

# Desarrollo de autoanticuerpos ACE2 después de la infección por SARS-CoV-2

- John M. Arthur ,
- J. Craig Forrest ,
- Karl W. Boehme ,
- Joshua L. Kennedy,
- Shana Owens,
- Christian Herzog,
- Juan Liu,
- Terry O. Harville

Publicado: 3 de septiembre de 2021

## introducción

El SARS-CoV-2 causa un espectro de síntomas conocidos colectivamente como COVID-19 y pueden variar desde una infección asintomática hasta una enfermedad grave. Tanto los pacientes con COVID-19 sintomáticos como asintomáticos pueden tener síntomas de larga duración una vez que la infección ha desaparecido [ 1 ]. Los efectos duraderos se han denominado "Covid prolongado", pero más recientemente, el síndrome se conoce como secuelas posaguda de la infección por SARS-CoV-2 (PASC). Se desconoce la causa de estos síntomas. Dado que no se requieren síntomas agudos para desarrollar PASC, es probable que la causa no se deba a una lesión tisular directa relacionada con la infección. Muchas de las manifestaciones del COVID-19 agudo son causadas por la sobreactivación del sistema inmunológico más que por los efectos directos del virus en el tejido del huésped [ 2 ]. Un mecanismo propuesto para la activación del sistema inmunológico de forma aguda es la inducción del sistema renina angiotensina. La enzima ACE2 es el receptor viral del virus SARS-CoV-2 y se expresa tanto en forma unida a la membrana como soluble. La función biológica de ACE2 es convertir el octapéptido angiotensina II (Ang II) en angiotensina (1-7). La Ang II se une al receptor AT1 para producir activación inmunitaria y otros efectos [ 3 , 4 ]. Ang (1-7) se une al receptor Mas para disminuir la inflamación y producir otros efectos [ 5 ]. Por tanto, la presencia de niveles más altos de proteína ACE2 disminuye los efectos mediados por la activación del receptor AT1, incluida la activación inmunitaria (es decir, el aumento de la actividad ACE2 da como resultado una disminución de la inflamación). La unión de SARS-CoV-2 a ACE2 da como resultado una disminución de la actividad de la enzima [ 6 ]. El resultado neto es un aumento de la inflamación durante la infección por SARS-CoV-2. El sistema inmunológico también está implicado en las secuelas después de la infección por SARS-CoV-2. Por ejemplo, antinucleares [ 7 ], antifosfolípidos [ 8 ] y antiinterferón [ 9 ] se han encontrado anticuerpos después de la infección. Si bien el sistema renina angiotensina (RAS) también podría estar involucrado en la activación inmune en el entorno crónico, no se ha descrito un mecanismo para la activación inmune por RAS. Una posibilidad es que la eliminación persistente de ACE2 dé como resultado cantidades totales más bajas de la enzima. El desprendimiento persistente se produce durante al menos 35 días después de la infección aguda [ 10 ] y se asocia con una disminución de la actividad de la ECA2 unida a la membrana [ 11 ]. Los anticuerpos contra la ECA2 se identificaron previamente en pacientes con enfermedades del tejido conectivo, y la IgG purificada del plasma de estos pacientes puede inhibir la actividad de la ECA2 [ 12 ]. Planteamos la hipótesis de que se desarrolla un autoanticuerpo contra ACE2 después de la infección por SARS-CoV-2. Este anticuerpo podría disminuir la actividad de la ACE2 tanto soluble como unida a la membrana, lo que provocaría la activación de los receptores de Ang II y la activación del sistema inmunológico. Usamos muestras de pacientes con antecedentes de infección por SARS-CoV-2 y controles para mostrar que un autoanticuerpo contra ACE2 está presente en algunos pacientes después de la infección, que los

pacientes que tienen anticuerpos ACE2 tienen menores cantidades de actividad ACE2 soluble y que el plasma de estos pacientes pueden inhibir la actividad de ACE2.

## Métodos

### Grupo

Las muestras humanas y los datos fueron analizados bajo una determinación de sujetos no humanos por la Junta de Revisión Institucional de la UAMS. Las muestras se obtuvieron de muestras residuales en el laboratorio clínico del hospital de la UAMS o de plasma donado. Fueron desidentificados antes del acceso por parte de los investigadores. No formaban parte de un banco existente. Se recolectaron muestras de plasma o suero remanentes de pacientes hospitalizados en el hospital de la UAMS con una prueba de PCR positiva para SARS-CoV-2 (15 pacientes) y de clínicas ambulatorias (33 pacientes). Las muestras remanentes se recolectaron de sangre extraída con fines clínicos y se planificó su eliminación después de cinco días de refrigeración. De los pacientes ambulatorios, 20 tuvieron una prueba positiva del virus de la PCR del SARS-CoV-2 y 13 tuvieron una prueba negativa. También obtuvimos 32 muestras de plasma de donantes de plasma para su uso en el tratamiento de plasma convaleciente. Estas muestras se obtuvieron de pacientes que tenían una prueba de virus positiva conocida por PCR y que no habían presentado síntomas durante al menos dos semanas antes de la donación de plasma. No hubo otros criterios de inclusión o exclusión. Nos referimos a estos grupos como: pacientes hospitalizados +, pacientes ambulatorios +, pacientes ambulatorios y convalecientes +.

