

COVID-T: UNA PLATAFORMA FUNCIONAL PARA MONITOREAR
LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T ESPECÍFICOS DE SARS-COV-2
EN INDIVIDUOS VACUNADOS Y RECUPERADOS DE COVID-19

MONTANA N. MANSALLE COCCO^{1*}, FLORENCIA VEIGAS^{1*}, CAMILA A. BACH¹, ADA G. BLIDNER¹,
ALEJANDRO J. CAGNONI¹, TOMÁS D'ALOTTO-MORENO¹, PABLO F. HOCKL¹, YAMIL MAHMOUD¹,
MARCO A. SCHEIDEGGER¹, ALICIA B. SIRINO², NICOLÁS I. TORRES¹, VALERIA WIERSBA³,
GABRIEL A. RABINOVICH^{1, 4}

¹Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME),
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires,

²Hospital General de Agudos Doctor Ignacio Pirovano, Buenos Aires, ³Hospital Universitario Austral, Pilar,
Provincia de Buenos Aires, ⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,
Buenos Aires, Argentina

*Montana N. Manselle Cocco y Florencia Veigas comparten la primera autoría

Resumen La rápida propagación del coronavirus SARS-CoV-2, agente causal de la enfermedad pandémica emergente COVID-19 y sus nuevas variantes, requiere del compromiso de la comunidad inmunológica para comprender la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunológica adaptativa desarrollada por pacientes recuperados de COVID-19 e individuos vacunados con diferentes estrategias y protocolos, a los fines de implementar nuevas políticas sanitarias. En la actualidad, la determinación de la inmunidad contra SARS-CoV-2 se basa principalmente en la detección de anticuerpos específicos y la determinación de su actividad neutralizante. Sin embargo, a pesar de la alta sensibilidad de estos ensayos, un número considerable de pacientes e individuos vacunados carecen de respuesta humoral detectable, o evidencian una disminución rápida de la misma en el tiempo. Con el objetivo de estudiar la respuesta inmune celular desencadenada frente a SARS-CoV-2, en nuestro laboratorio desarrollamos la "Plataforma COVID-T" estrategia integral optimizada dirigida a caracterizar y monitorear la respuesta de linfocitos T específicos de SARS-CoV-2 a partir de muestras de sangre de individuos vacunados y/o recuperados de COVID-19. Esta plataforma permite evaluar la naturaleza, magnitud y persistencia de la inmunidad celular T generada tanto por la infección con SARS-CoV-2, como por distintos esquemas y protocolos de vacunación en diferentes poblaciones de individuos. Asimismo, permite evaluar la respuesta inmunológica T generada frente a nuevas variantes del virus e identificar individuos sanos resistentes a SARS-CoV-2 con inmunidad pre-existente hacia coronavirus estacionales.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, linfocitos T, vacunación, inmunidad

Abstract *COVID-T: A functional platform to monitor SARS-CoV-2-specific T cell responses in vaccinated individuals and COVID-19 recovered patients.* The rapid spread of the SARS-CoV-2, the causative agent of the emergent pandemic disease COVID-19, requires the urgent commitment of the immunology community to understand the adaptive immune response developed by COVID-19 convalescent patients and individuals vaccinated with different strategies and schemes, with the ultimate goal of implementing and optimizing health care and prevention policies. Currently, assessment of SARS-CoV-2-specific immunity is mainly focused on the measurement of the antibody titers and analysis of their neutralizing capacity. However, a considerable proportion of individuals lack humoral responses or show a progressive decline of SARS-CoV-2-specific neutralizing antibodies. In order to study the cellular response of convalescent patients and vaccinated individuals, we have developed the 'COVID-T Platform', an optimized strategy to study SARS-CoV-2-specific T cell responses. This platform allows assessment of the nature, magnitude and persistence of antigen-specific T-cell immunity in COVID-19-convalescent patients and vaccinated individuals. Moreover, it gives the opportunity to study cellular responses against emerging coronavirus variants and to identify individuals with cross-reactive immunity against seasonal coronaviruses.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, T cells, vaccination, immunity

El coronavirus SARS-CoV-2, agente causal de la enfermedad pandémica COVID-19, ha causado efectos devastadores en todo el planeta, incluyendo la muerte de más de 3.9 millones de personas a nivel mundial, más de 105 000 en nuestro país con un dramático impacto socioeconómico^{1,2}.

