

Infección en los linfocitos T por SARS-CoV-2, independiente de ACE2.

[Xu-Rui Shen](#),^{#1,2} [Rong Geng](#),^{#1,2} [Qian Li](#),^{#1,2} [Ying Chen](#),^{#1,2} [Shu-Fen Li](#),^{#1} [Qi Wang](#),^{1,2} [Juan Min](#),¹ [Yong Yang](#),^{1,2} [Bei Li](#),¹ [Ren-Di Jiang](#),¹ [Xi Wang](#),^{1,2} [Xiao-Shuang Zheng](#),^{1,2} [Yan Zhu](#),¹ [Jing-kun Jia](#),^{1,2} [Xing-Lou Yang](#),¹ [Mei-Qin Liu](#),^{1,2} [Qian-Chun Gong](#),^{3,4} [Yu-Lan Zhang](#),¹ [Zhen-Qiong Guan](#),¹ [Hui-Ling Li](#),^{1,2} [Zhen-Hua Zheng](#),¹ [Zheng-Li Shi](#),¹ [Hui-Lan Zhang](#),⁵ [Ke Peng](#),^{1,2} y [Peng Zhou](#),^{1,2}✉

Información del autor: [Notas del artículo](#) [Información sobre derechos de autor y licencia](#) [Descarga de responsabilidad](#)

Datos asociados

[Materiales suplementarios](#)

[Declaración de disponibilidad de datos](#)

[Vete a:](#)

Resumen

El SARS-CoV-2 indujo una marcada linfopenia en pacientes graves con COVID-19. Sin embargo, aún no se ha determinado si los linfocitos son objetivos de infección viral, aunque se ha identificado ARN o antígeno del SARS-CoV-2 en las células T de los pacientes. Aquí, confirmamos que el antígeno viral del SARS-CoV-2 podría detectarse en células de sangre periférica (PBC) de pacientes o células T pulmonares postmortem, y el virus infeccioso también podría detectarse a partir de PBC positivas para antígeno viral. A continuación probamos que el SARS-CoV-2 infecta los linfocitos T, preferiblemente las células T CD4+ activadas in vitro. Tras la infección, se puede detectar ARN viral, ARN subgenómico, proteína viral o partícula viral en las células T. Además, mostramos que la infección es independiente de spike-ACE2 / TMPRSS2 mediante el uso de ACE2 knockdown o experimentos de bloqueo de receptores. A continuación, demostramos que las células T positivas para antígeno viral del paciente sufrieron una apoptosis pronunciada. La infección in vitro de las células T indujo la muerte celular que es probable en las vías dependientes de ROS-HIF-1a de las mitocondrias. Finalmente, demostramos que LFA-1, la proteína que se expresa

exclusivamente en múltiples leucocitos, es más probable que sea la molécula de entrada que medió la infección por SARS-CoV-2 en las células T, en comparación con una lista de otros receptores conocidos. En conjunto, este trabajo confirmó una infección por SARS-CoV-2 de las células T, de una manera independiente del pico ACE2, que arrojó nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes de la linfopenia inducida por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19.

Términos temáticos: Inmunología, Microbiología

[Vete a:](#)

Introducción

Desde su aparición en diciembre de 2019, el SARS-CoV-2, la etiología de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), se extendió rápidamente a la mayoría de los países del mundo y planteó grandes amenazas para la salud pública. El virus comparte el 79,5% de la identidad genómica con el SARS-CoV-1 y también utiliza la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor de entrada celular.¹⁻⁵ Los síntomas clínicos típicos de los pacientes con COVID-19 incluyen fiebre, fatiga, tos seca y neumonía, mientras que alrededor del 20% de los casos graves pueden morir de insuficiencia multiorgánica.⁶⁻⁹

Además del sistema respiratorio, múltiples órganos, incluido el sistema inmunológico de pacientes con COVID-19, también fueron blanco de la infección por SARS-CoV-2. En particular, se observó linfopenia en el 83,2% de los pacientes al ingreso, y las infecciones mortales se asociaron con linfopenia más grave a lo largo del tiempo.⁴⁻⁸ Los linfocitos (particularmente las células T) desempeñan un papel central en el sistema inmunológico humano, una disminución de la cual resultaría en supresión inmune y complicaciones graves.¹⁰ Se ha propuesto que la linfopenia inducida por virus podría deberse a una infección directa, muerte celular mediada por citoquinas, secuestro tisular de linfocitos o supresión de la médula ósea o el timo para la generación de células T.¹¹ En el caso del MERS-CoV, se ha observado in vitro

apoptosis inducida por infección viral directa de células T, lo que posiblemente explica la linfopenia en pacientes con MERS.¹¹ También se observaron partículas virales de SARS-CoV-1 en múltiples leucocitos de un estudio de autopsia, lo que sugiere que la infección directa podría explicar la disminución de los linfocitos.¹² Del mismo modo, también se encontraron partículas o proteínas del SARS-CoV-2 en el bazo y los ganglios linfáticos de un estudio de 91 casos fallecidos de COVID-19, lo que sugiere una infección de linfocitos.¹³ Además, en el paisaje inmune de COVID-19 representado por estudios RNA-seq de células individuales, se ha encontrado ARN viral del SARS-CoV-2 en múltiples células inmunes, incluidas células mieloides con actividad fagocítica (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos sin actividad fagocítica (células T, B y NK).^{14,15} En particular, las células inmunes positivas para ARN del SARS-CoV-2 no co-expresaron los factores de entrada ACE2 y TMPRSS2, u otros cofactores de entrada hipotéticos.^{14,15} Se especula que la positividad viral del SARS-CoV-2 asociada a células puede representar una mezcla de virus replicantes, involucramiento de células inmunes y viriones o células infectadas por virus adheridas a la superficie celular.^{14,15}

Se ha demostrado que los monocitos humanos infectados con SARS-CoV-2, los macrófagos derivados de monocitos y las células dendríticas in vitro, que potencialmente desempeñan un papel importante en la patogénesis de COVID-19.^{16,17} Sin embargo, aún se desconoce si el SARS-CoV-2 infecta linfocitos, que no expresan ACE2, para provocar linfopenia. Esta brecha de conocimiento también trae dificultades para nuestra comprensión de cómo los linfocitos perdieron la capacidad de controlar la infección viral. Aquí, proporcionamos evidencia de que los linfocitos T activados podrían estar infectados por SARS-CoV-2 de una manera independiente de ACE2. La infección conduce a una apoptosis pronunciada de células T in vitro o en pacientes con COVID-19. Nuestros hallazgos arrojan luz sobre la comprensión de la linfopenia inducida por la infección por SARS-CoV-2.