### Ensayos ELISA para anticuerpos SARS-CoV-2 y ACE2

Cincuenta microlitros de una solución de proteína recombinante del dominio de unión al receptor del SARS-CoV-2 (2 µg / mL, plásmido de BEI) o proteína ACE2 recombinante (2 µg / mL, SinoBiologicals) en tampón de carbonato (0.0125 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.0875 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,4) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos ImmunoGrade de alta unión (MidSci) y se revistió durante la noche. Para determinar la presencia y concentración de anticuerpos en plasma o suero, las muestras se diluyeron 1:50 en 1% de leche en polvo PBS-T (1X PBS, 0.1% Tween-20) y se agregaron a pocillos duplicados durante 2 horas, seguido de peroxidasa. Anticuerpo conjugado de cabra anti-IgG humana + IgM (JacksonImmuno) diluido a 1: 5000 en leche en polvo al 1% PBS-T. Se añadieron setenta y cinco microlitros de una solución que contenía tetrametilbencidina (SeraCare-Solución SureBlue TMB) y se detuvo después de 5 minutos con 75 µL de solución de HCl al 1% (solución de parada SeraCare-TMB). Se determinó la densidad óptica a 450 nm. El valor de un control de pocillo en blanco se restó para obtener el valor final y se informó como DO (450 nm). Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se utilizó el valor medio de los dos pocillos para el análisis. Los valores de corte para una prueba positiva se definieron como la media de los controles negativos más 3 desviaciones estándar. Los valores de corte son 0,60 para el anticuerpo RBD y 0,1106 para el anticuerpo ACE2.

### Ensayo ELISA para la proteína ACE2 soluble en plasma

Usamos un ELISA de Raybiotech (Norcross, GA) para medir la concentración de proteína ACE2 soluble en plasma siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se diluyeron 8 veces y se cargaron por duplicado en placas de 96 pocillos prerrevestidas con un anticuerpo contra ACE2 humana. Las placas se incubaron durante 2,5 horas, se lavaron y se incubaron con un anticuerpo de detección biotinilado durante 1 hora. Las placas se lavaron e incubaron con solución de estreptavidina conjugada con HRP durante 45 min. Las placas se lavaron y se incubaron con reactivo de sustrato de un paso de TMB (tetrametilbencidina) durante 30 min. La reacción se detuvo

con ácido sulfúrico 0,2 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Se cargó una dilución en serie de ACE-II recombinante por duplicado y sirvió como curva estándar.

## **Ensayo de actividad para la actividad de la enzima ACE2 en plasma**

Usamos un ensayo de actividad fluorométrica de Sigma (St. Louis, MO) para medir la actividad de la enzima ACE2 soluble en plasma siguiendo las instrucciones del fabricante: Las muestras de plasma se diluyeron 1: 5 en tampón de lisis ACE2. Se incubaron 5 µl con 45 µl de tampón de ensayo durante 15 min. Se agregaron 50 µl de mezcla de sustrato ACE2 que contenía un conjugado de péptido-MCA (4-metilcumarina-7-acetato) y se registró el cambio en la fluorescencia (Ex 320 nm / Em 420 nm) durante 30 min en un SpectramaxM5 (Molecular Devices: San Jose , CA). Se usó tampón de lisis como control de fondo, se usó ACE2 recombinante como control positivo. Para distinguir la actividad de ACE2 de otras enzimas proteolíticamente activas, también se midió la actividad de las muestras en presencia de un inhibidor de ACE2 específico. Para el control negativo, se añadió inhibidor de ACE2 a los controles positivos.

## **Ensayo del inhibidor de ACE2**

Usamos el kit de ensayo de detección de inhibidores de ACE2 de AMSBIO (Cambridge, Mass) para medir la capacidad del plasma o el suero de los pacientes de nuestras cohortes para inhibir la actividad de ACE2. Se siguieron las instrucciones del fabricante. El ensayo utiliza un sustrato fluorescente que es un análogo de Ang II. La escisión del sustrato por ACE2 elimina la fracción 2,4-dinitrofenilo que apaga la fluorescencia de la fracción 7-metoxicumarina, lo que da como resultado un aumento de la fluorescencia [ 13 ]. Agregamos 5 µL de plasma o suero al ensayo con un volumen final de 50 µL. El porcentaje de inhibición se determinó comparando la condición de control con el pocillo con plasma o suero añadido. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se utilizó el valor medio de los dos pocillos para el análisis.

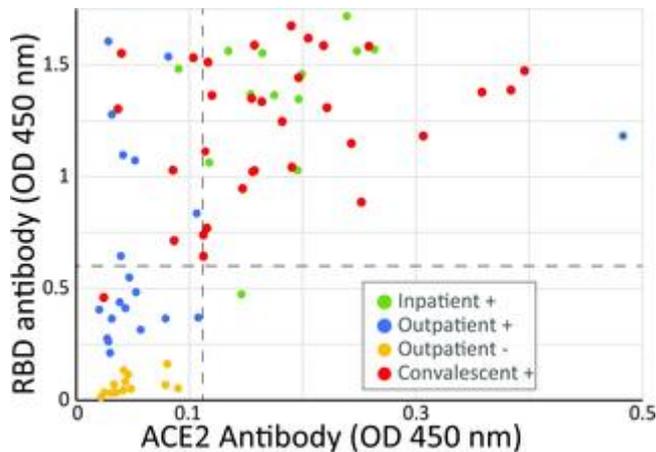
## **análisis estadístico**

Todos los datos utilizados para este manuscrito se encuentran en la tabla de datos de apoyo denominada [Tabla S1](#). Se hicieron comparaciones entre los pacientes que tenían un nivel de anticuerpos ACE2 por encima del umbral de corte y los pacientes que no tenían un nivel de anticuerpos ACE2 por encima del umbral. La comparación estadística de estos grupos se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney. La comparación de las diferencias entre los valores medios de los grupos para la concentración de anticuerpos y el cambio porcentual de la actividad de ACE2 causada por la adición de plasma se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Las barras de error representan el error estándar de la media.