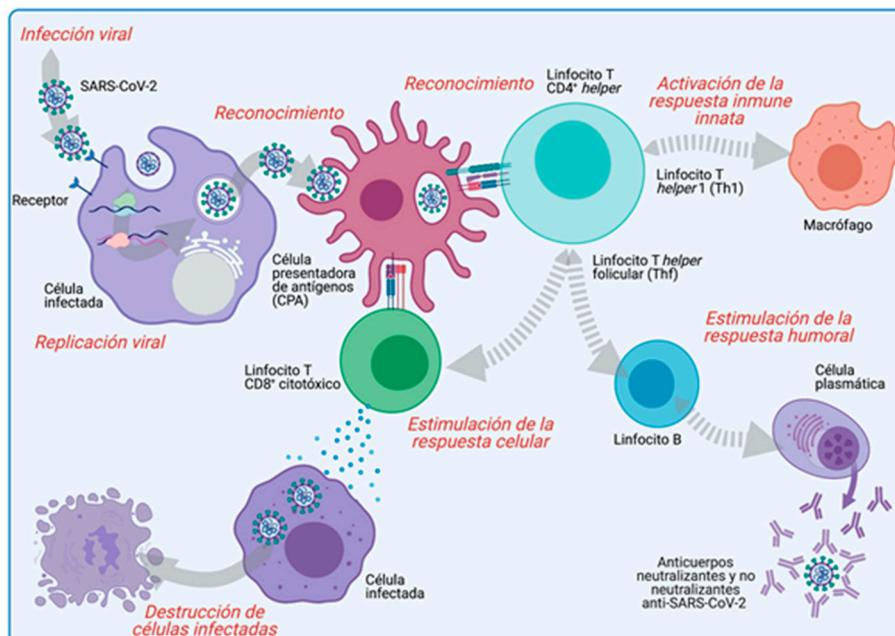
Si bien la mayor parte de los pacientes diagnosticados con COVID-19 desarrollan una enfermedad leve, el 5-10% de ellos cursa una enfermedad grave que requiere hospitalización, y un 2-5% debe ser ingresado en una unidad de cuidados intensivos³. En este último grupo de pacientes, la gravedad de la infección se asocia al desarrollo de un cuadro inflamatorio denominado Síndrome de Destrés Respiratorio Agudo (SDRA) y a fallas multiorgánicas⁴. La rápida propagación de esta pandemia, la falta de terapias específicas, el advenimiento de nuevas variantes virales y la implementación de estrategias de vacunación diversas, exigen el compromiso urgente de la comunidad científica en la comprensión de la naturaleza, magnitud y persistencia de la respuesta inmunológica generada en pacientes recuperados de COVID-19 y en individuos vacunados con diferentes estrategias y dosis, a fines de

tomar decisiones de salud pública basadas en evidencias locales e implementar nuevas políticas sanitarias.

Se ha reportado que los linfocitos T son capaces de controlar múltiples infecciones virales y brindar protección ante subsecuentes re-infecciones mediante la generación de memoria inmunológica (Fig. 1)⁵. En este sentido, es imprescindible comprender la naturaleza y magnitud de la respuesta de linfocitos T antígeno-específicos para el monitoreo de la efectividad de vacunas generadas a partir de diferentes plataformas y basadas en diferentes estrategias [virus inactivados, vectores adenovirales, ácidos nucleicos, proteínas recombinantes y partículas similares a virus (VLP, del inglés *virus-like particles*)].

En lo que respecta a otros coronavirus de la familia (SARS-CoV), se ha observado que los niveles de anticuerpos caen por debajo del límite de detección entre 1 y 3 años⁶, mientras que los linfocitos T de memoria permanecen activos hasta incluso 11 años después⁷. A su vez, estudios recientes, en pacientes recuperados de COVID-19, revelan el valor fundamental de la respuesta de linfocitos T (tanto CD4⁺ como CD8⁺) a fines de monitorear la memoria inmunológica desarrollada como consecuen-