[Vete a:](#)

[Resultados](#)

Presencia de SARS-CoV-2 en linfocitos de pacientes con COVID-19

Se ha demostrado que múltiples tipos de células inmunes, incluidos los linfocitos, están enriquecidos para el ARN viral del SARS-CoV-2 en múltiples estudios de RNA-seq de una sola célula.^{14,15} Para determinar si el SARS-CoV-2 infecta los linfocitos, analizamos las células de sangre periférica (PBC) recolectadas de pacientes con COVID-19. Las PBC se prepararon a partir de 22 pacientes, que estaban en estado grave durante el estudio junto con 15 donantes sanos. Primero analizamos los principales tipos de células linfocitarias, incluidas las células T (CD4 + auxiliar T y CD8 + T citotóxica), B y las células asesinas naturales (NK) por sus cambios en la población o la presencia de antígeno viral tras la infección. Para todos los pacientes examinados, las proporciones de linfocitos T en sangre disminuyeron significativamente en comparación con los de donantes sanos, mientras que las células B y NK parecían no verse afectadas (Fig. (Fig.1a). 1a). En particular, los linfocitos T CD4 + y CD8 + casi disminuyeron a cero en algunos pacientes (Fig. (Fig.1b). 1b). Los resultados sugirieron que la linfopenia en estos pacientes probablemente se atribuye a una disminución de los linfocitos T.

Comentado [MI1]: La linfopenia no es un simple dato analítico. Aparece pronto, es progresiva y duradera y tiene valor pronóstico. Se detectó muy temprano en los primeros trabajos publicados en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159299/> Su frecuencia (63%-83,2%) y su asociación con la gravedad de la infección (85% de los pacientes en UCI o 96,1% de los pacientes graves) certifican la trascendencia clínica. Además de ser más acusada en los sujetos graves, se acompaña de una menor expresión de INF- γ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7190990/> en los CD4 de esos pacientes. Por otra parte, los linfocitos de la inmunidad innata están disminuidos en las personas de mayor edad, más en los varones que en las mujeres y se correlaciona con la mortalidad. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9038195/> Los pacientes hospitalizados tienen valores más bajos que los sujetos ambulatorios infectados y los controles sanos.

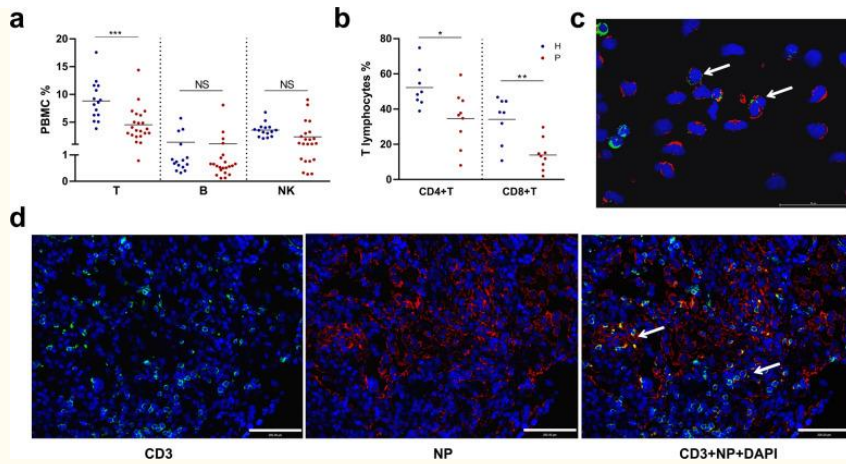


Figura 1

Los linfocitos de sangre periférica están infectados por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19. **a** Porcentaje de diferentes tipos de linfocitos en los donantes sanos (n= 15) o en pacientes con COVID-19 (n= 22). **b** Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en donante sano (n=8) o en pacientes con COVID-19 (n=9). **c,d** Prueba inmunofluorescente de la presencia del antígeno viral SARS-CoV-2 en células T. Las PBC (**c**) o la sección pulmonar postmortem (**d**) de pacientes con COVID-19 se tiñeron con linfocitos T (CD3, verde), SARS-CoV-2 (NP, rojo) y núcleos (DAPI, azul). Se utilizó pAb de fabricación propia contra el SARS-CoV-2 NP. Las flechas blancas indican las áreas de linfocitos T que fueron infectados por SARS-CoV-2. Las imágenes se tomaron bajo microscopía confocal con una barra = 50 μ m (**c**) o 200 μ m (**d**). La comparación de los valores medios (**a,b**) entre dos grupos fue analizada por la prueba de Student. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $P < 0,0001$; NS sin significación

Luego analizamos la presencia de antígenos virales del SARS-CoV-2 en PBC utilizando citometría de flujo o por ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Los resultados sugirieron que los linfocitos T estaban infectados y en ciertos pacientes las células T CD4 + mostraron una alta tasa de infección (Fig.S1a suplementaria). También confirmamos la presencia de antígeno viral en linfocitos T de la sangre del paciente mediante análisis de inmunofluorescencia (IFA) (Fig.(Fig.1c). 1c). Además, preparamos secciones pulmonares postmortem de pacientes con una infección mortal y analizamos la infiltración de linfocitos T y la infección por virus. Encontramos infiltración de linfocitos T en la sección pulmonar, y muchos linfocitos T también fueron positivos para la tinción NP de SARS-CoV-2, lo que indica infección por virus (Fig.(Fig.1d). 1d). También se ha informado de un

hallazgo similar.⁴³ Tomados en conjunto, mostramos la presencia del antígeno viral SARS-CoV-2 en linfocitos T, ya sea en la sangre o en la sección pulmonar de los pacientes con COVID-19.

Para corroborar aún más estos hallazgos, se intentó el aislamiento del virus a partir de PBC virales NP positivas. Se recolectaron PBC de pacientes, se determinó el antígeno viral mediante citometría de flujo y luego se cocultivaron con células Caco2 después de tres lavados. La detección positiva de ARN viral en el sobrenadante o proteína viral en las células Caco2 después del cocultivo indicó un aislamiento y amplificación exitosos del SARS-CoV-2 de PBC de algunos pacientes con COVID-19 (3 de 5) pero no del control sano (Fig.S1b-e suplementaria). En particular, en las tres muestras positivas de aislamiento viral, dos también mostraron viral positivo en el ensayo de citometría de flujo (P2 y P4), mientras que el tercero (P5) probablemente portaba virus infeccioso a un nivel que estaba por debajo del límite de detección del análisis citométrico de flujo. Sobre todo, observamos ARN viral SAR-CoV-2 y proteína viral, y probablemente virus infecciosos en linfocitos T de pacientes con COVID-19.