## **Resultados**

El anticuerpo contra el SARS-CoV-2 RBD estaba presente en el 93% del grupo de pacientes hospitalizados + y el 97% de los pacientes convalecientes +, pero solo en el 40% del grupo de pacientes ambulatorios + y en ninguno de los pacientes del grupo de pacientes ambulatorios ( [Fig.](#)). El anticuerpo contra la ECA2 estaba presente en el 93% de los pacientes hospitalizados + y el 81% de los pacientes convalecientes +, pero estaba por debajo del valor de corte en todos menos uno de los pacientes ambulatorios + y todos los pacientes ambulatorios-. Las densidades ópticas medias para los grupos de pacientes hospitalizados + y convalecientes + fueron estadísticamente diferentes de los grupos de pacientes ambulatorios + y pacientes ambulatorios (P <0,01). En general, de los 27 pacientes que tenían abundancia de anticuerpos RBD por debajo del nivel de corte, solo uno (4%) tenía anticuerpos ACE2. De los 53 pacientes que tenían anticuerpos RBD por encima del valor de corte, 40 (75%) tenían anticuerpos ACE2. Estos datos indican que el desarrollo de anticuerpos

específicos contra el SARS-CoV-2 se correlaciona con el desarrollo de anticuerpos contra ACE2. Para un análisis más detallado, dividimos a los pacientes en un grupo que tenía anticuerpos ACE2 por encima del umbral de corte (+, 41 pacientes) y aquellos que no tenían anticuerpos por encima del umbral (-, 39 pacientes). El número de pacientes que tenían y no tenían anticuerpos ACE2 de cada una de las ubicaciones donde se recolectaron las muestras se muestra en [Cuadro 1](#).



**Fig 1. Abundancia de anticuerpos que reconocen la proteína SARS-CoV-2 RBD y ACE2 en plasma o suero.**

La línea de puntos representa los valores de corte para una prueba de anticuerpos positiva que se definió como el valor de la media de los controles negativos más 3 desviaciones estándar.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g001>

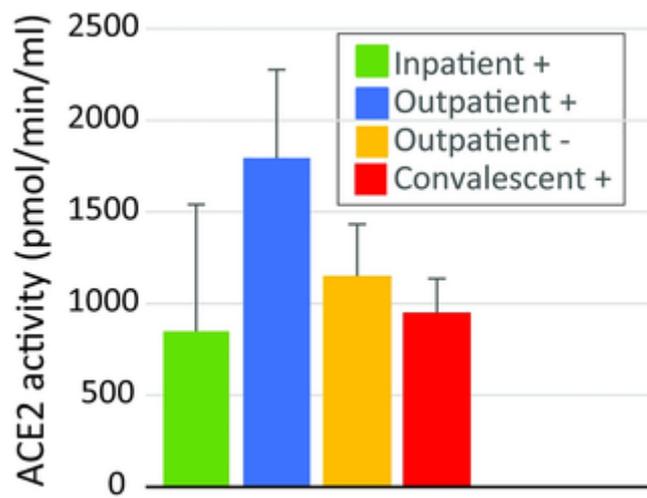
	Inpatient +	Outpatient +	Outpatient -	Convalescent +	Total
ACE2 Antibody +	14	8	9	20	51
ACE2 Antibody -	1	19	13	6	39
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>27</b>	<b>22</b>	<b>26</b>	<b>90</b>

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.t001>

**Tabla 1.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.t001>

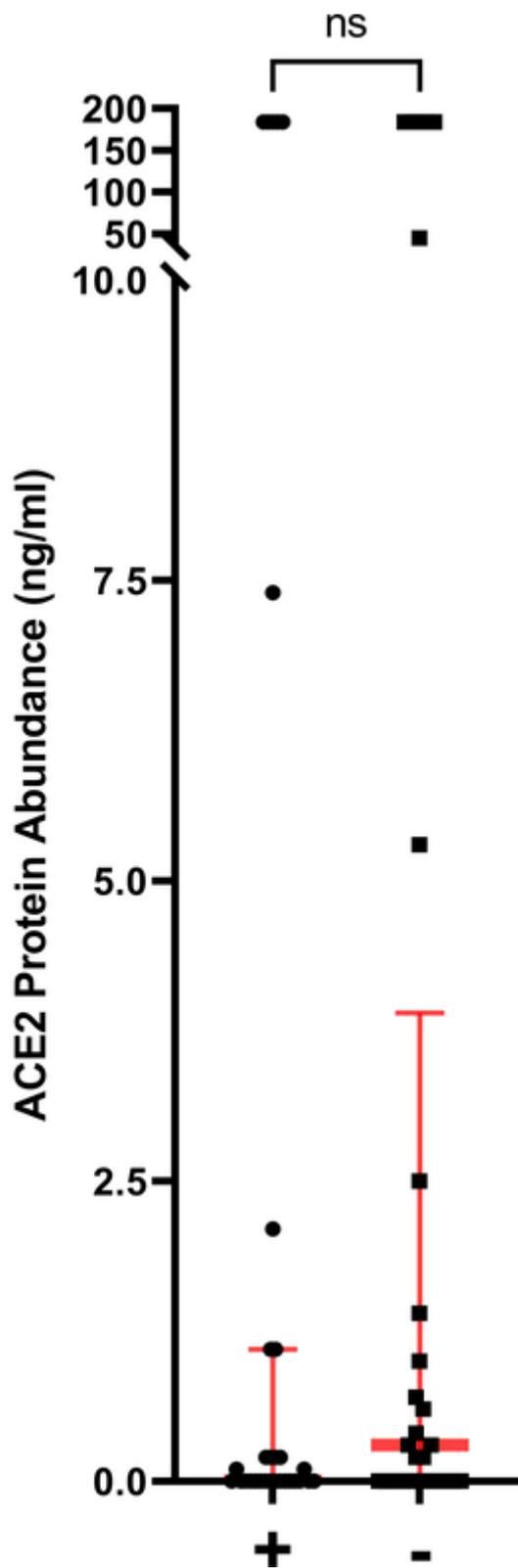
Comparamos la cantidad de proteína ACE2 soluble en plasma y la actividad de ACE2 soluble en plasma. No hubo diferencias en la concentración de proteína ACE2 en plasma. Tampoco hubo una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de ACE2 soluble en plasma cuando comparamos los grupos de recolección ( [Fig. 2](#) ). Cuando comparamos los 41 pacientes que tenían un anticuerpo ACE2 con los 39 que no lo tenían, no hubo diferencia estadística en la abundancia de proteína ACE2 en el plasma entre el grupo de pacientes que tenían y no tenían un anticuerpo ACE2 ( [Fig. 3](#) ). La abundancia mediana del grupo con un anticuerpo ACE2 fue 0 ng / ml (IQR 0.0-1.1) y el valor mediano del grupo que no tenía un anticuerpo ACE2 fue 0.3 ng / ml (IQR 0-3.9). Por el contrario, la actividad de ACE2 soluble en el plasma de pacientes que tenían un anticuerpo de ACE2 fue menor que la actividad de los pacientes que no tenían un anticuerpo de ACE2 ( [Fig. 4](#) ,  $p < 0,01$  ). La mediana de la actividad de ACE2 soluble en pacientes con un anticuerpo ACE2 fue 263 pmol / min / ml (IQR 0-1039) en comparación con 1056 (IQR 457-2230) para aquellos que no tenían un anticuerpo.