Fig. 1.— Respuesta inmunológica humoral y celular frente a la infección por SARS-CoV-2. Las células presentadoras de antígeno (CPA; ej. células dendríticas) responsables de orquestrar la respuesta inmunológica, reconocen el virus, lo procesan y presentan a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ vírgenes (*naïve*) en ganglios linfáticos, en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo 1 o 2, respectivamente. Los linfocitos T CD4⁺ activados (caracterizados por una alta expresión de citoquinas como IL-2 y moléculas de activación como CD40L/CD154), se diferencian en distintas subpoblaciones celulares, incluidos los linfocitos T *helper* 1 (Th1) productores de IFN- γ y TNF- α , capaces de activar macrófagos y los linfocitos T *helper* foliculares (Thf), productores de IL-21 responsables de cooperar con linfocitos B que, al diferenciarse a células plasmáticas, producen anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes del virus, entre otros. Por otro lado, linfocitos T CD4⁺ activados facilitan la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos responsables de destruir células infectadas por SARS-CoV-2

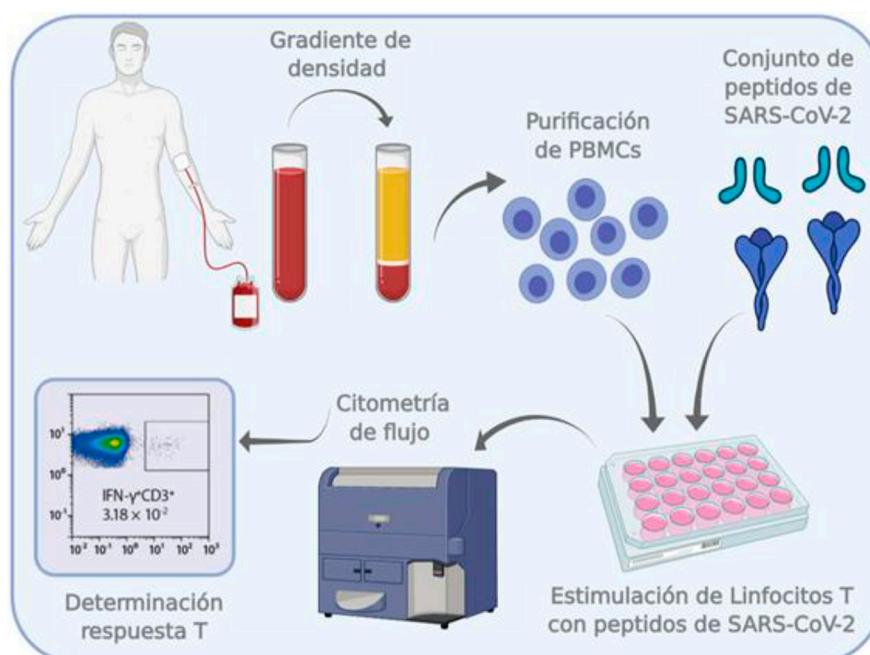


cia de la infección. De hecho, un porcentaje sustancial de pacientes que no presentaron respuesta humoral tras la infección con SARS-CoV-2, sí evidenciaron respuestas específicas mediadas por linfocitos T⁸. En este sentido, Le Bert y colaboradores han propuesto que los pacientes con COVID-19 tendrían la capacidad de desarrollar inmunidad a largo plazo mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de SARS-CoV-2, demostrando la importancia clave de identificar estas poblaciones celulares con el objetivo de caracterizar la memoria inmunológica en sujetos recuperados⁹. A su vez, en función de la diversidad de estrategias de vacunación implementadas en nuestro país y en el mundo y el debate actual respecto a la inmunogenicidad de las mismas, y la duración de sus efectos, resulta de crucial importancia realizar estudios comparativos de la memoria inmunológica generada por las distintas vacunas en poblaciones locales con perfiles similares. Por otro lado, es un gran desafío científico el estudio de respuestas inmunológicas de pacientes recuperados e individuos vacunados frente a nuevas variantes emergentes del SARS-CoV-2. Finalmente, es relevante el estudio de reacciones cruzadas entre linfocitos T de individuos sanos frente a coronavirus estacionales y el SARS-CoV-2⁹⁻¹². En función de estas necesidades, deci-

dimos desarrollar e implementar la Plataforma COVID-T como herramienta para la determinación, caracterización y monitoreo de la respuesta linfocitaria T específica de SARS-CoV-2 en distintas poblaciones de pacientes recuperados e individuos vacunados con diferentes estrategias y esquemas.