Infección por SARS-CoV-2 de células T in vitro

Dado que la población de linfocitos T disminuyó en pacientes con COVID-19 y los linfocitos T CD4 + mostraron una alta tasa de antígeno viral positivo, investigamos si el SARS-CoV-2 infecta a los linfocitos T CD4 +. Para este propósito, realizamos una serie de experimentos para probar si el SARS-CoV-2 infecta las células T. Tras la infección, se probaron tanto la detección de ARN viral dirigida al dominio de unión al receptor (RBD) como el ARNm subgenómico viral (sgRNA) dirigido al gen M. El sgRNA viral se transcribe solo en células infectadas durante la replicación viral y no se empaqueta en viriones, y por lo tanto indica la presencia de células infectadas activamente en las muestras. La proteína de nucleocápside viral (NP) y las partículas virales también se detectaron mediante Western blot (WB), microscopía de flujo o electrónica (EM). Las células Jurkat o MT4, dos líneas de células T CD4 + de uso común, y las células T primarias aisladas de

donantes sanos se infectaron con SARS-CoV-2 (Fig.(Fig.2a). 2 bis). En algunos experimentos, las células T también fueron activadas por acetato de miristato de Forbol (PMA) durante 2 h para células Jurkat o por una combinación de IL2 + CD3 + CD28 durante 3 días para células T primarias antes de la infección, considerando que una gran proporción de células T se activa en humanos (Fig.S2 suplementaria).

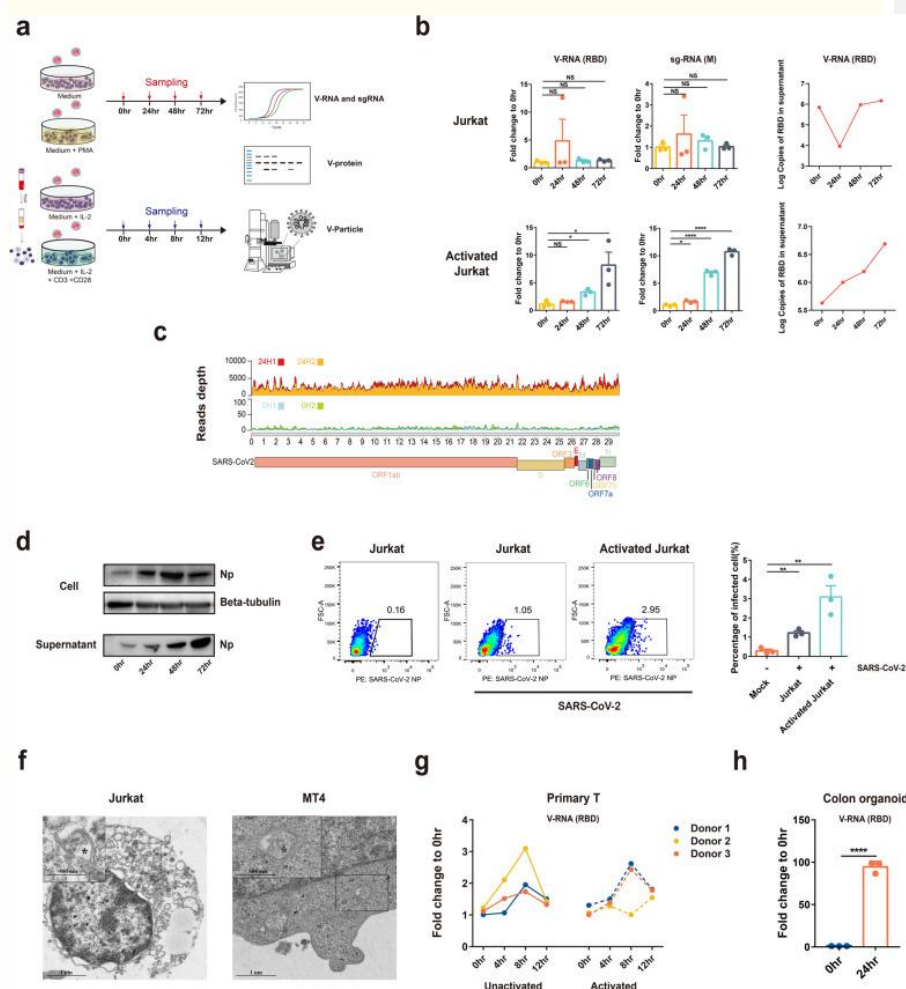


Figura 2

Infección in vitro por SARS-CoV-2 de líneas de células T o células T primarias. **a** Lista de experimentos. **b** Las células Jurkat no activadas o activadas se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,1) y se recogieron muestras a las 0, 24, 48 y 72 h después

de la infección. La carga viral en células o sobrenadante celular se cuantificó mediante la detección por qPCR del ARN viral total (RBD del gen de la espiga como diana) o ARN subgenómico (sgRNA, gen M como diana). **c** Comparación de profundidad y cobertura para las células Jurkat activadas infectadas con SARS-CoV-2 0 h o 24 h. Para cada muestra, la cantidad de virus se normalizó con su número total de lecturas de secuenciación. Se muestran dos réplicas para cada punto de tiempo. **d** La NP viral en las células Jurkat activadas infectadas y el sobrenadante celular se analizó mediante Western blot a las 0, 24, 48 y 72 h después de la infección. **e** Las células virales infectadas por NP 72 h de (**d**) se analizaron mediante citometría de flujo y el número de réplicas que se representan en el gráfico de barras es de tres. **f** Las partículas virales en células Jurkat o MT4 activadas infectadas se observaron mediante microscopio electrónico de transmisión. barra = 1 μ m o 500 nm, aumento: 3500 pliegues y 9600 pliegues para la célula Jurkat, 5000 pliegues o 11500 pliegues para la célula MT4. **g** Las células T primarias no activadas o activadas se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) y se recogieron muestras a las 0, 4, 8 y 12 h después de la infección. La carga viral en las células se cuantificó mediante qPCR. **h** Los organoides del colon estaban infectados con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01). Se recolectaron muestras de cero horas y 24 h y se cuantificaron mediante qPCR. Los datos fueron analizados por la prueba t de Student y la significación estadística es indicada por los asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$; NS sin importancia)