**Fig. 2. Actividad de la enzima ACE2 en los cuatro grupos de recogida.**

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

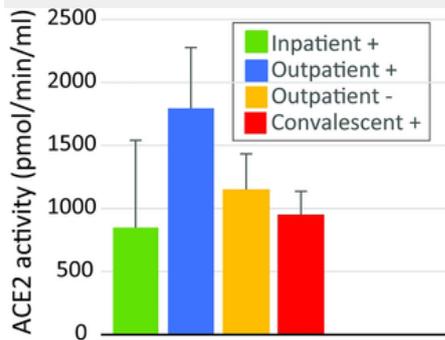
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g002>



**Fig 3. Abundancia de proteína ACE2 soluble en plasma de pacientes que tenían anticuerpos ACE2 en plasma en comparación con aquellos que no los tenían.**

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la proteína ACE2 entre los grupos. El grupo marcado con + tenía anticuerpos ACE2 y el grupo marcado con - no tenía anticuerpos ACE2. (ns = no significativo).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g003>

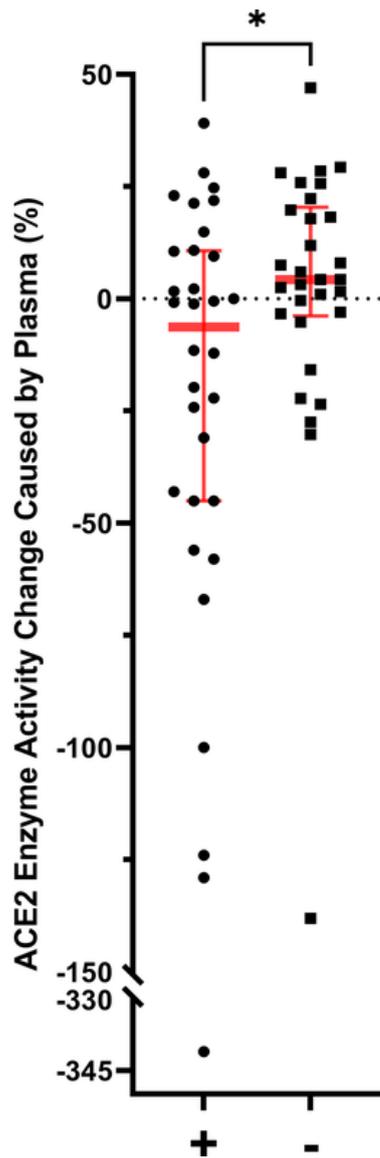


**Fig 4. Actividad de la proteína ACE2 soluble en plasma de pacientes que tenían anticuerpos ACE2 en plasma en comparación con aquellos que no los tenían.**

La actividad de la enzima en plasma disminuyó en pacientes que tenían un anticuerpo ACE2 presente. Las barras muestran valores medios y las barras de error muestran el error estándar de la media (\*\*  $p < 0,01$ ). El grupo marcado con + tenía anticuerpos ACE2 y el grupo marcado con - no tenía anticuerpos ACE2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g004>

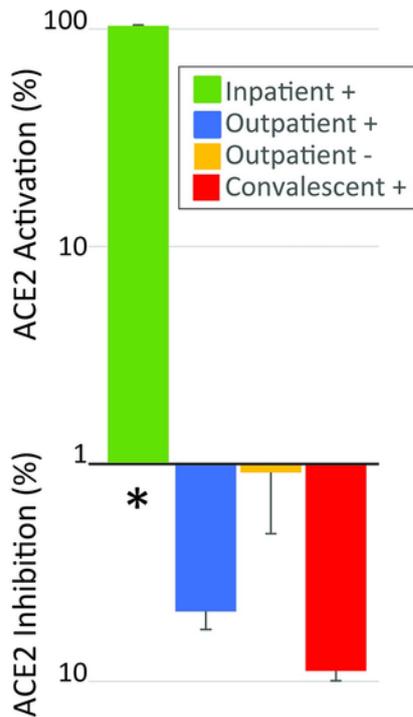
Para determinar si la adición de plasma que contenía un anticuerpo ACE2 se asoció con la inhibición de la actividad de la enzima ACE2, agregamos plasma a un ensayo en el que estaba presente una fuente exógena de ACE2 y su sustrato ( Fig 5). Comparamos la actividad del ensayo después de que se agregó plasma de los 41 pacientes que tenían un anticuerpo por encima del nivel umbral a la actividad del ensayo cuando se agregó el plasma de los 39 pacientes que no tenían una concentración de anticuerpos ACE2 por encima del umbral. La adición de plasma que contenía un anticuerpo ACE2 inhibió la actividad de la enzima ACE2 en comparación con la adición de plasma sin un anticuerpo (-6,3, IQR-45,0 a 10,8% frente a 4,3, IQR -3,8 a 20,4%,  $p < 0,05$ ). Además de comparar los grupos con y sin anticuerpos, comparamos la capacidad del plasma de cada uno de los cuatro grupos de recolección para alterar la actividad del ensayo de ACE2 exógeno. La adición de plasma o suero del grupo de pacientes hospitalizados + dio como resultado la activación de la actividad de ACE2 ( $102 \pm 23\%$ ), que fue estadísticamente diferente ( $P < 0,05$ ).



