-2 de la señalización TLR / RIG-I ( [Hu et al., 2017](#) ; [Li et al., 2016](#) ; [Siu et al., 2009](#) ).

En consecuencia, la presentación de antígenos alterada por los monocitos también puede resultar en el defecto observado en la función de las células T en el grupo grave, lo que resulta en la inhibición de la inmunidad adaptativa aguas abajo necesaria para la eliminación viral y la resolución de la inflamación sistémica ( [Jakubzick et al., 2017](#) ).

Se ha encontrado que varias citocinas están desreguladas en pacientes con COVID-19 ( [Vabret et al., 2020](#) ). Los IFN de tipo I son cruciales para una respuesta inmune antiviral exitosa, y la subversión de la respuesta temprana de IFN de tipo I contribuye a la patogénesis en las infecciones por MERS-CoV, SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 ( [Hadjadj et al., 2020](#) ; [Lee et al., 2020](#) ; [Siu et al., 2009](#) ; [Yang et al., 2015](#) ). Se están realizando ensayos clínicos con terapia con IFN tipo I; sin embargo, este tratamiento puede ser perjudicial si los pacientes ya están regulando positivamente los genes estimulados por IFN. De hecho, nuestro análisis de la vía sugiere que las células inmunes adaptativas tienen una respuesta de IFN normal, pero los monocitos tienen una desregulación selectiva con una respuesta de IFN deprimida en pacientes con COVID-19 grave. Además, **nuestros hallazgos sugieren que los monocitos en pacientes en el grupo grave tienen un defecto inherente en su capacidad para responder a la señalización de IFN**, y esta disfunción puede no mejorarse simplemente tratando a pacientes con alto riesgo de desarrollar SDRA por infección por SARS-CoV-2. con IFN tipo I ( [Acharya et al., 2020](#) ).

**La infección por SARS-CoV-2 de las células inmunitarias puede estar causando la respuesta desregulada en las PBMC.** Sin embargo, las células inmunitarias no expresan la enzima convertidora de angiotensina (ACE2), el receptor necesario para la entrada viral, lo que sugiere una incapacidad para la infección viral ( [Hamming et al., 2004](#) ; [Hoffmann et al., 2020](#) ; [Radzikowska et al., 2020](#) ; [Zou et al., 2020](#) ). Además, no encontramos ninguna evidencia de expresión de ACE2 o ARN viral en nuestra secuencia de ARNc de PBMC (datos no publicados). Estas observaciones hacen menos probable, pero no excluyen la posibilidad, de que **la infección viral de las células inmunitarias esté antagonizando las vías de señalización inflamatoria.**



Una explicación alternativa es que los cambios genéticos, ambientales y relacionados con la edad podrían conferir una predisposición a una respuesta desregulada a las señales proinflamatorias.

Este concepto se ha demostrado previamente donde ciertos individuos han atenuado, mientras que otros han aumentado, respuestas inflamatorias tras la estimulación de LPS de PBMC ([Wurfel et al., 2005](#)).

Recientemente, se descubrió que una mutación de pérdida de función en TLR7 disminuye la respuesta de IFN y se asoció con el desarrollo de COVID-19 severo en un pequeño grupo de hombres jóvenes ([van der Made et al., 2020](#)).

El envejecimiento, un riesgo de enfermedad COVID-19 más grave, también podría estar contribuyendo a la inmunoparálisis ([Ebinger et al., 2020](#) ; [Fulop et al., 2018](#) ; [Grasselli et al., 2020](#) ). De hecho, la señalización de la sirtuina se deprimió uniformemente en todos los compartimentos de células inmunitarias del grupo grave, independientemente de la comparación con los pacientes con COVID-19 moderada o en recuperación. Las sirtuinas son histonas desacetilasas que tienen diversos efectos en la defensa antiviral y el control de la longevidad, la inflamación y la senescencia celular ([Budayeva et al., 2015](#) ; [Imai y Guarente, 2014](#) ; [Koyuncu et al., 2014](#) ).

Las sirtuinas son una clase de enzimas, unas desacetilasas de histona NAD-dependientes, que se encuentran a la vez en las eucariotas. **Afectan al metabolismo celular regulando la expresión de ciertos genes dentro de eucariotas.**

En particular, la actividad de la sirtuina disminuye con la edad, y la inmuno-senescencia podría estar impulsando parte de la respuesta inmune desregulada en pacientes con COVID-19 grave ([Fulop et al., 2018](#) ).

La obesidad es otro factor de riesgo para el desarrollo de COVID-19 grave ([Ebinger et al., 2020](#) ), y las alteraciones inmunometabólicas podrían estar contribuyendo a la respuesta inmune disfuncional en pacientes con COVID-19.

Los efectos inmunomoduladores de la obesidad pueden alterar los brazos innatos y adaptativos del sistema inmunológico y tener efectos profundos en la inflamación de los tejidos ([Hotamisligil, 2017](#) ).

La autofagia tiene un papel destacado en el inmunometabolismo ([Rathmell, 2012](#)), y nuestros hallazgos demuestran la alteración de la señalización de mTOR en múltiples compartimentos celulares de pacientes graves, particularmente en comparación con pacientes en recuperación, lo que sugiere otro posible vínculo con los hallazgos inmunológicos desregulados en pacientes con COVID-19.

En resumen, **este estudio apoya el concepto de que el COVID-19, y especialmente los casos graves que han progresado a SDRA, se caracteriza por una desregulación**

**inmunitaria multifacética que no es uniformemente hiperinflamatoria, sino que se describe con mayor precisión como un estado de desequilibrio inmunológico.**

Aunque las células inmunes tienen firmas inflamatorias aumentadas en pacientes con COVID-19 grave en comparación con los grupos de pacientes moderados y en recuperación, **el análisis transcriptómico sugiere patrones distintos de inmunoparálisis**, como destrucción de células citotóxicas deficiente, activación de células B atenuada y presentación desregulada de antígenos de monocitos que podrían contribuir a la gravedad de la enfermedad. No está claro si las respuestas inmunológicas divergentes en pacientes con un curso de enfermedad moderado versus grave son específicas de la infección por SARS-CoV-2 o generalizables a otras causas infecciosas y no infecciosas de SDRA, y se necesitan investigaciones futuras con tamaños de muestra más grandes para delinear aún más el panorama transcripcional de las células inmunes en diferentes poblaciones de ARDS.

Sin embargo, este estudio sugiere que las terapias deben considerar un enfoque matizado, particularmente aquellas que involucran el aumento dirigido de vías dentro de compartimentos inmunes específicos para limitar la gravedad de la enfermedad y promover la resolución de la inflamación implacable en el SDRA asociado con COVID-19.

Este trabajo tan claro, detallado, respaldado, merece una consideración destacada en todos los ámbitos, por ello lo quise transcribir casi completamente, no fue de lectura fácil, especialmente para un gestor intensivista como yo, pero sí muy claro. No sabemos mucho sobre el mecanismo de las distintas expresiones fenotípicas de la enfermedad, la máxima tensión del mundo científico, con la rapidez que describió la secuenciación del virus, la interpretación de su mecanismo de transmisión, la características de leve moderado o grave, los estudios para evaluar tratamientos. Pero nos falta mucho por investigar, discutir, estudiar y publicar.