A las 0, 24, 48 y 72 h después de la infección, se observó que la línea de células T de Jurkat infectada con SARS-CoV-2 dependía del tiempo, y la infección era más robusta en las células T activadas. Se observó acumulación de ARN viral y ARNg en células o ARN viral en el sobrenadante de cultivo (Fig. (Fig.2b). 2b). A continuación, tratamos de determinar si el ensayo de detección de qPCR representa solo una replicación parcial del genoma viral. Realizamos un análisis de RNA-seq de las células T Jurkat activadas infectadas con SARS-CoV-2 a 0 o 24 h p.i. y analizamos la profundidad y la cobertura de las lecturas virales en todo el genoma viral. En comparación con 0 h infectadas, se puede observar una profundidad mucho mayor de genomas virales (hasta 5000 lecturas de profundidad) en las células infectadas con 24 h, lo que demuestra una replicación efectiva (Fig. (Fig.2c). 2c). Luego determinamos los antígenos virales mediante WB y ensayo de flujo. Nuestros resultados mostraron un aumento dependiente del tiempo del nivel de NP viral en las células o en el sobrenadante, similar a los hallazgos en la detección de ARN viral (Fig. 2d,e). Además, empleamos microscopía electrónica para analizar la infección por SARS-CoV-2 de líneas de células T. Las células activadas de Jurkat o MT4 se infectaron con SARS-CoV-2

durante 72 h y se observaron partículas virales con morfología típica de coronavirus en el citoplasma de las células infectadas (Fig. [\(Fig.2f\). 2f](#)). Finalmente, para corroborar los hallazgos de las líneas de células T, probamos la infectividad de las células T primarias aisladas de donantes sanos. En los tres donantes, el SARS-CoV-2 mostró una infección dependiente del tiempo de las células T que alcanza su punto máximo a las 8 h, probablemente debido a la muerte celular extensa inducida por el virus en este momento (discutido a continuación). La activación sensibilizó a las células a la infección por SARS-CoV-2 en dos de los tres donantes. A modo de comparación, el organoide primario de colon también estaba infectado, que mostró una eficiencia de infección mucho mayor en comparación con las células T (Fig. [2g, h](#)). Tomados en conjunto, nuestros datos muestran claramente que el SARS-CoV-2 podría infectar las células T in vitro, aunque con una eficiencia menor en comparación con las células tisulares.

La infección por SARS-CoV-2 de las células T es independiente de ACE2 y TMPRSS2

En general, se cree que ACE2 es el receptor de entrada para el SARS-CoV-2. Sin embargo, las principales poblaciones celulares en las PBC expresan niveles extremadamente bajos de ACE2, lo que plantea la cuestión de si ACE2 también media la entrada del virus SARS-CoV-2 de las células T. Primero probamos si un knockdown de ACE2 podría amortiguar la infección por SARS-CoV-2 de las células T. Los datos mostraron que ACE2 fue derribado con éxito por ACE2-shRNAs en células Caco2. Las células T de Jurkat no expresan ACE2 detectable en condiciones simuladas o derribadas (Fig. [\(Fig.3a\). 3a](#)). En consecuencia, la eliminación de ACE2 resultó en una disminución dramática de la infección por SARS-CoV-2 en las células Caco2, pero no en las células T Jurkat (Fig. [\(Fig.3b\). 3b](#)). Para confirmar aún más este hallazgo, hicimos ACE2 noqueado en células Caco2 y Jurkat (Fig. [\(Fig.3c\). 3c](#)). Al igual que en las células ACE2-knockdown, la carga viral disminuyó en las células Caco2-ACE2-KO pero no en las células Jurkat-ACE2-KO (Fig. [\(Fig.3d\). 3d](#)).

Estos resultados sugirieron que las células T infectadas con SARS-CoV-2 de una manera independiente de ACE2.

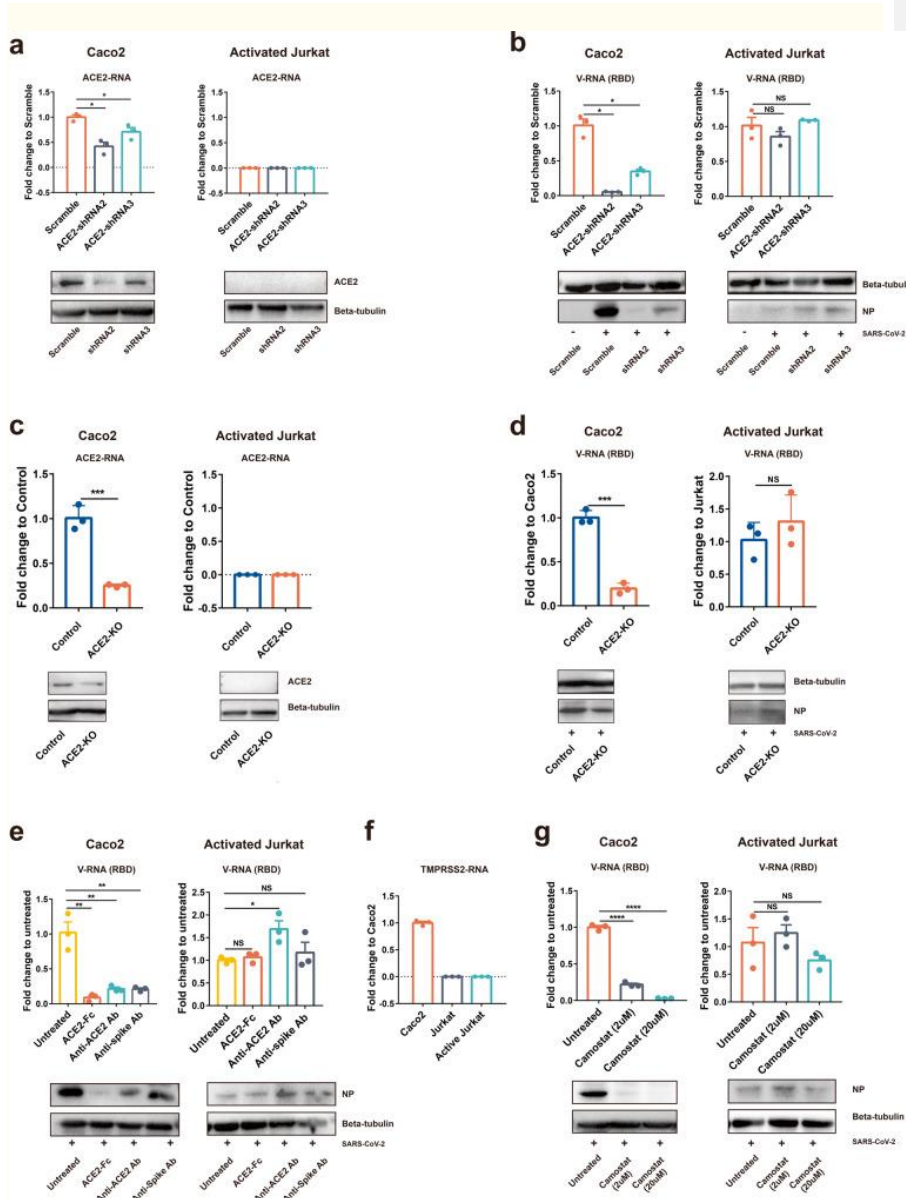


Figura 3

La infección por SARS-CoV-2 de las células T es independiente del pico ACE2 / TMPRSS2. **a** El nivel de expresión de ACE2 de las células Scramble o ACE2-knockdown Caco2 o Jurkat se analizó mediante qPCR o WB. **b** ACE2 derribó de