**Fig 5. Cambio en la actividad de ACE2 exógena después de la adición de plasma de pacientes que tenían anticuerpos ACE2 en plasma (+) en comparación con aquellos que no los tenían (-).**

El plasma de pacientes con un anticuerpo ACE2 presenta una actividad disminuida de ACE2. Las barras muestran valores medios y las barras de error muestran el error estándar de la media (\*\*\*)  $p < 0,05$ ).

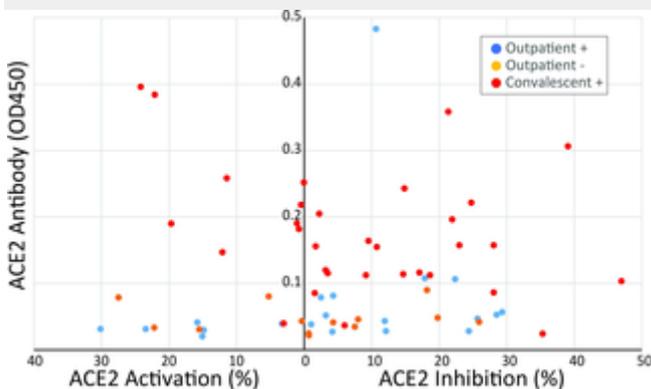
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g005>



**Figura 6. Cambio medio en la actividad de ACE2 entre grupos de pacientes después de la adición de plasma o suero al ensayo de actividad.**

La adición de plasma provocó la activación en el grupo de pacientes hospitalizados +. \*  $p < 0,01$  frente a todos los demás grupos.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g006>



**Fig 7. Inhibición de la actividad de ACE2 por plasma.**

La abundancia del anticuerpo ACE2 se representa frente al cambio en la actividad de ACE2 después de la adición de plasma.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.g007>

## Discusión

Encontramos que los anticuerpos específicos de ACE2 están presentes en pacientes después de la infección por SARS-CoV-2. Estos anticuerpos pueden desarrollarse temprano en el proceso de la enfermedad, ya que se detectaron en el 93% de los pacientes hospitalizados por COVID-

19. Curiosamente, solo uno de los veinte pacientes ambulatorios con una infección conocida por SARS-CoV-2 tenía anticuerpos ACE2. Es posible que estos pacientes aún no hayan tenido tiempo de desarrollar anticuerpos ACE2. Sin embargo, debido a que usamos muestras residuales que habían sido desidentificadas, no conocemos el momento de la infección en relación con la recolección de muestras. Esta es la primera demostración de anticuerpos anti-ACE2 en pacientes con infección por SARS-CoV-2. Es probable que los primeros anticuerpos sean IgM y los últimos IgG, aunque nuestro ensayo no diferencia entre estos subtipos. Dado que los anticuerpos anti-ACE2 se detectaron casi exclusivamente en pacientes que han formado anticuerpos contra el RBD del SARS-CoV-2, es probable que se trate de anticuerpos antiidiotípicos. La diferencia en el porcentaje de sujetos con anticuerpos ACE2 podría deberse al momento de la recolección de la muestra en relación con la infección, pero también podría deberse a la gravedad de la enfermedad. Wang y col. demostró que los pacientes con COVID-19 exhiben aumentos en los autoanticuerpos en comparación con los controles sanos y que los pacientes con una enfermedad más grave desarrollan niveles más altos de autoanticuerpos [pero también podría deberse a la gravedad de la enfermedad. Wang y col. demostró que los pacientes con COVID-19 exhiben aumentos en los autoanticuerpos en comparación con los controles sanos y que los pacientes con una enfermedad más grave desarrollan niveles más altos de autoanticuerpos [pero también podría deberse a la gravedad de la enfermedad. Wang y col. demostró que los pacientes con COVID-19 exhiben aumentos en los autoanticuerpos en comparación con los controles sanos y que los pacientes con una enfermedad más grave desarrollan niveles más altos de autoanticuerpos [14].

Los anticuerpos antiidiotípicos son anticuerpos específicos de la región de unión al antígeno de un anticuerpo del huésped que reconoce una proteína extraña [15]. En este caso, el anticuerpo 1 es el anticuerpo del huésped que reconoce la proteína viral RBD. El anticuerpo 2 es un anticuerpo antiidiotípico del huésped que reconoce el dominio de unión del anticuerpo 1. Algunos de estos anticuerpos también reconocen la pareja de unión de la proteína viral original. En este caso, el socio de unión es la proteína ACE2 del huésped. Este subconjunto de anticuerpos antiidiotípicos se denomina imagen interna [16] u homocuerpos [17]. Por lo tanto, después de desarrollar un anticuerpo que reconoce el RBD del SARS-CoV-2, el huésped puede desarrollar un anticuerpo que reconoce y potencialmente inhibe su propia enzima ACE2. Este es un mecanismo por el cual los virus desencadenan autoanticuerpos que causan enfermedades autoinmunes [18]. Especulamos que los autoanticuerpos observados en estos pacientes pueden ser anticuerpos antiidiotípicos. En la infección por SARS-CoV-2, pueden ser relativamente comunes ya que un anticuerpo contra ACE2 estaba presente en el 93% de los pacientes hospitalizados + y el 81% de los pacientes convalecientes + en nuestra cohorte.