En este contexto, se optimizó la metodología para el análisis, caracterización y monitoreo de la respuesta linfocitaria T a partir de muestras obtenidas de sangre de individuos vacunados y de pacientes recuperados de COVID-19 (Fig. 2). Los donantes son reclutados en base a su historia clínica de previa infección con SARS-CoV-2 (leve, moderada o grave) o su participación en los diferentes esquemas de vacunación determinados por los Ministerios de Salud nacionales, provinciales y de la ciudad de Buenos Aires, bajo protocolo aprobado por el Comité de Ética institucional, dependiente del Comité Central de Ética en Investigación del Ministerio de Salud de la Ciudad de Buenos Aires (Código de Registro: 4679). Las muestras requeridas para la optimización de la plataforma fueron provistas inicialmente por el Biobanco del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS, UBA-CONICET), el Hospital General de Agudos "Doctor Ignacio Pirovano" (Ciudad Autónoma de

Fig. 2.– Esquema de trabajo de la plataforma COVID-T. La sangre del paciente o individuo vacunado es centrifugada en gradiente de densidad a los fines de aislar y purificar las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Estas células son cultivadas y estimuladas en presencia o ausencia de péptidos de SARS-CoV-2 *in vitro*. Finalmente, se analiza la producción de citoquinas y la expresión de moléculas de activación por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados, utilizando anticuerpos conjugados a moléculas fluorescentes, por citometría de flujo. La información obtenida se integra en coeficientes que indican la activación celular, de acuerdo a la medición de moléculas de superficie y citoquinas intracelulares.



Buenos Aires) y el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

La metodología central de la Plataforma COVID-T involucra la utilización de muestras de sangre de pacientes recuperados, individuos vacunados o donantes sanos que no posean historia de contagio y cuyos resultados serológicos resulten negativos (ausencia de anticuerpos IgG e IgM contra SARS-CoV-2). Luego de la obtención de la muestra de sangre anticoagulada con EDTA, se procede a la separación de plasma, para el posterior análisis de anticuerpos específicos y neutralizantes de SARS-CoV-2, y al aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés, *peripheral blood mononuclear cells*).

La evaluación de la respuesta de linfocitos T específicos de SARS-CoV-2 se realiza utilizando un conjunto de péptidos seleccionados para activar linfocitos T específicos de SARS-CoV-2. Estos incluyen péptidos S (provenientes de la glicoproteína *Spike*), péptidos S1 (provenientes del dominio S1 de la glicoproteína *Spike*, el cual incluye el sitio de reconocimiento de la enzima convertidora de angiotensina 2; ACE2), péptidos N (provenientes de la proteína de la nucleocápside) y péptidos M (provenientes de la proteína de membrana). Las PBMCs se cultivan en presencia (activación) o ausencia (control negativo sin activar) de los péptidos específicos de SARS-CoV-2. Los controles que se realizan implican: a) un control positivo con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina, y b) un control positivo de activación con péptidos de citomegalovirus (CMV), el cual se encuentra en alta frecuencia en la población, por lo que se pueden detectar respuestas positivas entre 50-100% de los individuos analizados^{13,14} (Fig. 2).

Finalmente, se determina la respuesta de linfocitos T específicos de SARS-CoV-2 mediante citometría de flujo al evaluar la expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Entre ellos, se determina la expresión de CD40L (CD154), molécula cuya expresión se induce tras la activación del receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés, *T cell receptor*), cuyo papel es crucial en la generación de la respuesta humoral al interactuar con CD40 expresado en linfocitos B. Asimismo, se analiza la producción de citoquinas asociadas a una respuesta antiviral tales como interferón γ (IFN- γ), interleuquina-2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . Para ello, tras la activación y estimulación con los péptidos anteriormente mencionados, se incuban las PBMCs con anticuerpos específicos para CD3, CD4, CD8, CD154, IFN- γ , TNF- α e IL-2. Para la discriminación de las células vivas se utiliza una sonda vital. Luego, las muestras se analizan en el citómetro de flujo BD FACSCanto II con el programa BD FACSDiva. Los datos obtenidos se procesan con el programa FlowJo 10.0 (BD) y se grafican con el programa GraphPad Prism 8.0. De esta manera,