manera estable Caco2 o las células activadas de Jurkat se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01). El ARN viral o NP viral en células se analizó mediante qPCR o WB a las 24 h después de la infección. **c** El nivel de expresión de ACE2 de las células de control o Caco2 o Jurkat knockout de ACE se cuantificó mediante qPCR o se detectó mediante WB. **d** Las células Caco2 ACE2 o las células Jurkat activadas se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01). El ARN viral o NP viral se detectó mediante qPCR o WB. **e** Para el bloqueo de ACE2, Caco2 o células Jurkat activadas se incubaron previamente con anti-ACE2 Ab (3,33 ng/ μ l final) antes de infectarse con SARS-CoV-2. Para el bloqueo del virus, la proteína ACE2-Fc (10 μ g/ μ l final) o RD#4-anti-Spike Ab (160 ng/ μ l final) se incubaron con SARS-CoV-2 a un volumen de 1:1 a 37 °C durante 30 min. Las células se infectaron a 0,01 MOI durante 24 h antes de ser cuantificadas para el ARN viral del SARS-CoV-2 o la proteína NP mediante qPCR o WB. **f** El nivel de expresión TMPRSS2 de Caco2, Jurkat y células Jurkat activadas se analizó mediante qPCR. **g** Caco2 o células Jurkat activadas se incubaron previamente con Camostat (2 μ M o 20 μ M) durante 1 h y luego se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01). Se cuantificaron las proteínas de ARN viral o NP. Los resultados se derivaron de tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba *t* de Student (**P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,0001; NS sin importancia)

Se informó que la proteína ACE2 humana soluble podría bloquear la infección por SARS-CoV-2 a través de la unión del virus competidor con el receptor celular. ³ Por lo tanto, las células preincubadas con anticuerpos ACE2 o el SARS-CoV-2 preincubado con anticuerpos de pico también deberían bloquear la infección viral, si la infección depende de la unión de la espiga-ACE2. Para analizar si estas moléculas afectan la infección por SARS-CoV-2 de las células T, incubamos el virus con la proteína ACE2 humana soluble o un mAb comercial dirigido a la unión RBD-ACE2, o incubamos células con anticuerpos bloqueadores de ACE2 antes de la infección de Caco2 o células T Jurkat activadas. El ARN viral intracelular se analizó después de la infección. En Caco2, los tres bloqueadores bloquearon fuertemente la infección por SARS-CoV-2, y la proteína ACE2 parece ser más potente que los otros dos tratamientos. En contraste, ninguno de los tres tratamientos afectó la infección por SARS-CoV-2 de las células T de Jurkat (Fig. [Fig.3e3e](#)).

Por último, se sabe que el SARS-CoV-2 utiliza la serina proteasa TMPRSS2 para el cebado de la proteína S antes de unirse al receptor ACE2, y un inhibidor de TMPRSS2 ha sido aprobado para uso clínico (Camostat) para bloquear la entrada de SARS-CoV-2. ¹ La expresión de ARN de TMPRSS2 en Caco2, Jurkat y células Jurkat

activadas se determinó mediante qPCR. El resultado sugirió que ni las células de Jurkat no activadas ni activadas expresaban TMPRSS2 (Fig. (Fig.3f). 3f). Observamos que Camostat inhibió la infección por SARS-CoV-2 de las células Caco2 de una manera dependiente de la dosis. A una dosis de 20 μ m, Camostat bloqueó casi por completo la infección viral de las células Caco2. En contraste, Camostat no mostró ningún efecto inhibitorio sobre la infección por SARS-CoV-2 de las células T de Jurkat, incluso a una dosis alta (Fig. (Fig.3g). 3g). En conjunto, estos resultados sugirieron que la infección por SARS-CoV-2 de las células T no depende de la interacción pico-ACE2 / TMPRSS2.

La infección por SARS-CoV-2 provocó la muerte de las células T

Se sabe que los pacientes graves con COVID-19 mostraron una marcada disminución de las poblaciones de linfocitos. Para determinar si la infección por SARS-CoV-2 contribuye a la muerte de células T, probamos la apoptosis de los linfocitos T PBC recolectados de pacientes con COVID-19. Los linfocitos T de pacientes o de donantes sanos se marcaron con doble marcado con un anticuerpo CD3 y un anticuerpo NP viral, y la apoptosis se analizó con el ensayo TUNEL. Los linfocitos T de pacientes con COVID-19 se sometieron a una apoptosis pronunciada en comparación con los de los donantes sanos, mostrando un aumento de más de diez veces de células apoptóticas. En algunos pacientes, la mayoría de las células apoptóticas también fueron positivas para antígenos virales (por ejemplo, 65% en el paciente 1), lo que sugiere que la infección viral desempeñó un papel en la muerte de linfocitos T de sangre periférica en estos pacientes (Fig. (Fig.4a 4a).