Tres cuestiones no resueltas con respecto a la respuesta al SARS-CoV-2 se pueden explicar potencialmente utilizando la teoría de redes del sistema inmunológico de Jerne [16]. En primer lugar, como hemos comentado, la formación de anticuerpos antiidiotípicos contra la proteína pico del SARS-CoV-2 podría dar lugar a anticuerpos anti-ACE2, como parte de la homeostasis normal de la función del sistema inmunológico. En segundo lugar, hay datos anecdóticos que sugieren que los pacientes que experimentan PASC y que se vacunan con una vacuna contra el SARS-CoV-2 pueden tener una mejoría. Esto también está alineado con la teoría de redes de Jerne, ya que la vacuna puede inducir al sistema inmunológico a equilibrar los anticuerpos idiotípicos y antiidiotípicos para el control homeostático. En tercer lugar, desde principios del proceso de la enfermedad COVID-19, hay informes de que los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 duran solo unos pocos meses. De nuevo, esto es coherente con la teoría de Jerne, en el sentido de que los mecanismos de control inmunológico deberían limitar típicamente la producción de un anticuerpo autoinmune, que podría resultar en una enfermedad. Por lo tanto, las interacciones idiotipo / anti-idiotipo, teniendo el anti-idiotipo potencial autoinmune, podrían resultar en una regulación negativa del anticuerpo idiotípico (equilibrio

homeostático). Dado que la vida media de la IgG es de 21 a 28 días, es plausible una pérdida significativa de las respuestas de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 durante 6 a 9 meses.

La mayor parte de la conversión de Ang II en Ang (1-7) en tejidos como el riñón se debe a la ECA2 unida a la membrana [ 19 ]. La ECA2 unida al tejido se puede escindir y circula en el plasma en forma soluble; sin embargo, la mayor parte de la conversión de ANG II en el plasma se debe a la enzima proiloligopeptidasa y, en menor medida, a la proilicarboxipeptidasa [ 19 ]. Medimos la concentración plasmática de la proteína ACE2 y la actividad de la ACE2 plasmática soluble para determinar si había una diferencia en estas mediciones entre los pacientes con y sin anticuerpos ACE2. Recientemente, ha habido informes de aumentos en la actividad de ACE2 soluble en pacientes con COVID-19 agudo o recuperado. El informe de un caso de un solo paciente con COVID-19 grave mostró que el paciente había aumentado la actividad de ACE2 alcanzando un pico aproximadamente 40 veces más alto que los niveles normales alrededor del día 10 y disminuyendo gradualmente a partir de entonces [ 20 ]. Un segundo estudio mostró que la actividad de ACE2 soluble estaba elevada en pacientes con SRAS-CoV-2 recuperados una media de 35 días después de la infección en comparación con los controles sanos [ 10 ]. Además, la actividad de ACE2 fue mayor en el grupo con COVID-19 más grave en comparación con aquellos con enfermedad más leve. Por el contrario, nuestro estudio no mostró un cambio en la actividad de ACE2 soluble en ninguno de los grupos de recolección en relación con el control negativo ( Fig. 2 ). Cuando comparamos la actividad de ACE2 soluble entre pacientes que tenían y no tenían anticuerpos de ACE2, vimos una disminución ( Fig. 4 ). La razón de estas diferencias no está clara, aunque los tiempos de recolección pueden haber sido diferentes y el estudio de Patel [ 10 ] comparó a pacientes con SRAS-CoV-2 con controles sanos, mientras que nuestro grupo de control eran pacientes sin infección por SRAS-CoV-2 que probablemente tenían otros procesos patológicos. Sin embargo, ninguno de estos estudios, incluido el nuestro, examinó la ECA2 unida al tejido, que probablemente sea la fuente fisiológicamente más relevante de conversión de ANG II en Ang (1-7).

Los estudios de la actividad de ACE2 y ACE2 soluble en plasma reflejan el efecto potencial de un inhibidor de la ACE2 que se ha eliminado de fuentes unidas a la membrana, pero los resultados pueden confundirse por las diferencias en la magnitud de la eliminación de la enzima. Para intentar determinar si el anticuerpo ACE2 en plasma se correlaciona con la capacidad de inhibir la actividad de la enzima ACE2, utilizamos un ensayo con fuentes exógenas de ACE2 y sustrato. La adición de plasma de pacientes con anticuerpos ACE2 inhibió la actividad de ACE2 exógena en relación con la adición de plasma de pacientes sin anticuerpos ( Fig 5 ). Esto sugiere que los anticuerpos ACE2 en el plasma pueden inhibir la actividad ACE2. Esta inhibición probablemente afectaría a la enzima ACE2 que está unida al tejido, así como a la actividad de la ACE2 soluble. Esto proporciona un mecanismo potencial para la alteración del equilibrio de los péptidos de angiotensina que conduce a un aumento de la Ang II y la activación del sistema inmunológico. Por lo tanto, tenemos dos líneas de evidencia que apoyan la hipótesis de que los anticuerpos antiidiotípicos conducen a síntomas de PASC. El primero es la presencia de anticuerpos ACE2 después de la infección por SARS-CoV-2 que no se encuentran en pacientes que no han sido infectados. El segundo es el hallazgo de que la adición de plasma que contiene estos anticuerpos puede disminuir la actividad de ACE2. Aunque estos hallazgos son sugerentes, no prueban la causalidad.