se pueden detectar las diferencias en la frecuencia y el fenotipo de las células T específicas de antígeno provenientes de los distintos grupos de pacientes recuperados e individuos vacunados. Finalmente, mediante el análisis multivariado de los parámetros mencionados (citoquinas y marcadores de activación en diferentes subpoblaciones) se genera un coeficiente que permite determinar el grado de activación de la respuesta linfocitaria T. Como resultado en un número de pacientes recuperados e individuos vacunados es posible verificar la presencia de linfocitos T CD4 y T CD8 productores de citoquinas, específicos de SARS-CoV-2, ya que fueron activados en presencia de péptidos específicos pertenecientes al virus.

Por otro lado, se ha observado que individuos que han sufrido infecciones previas con otros coronavirus estacionales presentan linfocitos T de memoria que reaccionan en forma cruzada y podrían potencialmente proteger frente a una infección con SARS-CoV-2⁹. Estos sujetos no vacunados ni infectados previamente con SARS-CoV-2 podrían ser identificados si sus linfocitos se activan al cultivarse con péptidos del virus.

En conclusión, la plataforma COVID-T recientemente implementada permitirá el análisis y monitoreo de la magnitud, naturaleza y persistencia de la respuesta celular, particularmente linfocitos T específicos de SARS-CoV-2, en un amplio espectro de poblaciones que involucran: a) pacientes recuperados de COVID-19 (que cursaron la enfermedad leve, moderada o severa); b) individuos vacunados con diferentes estrategias y protocolos, y c) individuos vacunados de grupos poblacionales de riesgo. Asimismo, este desarrollo brindará la posibilidad de comparar en forma progresiva la respuesta inmunológica de individuos inmunizados con diferentes esquemas de vacunación y pacientes recuperados de COVID-19. Finalmente, la plataforma COVID-T permitirá estudiar la respuesta inmunológica de individuos vacunados y recuperados frente a variantes virales emergentes. Es nuestro deseo que los resultados obtenidos a partir de esta plataforma brinden información relevante para la toma de decisiones y el diseño de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas, no solo en esta pandemia sino en futuros desafíos de Salud Pública, generando una nueva capacidad científico-tecnológica con impacto sanitario y social.

Agradecimientos: Agradecemos a los integrantes del Biobanco del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), y a los Dres. Jorge Geffner y Damasia Becú por su apoyo constante. El desarrollo de esta plataforma fue financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación y el CONICET a través de la Unidad Coronavirus, la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (I+D+i) y Fundación Bunge y Born (COVID-FBB 620), Fundación Williams, Fundación Sales, Edenor, y familias Ferioli y Ostry.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Wu D, Wu T, Liu Q, et al. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis* 2020; 94: 44-48.
2. Hadfield J, Megill C, Bell SM, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* 2018; 34: 4121-3.
3. Zhou P., Yang X-L, Wang X-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270-3.
4. Raoult D, Zumla A, Locatelli F, et al. Coronavirus infections: epidemiological, clinical and immunological features and hypotheses. *Cell Stress* 2020; 4: 66-75.
5. Rosendahl Huber S, van Beek J, de Jonge J, Luytjes W, van Baarle D. T cell responses to viral infections - opportunities for peptide vaccination. *Front Immunol* 2014; 5: 171.
6. Cao WC, Liu W, Zhang PH, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med* 2007; 357: 1162-3.
7. Ng OW, Chia A, Tan AT, et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine* 2016; 34: 2008-14.
8. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol* 2021; 22: 74-85.
9. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020; 584: 457-62.
10. Dan JM, Mateus M, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021; 371: 587.
11. Sherina N, Piralla A, Du L., et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med* 2021; 2: 281-95.
12. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol* 2021; 22: 620-6.
13. Smith CJ, Quinn M, Snyder CM, et al. CMV-specific CD8 T cell differentiation and localization: Implications for adoptive therapies. *Front Immunol* 2016; 7: 352.
14. van den Berg SPH, Warmink K, Borghans JAM, et al. Effect of latent cytomegalovirus infection on the antibody response to influenza vaccination: a systematic review and meta-analysis. *Med Microbiol Immunol* 2019; 208: 305-21.