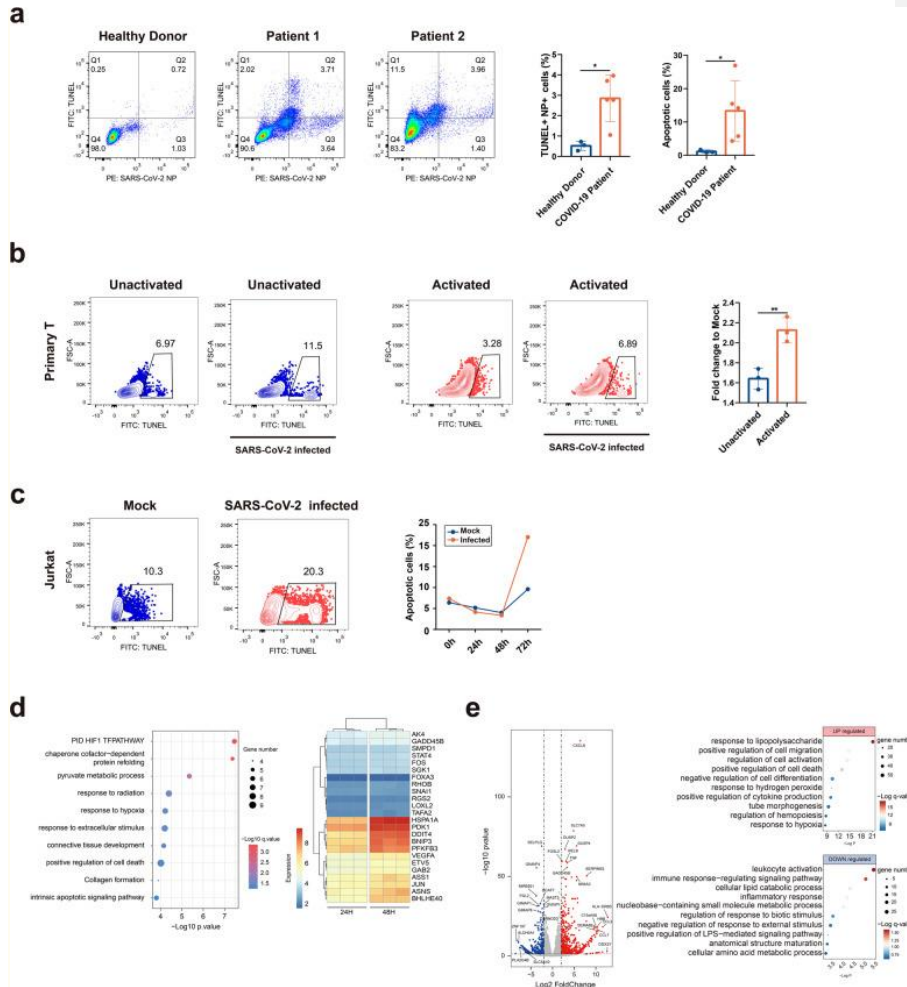


Figura 4

Apoptosis inducida por infección por SARS-CoV-2 en células T. **a** Detección de linfocitos T apoptóticos en PBC humanas. Las PBC se prepararon a partir de pacientes con COVID-19 o de donantes sanos. La apoptosis en linfocitos T infectados por virus se determinó utilizando CD3, anticuerpos NP contra el SARS-CoV-2 y el ensayo TUNEL. Los resultados de detección para dos pacientes y un donante sano, o las estadísticas de células apoptóticas o células TUNEL/NP doble positivas se mostraron para donantes sanos (H, $n = 3$) o pacientes (P, $n = 5$). La comparación de los valores medios entre dos grupos fue analizada por la prueba *t* de Student. $*P < 0,05$. **b** Las células T primarias no activadas o activadas se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) durante 8 h y la apoptosis celular se analizó con el ensayo TUNEL. $**P < 0,01$. **c** Las células Jurkat activadas se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) durante 0, 24, 48 y 72 h. Se mostró la proporción de células apoptóticas en 72 h de células simuladas o infectadas por SARS-CoV-2 (diagrama de flujo). También se comparó la proporción de células

apoptóticas en diferentes puntos de tiempo (gráfico). **d** Las muestras de C se sometieron para el análisis de RNA-seq. Se muestran las diez principales vías GO reguladas al alza en 48 h en comparación con el grupo de 24 h. El mapa de calor muestra la expresión normalizada de genes que se enriquecieron a partir de la vía PID HIF1. Los datos fueron analizados por la prueba t de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS sin importancia). **e** En comparación con los donantes sanos, se mostraron genes diferencialmente expresados de pacientes graves con COVID-19 en el diagrama del volcán, y las diez principales vías diferenciales expresadas se mostraron en el panel derecho

Para confirmar el papel de la infección viral en la muerte de células T, infectamos experimentalmente células T primarias aisladas de donantes sanos. Con o sin activación, las células se infectaron experimentalmente con SARS-CoV-2 durante 8 h y la apoptosis se analizó con el ensayo TUNEL. Se puede observar que la infección por SARS-CoV-2 indujo una apoptosis pronunciada en las células T infectadas en comparación con las células tratadas con simulacro. La activación sensibilizó a los linfocitos T a la infección viral, como lo demuestran las células apoptóticas superiores en el grupo activado (Fig. (Fig.4b4b)).

Finalmente, determinamos las respuestas celulares en las células T tras la infección por SARS-CoV-2 mediante análisis masivo de RNA-seq. Las células T Jurkat activadas se infectaron con SARS-CoV-2 durante 0, 24, 48 y 72 h antes de ser recolectadas para el ensayo TUNEL. Se puede observar que el virus indujo una apoptosis significativa a las 72 h después de la infección, en comparación con las células infectadas simuladas o en otros puntos de tiempo (Fig. (Fig.4c). 4c). Luego determinamos las respuestas celulares dinámicas en células que han estado infectadas durante 24 o 48 h, ya que las células en grupos de 72 h contenían demasiadas células muertas y no eran adecuadas para el análisis de RNA-seq. En comparación con el grupo de 24 h, las vías GO relacionadas con la hipoxia están significativamente reguladas al alza en el grupo de 48 h, incluida la "vía PID HIF1 TF", "respuesta a la hipoxia", "regulación positiva de la muerte celular" y "vía de señalización apoptótica intrínseca". Se ha demostrado que la infección por SARS-CoV-2 desencadena la producción de ROS mitocondriales, lo que induce la estabilización del factor 1a inducible por hipoxia (HIF-1a) en monocitos.¹⁶ De manera similar, en las células T, múltiples genes involucrados en esta respuesta al

estrés oxidativo fueron regulados al alza: BNIP3, PFKFB3, FOS, JUN, BHLHE40, GADD45B, PDK1 y DDIT4 (Fig. (Fig.4d). 4d). Para corroborar los hallazgos en líneas de células T, realizamos análisis de RNA-seq a células mononucleares primarias de sangre periférica (PBMC) recolectadas de tres donantes sanos y tres pacientes graves con COVID-19. Nuestros datos mostraron una regulación positiva de las respuestas celulares a los estímulos, la muerte celular o la respuesta a las vías de hipoxia, y una regulación a la baja de las vías de activación y señalización de los leucocitos, similar a los hallazgos en la línea de células T (Fig. (Fig.4e). 4e). En resumen, la infección por SARS-CoV-2 indujo una muerte pronunciada de las células T, que probablemente depende de las vías de hipoxia ROS-mitocondrias.