Cuando analizamos el resultado por grupo de pacientes en lugar de por la presencia de un anticuerpo ACE2, encontramos que la actividad de ACE2 aumenta significativamente cuando se agrega plasma o suero de pacientes hospitalizados con COVID-19 agudo (Inpatient +) al ensayo de actividad. Esta activación de la actividad de ACE2 mediante la adición de plasma concuerda con el efecto de un activador de ACE2 en el plasma de estos pacientes con enfermedades agudas que pueden superar la inhibición por el anticuerpo de ACE2. La regulación de la expresión de ACE2 es un modificador importante de la actividad de la enzima [ 21 ], pero también se han identificado activadores exógenos

de moléculas pequeñas de ACE2 [ 22 , 23].] sugiriendo que podría haber moléculas endógenas que también activen ACE2. Hasta la fecha, no se han descrito activadores de ACE2 endógenos. El hallazgo de activación de ACE2 por plasma de los grupos de pacientes hospitalizados + es consistente con el estudio de Patel y colegas que mostraron un aumento de la actividad de ACE2 en plasma después de la infección por SARS-CoV-2 [ 10 ]. Dado que muchos pacientes parecen desarrollar anticuerpos ACE2 después de la infección con SARS-CoV-2, pero una fracción más pequeña desarrolla síntomas a largo plazo, puede haber diferencias en la capacidad de los autoanticuerpos ACE2 para inhibir la actividad enzimática. Existe una gran variabilidad en la correlación entre los niveles de anticuerpos ACE2 y la activación o inhibición de la actividad de la enzima ACE2 ( Fig 6), incluso entre los pacientes convalecientes + (se muestra en puntos rojos). Esta variabilidad podría deberse a dos factores. Primero, podría haber una sustancia competidora en plasma o suero que provoque la activación de la actividad de ACE2. En segundo lugar, aunque los anticuerpos pueden reconocer ACE2, es posible que no todos inhiban su actividad enzimática. Si esto es correcto, los pacientes representados por los puntos más a la derecha en la [figura 6](#) tienen más probabilidades de desarrollar síntomas de PASC.

Las limitaciones de este estudio incluyen el (i) uso de muestras no identificadas por lo que no se pudo determinar una correlación con los síntomas de PASC, (ii) un tamaño de muestra relativamente pequeño y (iii) la incapacidad de nuestro ensayo para distinguir entre anticuerpos IgG e IgM ACE2 . Además, el estudio no prueba una relación causal entre los anticuerpos anti-ACE2 y los síntomas de PASC, ya que no tenemos datos sobre los síntomas de PASC en esta cohorte. Sin embargo, el hallazgo de que los anticuerpos ACE2 están presentes después de la infección con SARS-CoV-2 y que el plasma de pacientes con anticuerpos puede inhibir la actividad de ACE2 proporciona un mecanismo potencial para PASC.

Estos estudios muestran por primera vez que los anticuerpos ACE2 están presentes después de la infección por SARS-CoV-2. Este hallazgo es consistente con la hipótesis de que los anticuerpos ACE2 pueden estar involucrados en un proceso que conduce a la activación inmune. Si bien no tenemos datos sobre la asociación de anticuerpos ACE2 y PASC en esta cohorte, planteamos la hipótesis de que los anticuerpos podrían iniciar una cascada de efectos que conduzcan a los síntomas de PASC. Si estos anticuerpos son responsables de los síntomas de PASC, son posibles varios tratamientos. Los bloqueadores de los receptores de angiotensina son seguros y de uso generalizado. Estos fármacos mitigarían los efectos del aumento de Ang II causado por la inhibición de ACE2. Aún no se ha examinado una asociación entre la protección contra las secuelas de la infección por SARS-CoV-2 y el tratamiento con bloqueadores de los receptores de angiotensina o inhibidores de la ECA, pero debería ser una alta prioridad para la investigación en curso sobre PASC. Sin embargo, es posible que el tratamiento con estos bloqueadores del RAS no sea posible en pacientes con presión arterial baja. Es posible una terapia más dirigida del mecanismo de inhibición de ACE2. La proteína ACE2 soluble recombinante se propone como tratamiento durante las fases agudas de la infección, pero también puede ser útil para PASC. Los activadores de moléculas pequeñas de ACE2 están disponibles y se han propuesto para el tratamiento de la hipertensión y pueden ser útiles para el tratamiento de PASC [ Es posible una terapia más dirigida del mecanismo de inhibición de ACE2. La proteína ACE2 soluble recombinante se propone como tratamiento durante las fases agudas de la infección, pero también puede ser útil para PASC. Los activadores de moléculas pequeñas de ACE2 están disponibles y se han propuesto para el tratamiento de la hipertensión y pueden ser útiles para el tratamiento de PASC [ Es posible una terapia más dirigida del mecanismo de inhibición de ACE2. La proteína ACE2 soluble recombinante se propone como tratamiento durante las fases agudas de la infección, pero también puede ser útil para PASC. Los activadores de moléculas pequeñas de ACE2 están disponibles y se han propuesto para el tratamiento de la hipertensión y pueden ser útiles para el tratamiento de PASC [ 22 , 23 ]. Por tanto, si se confirma la relación entre los anticuerpos ACE2 y PASC, estarán disponibles varios tratamientos.

# Información de soporte

**Tabla S1.** La tabla muestra los datos de concentración de anticuerpos RBD, concentración de anticuerpos ACE2, concentración de proteína ACE2 en plasma, nivel de actividad ACE2 e inhibición de la actividad ACE2 con la adición de plasma.

Se enumera el grupo de recolección de cada muestra.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257016.s001>

(XLSX)

## Expresiones de gratitud

Los patrocinadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito. El contenido es responsabilidad exclusiva de los autores y no necesariamente representa las opiniones oficiales de los NIH o del Departamento de Asuntos de Veteranos.