Exploración de receptores potenciales en células T

Dado que nuestros resultados sugirieron que la infección del SARS-CoV-2 a la célula T de Jurkat es independiente de ACE2, tratamos de identificar los receptores potenciales. Primero exploramos la expresión de los receptores o cofactores conocidos del SARS-CoV-2 que se han identificado en las células T primarias a partir de datos públicos de NGS de una sola célula¹⁴ y en las células T Jurkat en el análisis de RNA-seq con o sin activación, incluidos ACE2 / TMPRSS2, AXL, NRP1, KIM-1 / TIM-1, ASGR1 y KREMEN1.¹⁸⁻²⁰ Además, se ha sugerido que ITGB2 (molécula-1 asociada a leucocitos, LFA-1), la molécula de adhesión de células leucocitarias, se une al SARS-CoV-1 ORF7a.²¹ Como el SARS-CoV-2 comparte un ORF7a similar al SARS-CoV-1, sería interesante evaluar si el LFA-1 también medió la infección por SARS-CoV-2 de las células T.

Nuestros datos mostraron una expresión mínima de las siguientes moléculas en células T positivas para SARS-CoV-2 de pacientes: ACE2, TMPRSS2, ASGR1, KREMEN1 y NRP1 (Fig. (Fig.5a 5a y Fig. S3a). En contraste, AXL y LFA-1 se expresaron en estas células. En las células Jurkat, LFA-1 también mostró una expresión muy alta, aunque no fue regulada al alza después de una activación de 2 h

(Fig. S3b). Tomados en conjunto, AXL y LFA-1 parecían ser objetivos prometedores como moléculas de entrada.

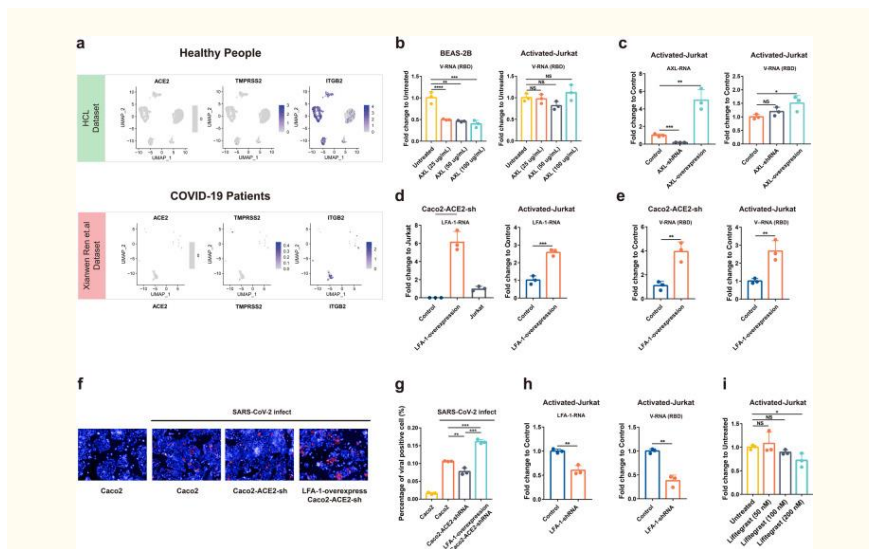


Figura 5

Exploración de receptores potenciales en células T. **a** La expresión de ACE2, TMPRSS2 e ITGB2 (LFA-1) en células T sanguíneas de donantes sanos y pacientes con COVID-19. El análisis depende de los datos públicos de NGS de una sola célula. ¹⁴ La expresión de los tres genes está indicada en las células T positivas para ARN viral del SARS-CoV-2 para el paciente penal. **b** BEAS-2B y las células Jurkat activadas se incubaron con diferentes concentraciones de proteínas AXL (25, 50 o 100 µg/ml) a 37 °C durante 30 min antes de ser infectadas por SARS-CoV-2 (MOI de 0,01). El ARN viral intracelular (RBD) a las 24 h después de la infección se cuantificó mediante qPCR. **c** Se realizó knockdown o sobreexpresión de AXL en células Jurkat y el nivel de expresión de AXL se detectó mediante qPCR. Las líneas celulares fueron infectadas por SARS-CoV-2 a un MOI de 0,01 durante 24 h y se cuantificó el ARN viral. **d** LFA-1 se sobreexpresó de manera estable en células ACE2 knockdown Caco2 (Caco2-ACE2-shRNA) o Jurkat, y el nivel de ARN se cuantificó mediante qPCR. **e** Caco2, Jurkat activado y sus respectivas células de sobreexpresión de LFA-1 fueron infectadas por SARS-CoV-2 a un MOI de 0,01 y cosechadas a las 24 h después de la infección. El ARN viral intracelular se detectó mediante qPCR. **f** g Caco2, Caco2-ACE2-shRNA, y su línea celular de sobreexpresión LFA-1 fueron infectados por SARS-CoV-2 a un MOI = 5 durante 8 h. El microscopio de alto contenido se utilizó para observar (**f**) y cuantificar (**g**) las células virales NP-positivas. **h** Las células Jurkat de LFA-1 se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) durante 24 h, y la expresión de LFA-1 y ARN viral intracelular se analizó mediante qPCR. **i** Las células Jurkat activadas fueron pretratadas con Lifitegrast, un inhibidor de LFA-1 a diferentes concentraciones (50, 100 o 200 nM) a 37 °C durante 30 min antes de la infección (MOI = 0,01). El ARN viral intracelular se cuantificó a las 24 h después de la infección. La estadística se realizó mediante

la prueba *t* de Student (**P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *****P* < 0,0001 ; NS sin importancia)

AXL se propuso como un receptor candidato para el SARS-CoV-2 en un estudio previo y la función en la mediación de la infección por SARS-CoV-2 es independiente de ACE2. ¹⁹ BEAS-2B que se utilizó como control positivo para los estudios AXL-SARS-CoV-2 se trataron previamente con proteínas AXL de diferentes concentraciones (25, 50, 100 µg / ml) durante 30 min y luego se infectaron con SARS-CoV-2. La infección por SARS-CoV-2 podría ser inhibida significativamente por la proteína AXL a una concentración de 25 µg/ml. Por el contrario, la infección por SARS-CoV-2 de las células de Jurkat no pudo inhibirse incluso a 100 µg / ml (Fig. [\(Fig.5b\). 5b](#)). A continuación, construimos líneas celulares AXL-knockdown o de sobreexpresión en células Jurkat y luego probamos el efecto sobre la infección viral. Nuestros datos mostraron que la eliminación de AXL no podía bloquear la infección por SARS-CoV-2, pero una sobreexpresión de AXL podría mejorar ligeramente la infección (1,5 veces) (Fig. [\(Fig.5c\). 5c](#)). En conjunto, AXL no debe ser un receptor principal para el SARS-CoV-2 en las células Jurkat, pero puede contribuir a la infección.