## Referencias

1. Logue JK, Franko NM, McCulloch DJ, McDonald D, Magedson A, Wolf CR, et al. Secuelas en adultos a los 6 meses después de la infección por COVID-19. *JAMA Netw Open.* 2021; 4: e210830. pmid: 33606031
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
2. McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, Carroll TP, Murphy MP, Dunlea DM, et al. Caracterización de la respuesta inflamatoria a la enfermedad grave por COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 202: 812–821. pmid: 32584597
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
3. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, et al. La angiotensina II regula la respuesta inmunitaria celular a través de una vía dependiente de calcineurina. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1693-1701. pmid: 10606623
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
4. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Acciones proinflamatorias de las angiotensinas. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10: 321–329. pmid: 11342793
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)

5. **5.** Simões e Silva A, Silveira K, Ferreira A, Teixeira M. ACE2, angiotensina- (1-7) y eje del receptor Mas en inflamación y fibrosis. Revista británica de farmacología. 2013; 169: 477–492. pmid: 23488800
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
6. **6.** Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. Un papel crucial de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la lesión pulmonar inducida por el coronavirus del SARS. Nat Med. 2005; 11: 875–879. pmid: 16007097
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
7. **7.** Fujii H, Tsuji T, Yuba T, Tanaka S, Suga Y, Matsuyama A, et al. Niveles altos de anticuerpos anti-SSA / Ro en pacientes con COVID-19 con insuficiencia respiratoria grave: una revisión basada en casos: niveles altos de anticuerpos anti-SSA / Ro en COVID-19. Clin Rheumatol. 2020; 39: 3171–3175. pmid: 32844364
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
8. **8.** Zhang Y, Cao W, Jiang W, Xiao M, Li Y, Tang N, et al. Perfil de anticoagulante natural, factor coagulante y anticuerpo antifosfolípido en pacientes críticos con COVID-19. J Trombólisis del trombo. 2020; 50: 580–586. pmid: 32648093
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
9. **9.** Bastardo P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann H, Zhang Y, et al. Autoanticuerpos contra los IFN de tipo I en pacientes con COVID-19 potencialmente mortal. Ciencias. 2020; 370. pmid: 32972996
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
10. **10.** Patel SK, Juno JA, Lee WS, Wragg KM, Hogarth PM, Kent SJ y col. La actividad plasmática de ACE2 se eleva de forma persistente después de la infección por SARS-CoV-2: implicaciones para la patogenia y consecuencias de COVID-19. Eur Respir J. 2021. pmid: 33479113
  - [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
11. **11.** Ramchand J, Patel SK, Kearney LG, Matalanis G, Farouque O, Srivastava PM, et al. La actividad plasmática de ACE2 predice la mortalidad en la

estenosis aórtica y se asocia con fibrosis miocárdica grave. Imágenes JACC Cardiovasc. 2020; 13: 655–664. pmid: 31607667

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

12. **12.**Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A. Autoanticuerpos contra la enzima convertidora de angiotensina 2 en pacientes con enfermedades del tejido conectivo. Arthritis Res Ther. 2010; 12: R85. pmid: 20470389

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

13. **13.**Huang Lili, Sexton Daniel J., Skogerson Kirsten, Devlin Mary, Smith Rodger, Sanyal Indra, et al. Inhibidores de péptidos novedosos de la enzima convertidora de angiotensina 2. The Journal of Biological Chemistry. 2003; 278: 15532–15540. pmid: 12606557

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

14. **14.**Wang EY, Mao T, Klein J, Dai Y, Huck JD, Jaycox JR, et al. Autoanticuerpos funcionales diversos en pacientes con COVID-19. Naturaleza. 2021: 1–6. pmid: 34010947

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

15. **15.**Ladjemi MZ. Anticuerpos antiidiotípicos como vacunas contra el cáncer: logros y mejoras futuras. Fronteras en oncología. 2012; 2: 158. pmid: 23133825

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

16. **dieciséis.**Jerne NK. Hacia una teoría de redes del sistema inmunológico. Ann Immunol (París). 1974; 125C: 373–389. pmid: 4142565

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

17. **17.**Lindenmann J. Especulaciones sobre idiotipos y homocuerpos. Ann Immunol (París). 1973; 124: 171-184. pmid: 4126980

- [Ver artículo](#)
- [PubMed / NCBI](#)
- [Google Académico](#)

18. **18.**Suurmond J, Diamond B. Autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes sistémicas: especificidad y patogenicidad. La Revista de investigación clínica. 2015; 125: 2194–2202. pmid: 25938780

- [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
19. **19.**Serfozo P, Wysocki J, Gulua G, Schulze A, Ye M, Liu P, et al. La conversión de Ang II (angiotensina II) en angiotensina- (1-7) en la circulación es dependiente de POP (proliloligopeptidasa) y de ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) independiente. Hipertensión. 2020; 75: 173–182. pmid: 31786979
- [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
20. **20.**Nagy B, Fejes Z, Szentkereszty Z, Sütő R, Várkonyi I, Ajzner É, et al. Un aumento espectacular de la actividad de la ACE2 en suero en un paciente grave con COVID-19. Int J Infect Dis. 2021; 103: 412–414. pmid: 33249290
- [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
21. **21.**Li Y, Zhou W, Yang L, You R. Regulación fisiológica y patológica de ACE2, el receptor SARS-CoV-2. Pharmacol Res. 2020; 157: 104833. pmid: 32302706
- [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
22. **22.**Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, Qi Y, Afzal A, Rigatto K, et al. Diminazene atenúa la hipertensión pulmonar y mejora las funciones de las células progenitoras angiogénicas en modelos experimentales. Am J Respir Crit Care Med. 2013; 187: 648–657. pmid: 23370913
- [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)
23. **23.**Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RAS, et al. Identificación basada en la estructura de activadores de la enzima convertidora de angiotensina 2 de molécula pequeña como nuevos agentes antihipertensivos. Hipertensión. 2008; 51: 1312-1317. pmid: 18391097
- [Ver artículo](#)
  - [PubMed / NCBI](#)
  - [Google Académico](#)