LFA-1 se expresa ampliamente en la superficie de muchos leucocitos, y la activación de las células T cambió la estructura de LFA-1 a un modo de alta afinidad, pero no el nivel de expresión. ²² Luego sobreexpresamos la subunidad alfa de alta afinidad de la proteína LFA-1 en células Caco2 de ACE2 knockdown (Caco2-ACE2-shRNA) y células Jurkat. Nuestros datos de qPCR mostraron que la sobreexpresión de LFA-1 restauró con éxito la infección amortiguada en las células Caco2 de ACE2, y también mejoró la infección viral en las células de Jurkat (aumento de tres veces), como se muestra en los niveles de ARN viral celular (Fig. [5d, e](#)). Para corroborar el hallazgo, también realizamos IFA para detectar la expresión de NP viral. Después de una infección de 8 h, se compararon las células NP positivas virales. Nuestros datos mostraron una infección amortiguada por SARS-CoV-2 en las células de knockdown de ACE2, y un NP mucho mayor en las células de conocimiento de ACE2 de sobreexpresión de LFA-1 (Fig. [5f, g](#)).

Finalmente, la línea celular LFA-1-knockdown Jurkat fue construida e infectada por SARS-CoV-2 (MOI = 0.01). A las 24 h después de la infección, la carga viral en la línea celular knockdown disminuyó significativamente en comparación con la línea celular control (Fig. (Fig.5h). 5h). Lifitegrast, un inhibidor que bloqueó la unión de LFA-1 a su ligando extracelular, también se usó para pretratar las células Jurkat activadas antes de la infección. Los resultados de la qPCR mostraron que a una concentración de 200 nM, Lifitegrast también podría reducir la carga viral en las células de Jurkat (Fig. (Fig.5i). 5i). En conjunto, nuestros resultados sugirieron que LFA-1 debería ser un factor de unión o una posible entrada molecular para el SARS-CoV-2 durante su infección en las células de Jurkat.

[Vete a:](#)

Discusión

Aquí, mostramos que el SARS-CoV-2 infectó linfocitos T, principalmente células T CD4 +, de una manera independiente de ACE2. La infección por SARS-CoV-2 desencadenó una muerte pronunciada de células T, lo que potencialmente contribuyó a la linfopenia en pacientes con COVID-19. La infección de células T también puede tener profundas influencias en los pacientes. Los linfocitos T infectados no solo perdieron la capacidad de controlar la infección viral, sino que también pueden transportar virus a otras partes del cuerpo a través de la circulación sanguínea. Además, este modo de infección independiente de ACE2 puede comprometer el efecto terapéutico de los anticuerpos neutralizantes dirigidos a la unión espiga-ACE2. Estos pueden resultar sinérgicamente en resultados de infección más graves en pacientes con COVID-19.

Se ha debatido si el SARS-CoV-2 afectó la funcionalidad de las poblaciones de células inmunes a través de la infección directa. Nuestros resultados proporcionaron evidencia para mostrar que las células T infectadas por SARS-CoV-2, como ARN viral, ARNg viral, proteína viral y el virus infeccioso podrían detectarse a partir de células T tras la infección o de PBC de pacientes, aunque

la producción de partículas de virus infeccioso puede permanecer en un nivel bajo. Varios estudios recientes también revelaron que múltiples células inmunes transportan antígeno viral o ARN viral, incluidos neutrófilos, macrófagos, monocitos inflamatorios, células B plasmáticas, células T y células NK a través del análisis histológico postmortem y RNA-seq unicelular / nuclear único a pulmón o BALF. ¹³⁻¹⁵ Esto sugiere que el SARS-CoV-2 debería tener un amplio tropismo de células diana, incluidas las principales poblaciones de células inmunitarias.

Las proteínas ACE2 y TMPRSS2 humanas fueron reconocidas como las principales proteínas que mediaron la entrada de células del SARS-CoV-2. ¹⁴ Las moléculas de unión recién descubiertas AXL y NRP1 siguen dependiendo de ACE2 como receptor principal. ^{18,19} Nuestro descubrimiento de la infección independiente de ACE2 de las células T es sorprendente, pero también está respaldado por descubrimientos previos de que hay células de ARN del SARS-CoV-2 que no co-expresan ACE2 y TMPRSS2. ⁺¹⁵ En nuestros datos, el SARS-CoV-2 mostró una infección significativa de las células T activadas, lo que sugiere que debería haber un nuevo mecanismo de entrada en las células T. La identificación de LFA-1, como una molécula de entrada que contribuyó a una infección por SARS-CoV-2 de células T sería importante para el desarrollo de terapias clínicas, aunque quedan preguntas futuras. Por ejemplo, ¿cuál es la proteína de unión a LFA-1 en el virión SARS-CoV-2 si no es la proteína espiga? Dado que LFA-1 se expresa en varios otros leucocitos, se puede esperar que otras células inmunes (incluidos macrófagos o monocitos) también puedan infectarse por SARS-CoV-2 potencialmente a través de la unión con LFA-1. Estas preguntas deben abordarse en estudios futuros.

La infección de linfocitos T CD4 + por el virus SARS-CoV-2 puede ser un importante contribuyente de la patogénesis inducida por virus. Las células T armadas juegan un papel fundamental contra la infección por patógenos. ²⁰ Como se muestra en nuestros datos, es probable que estas células T sean objetivos de la infección por SARS-CoV-2 y sufran apoptosis en la vía dependiente de HIF-1 α . Estos eventos pueden conducir a la disfunción de las células T, agotamiento y, finalmente, linfopenia en los pacientes. Además,

los linfocitos T CD4 + moribundos podrían desencadenar una inflamación excesiva que conduce a una inmunopatogénesis severa en los pacientes. En particular, la población de linfocitos T CD8 + también disminuye significativamente en pacientes con COVID-19. A diferencia de los linfocitos T CD4 +, no se determinó que estas células contuvieran el antígeno viral SARS-CoV-2 en la citometría de flujo. El mecanismo subyacente a la depleción de linfocitos T inducidos por la infección por SARS-CoV-2 CD8 + es actualmente desconocido. Además de la infección viral, varios mecanismos, incluida la presencia de glucocorticoides endógenos o exógenos, inhibidores liberadores de neutrófilos sobreactivados de la activación de células T (arginasa 1 y CD274) y diferenciación selectiva regulada por citoquinas de las células de la médula ósea, también podrían contribuir al agotamiento de los linfocitos.^{11,23} Se necesita más investigación en profundidad para abordar los mecanismos potencialmente multimodo que conducen a la linfopenia en los pacientes con COVID-19. Teniendo en cuenta la aparente correlación entre la linfopenia y la progresión de la enfermedad en pacientes con COVID-19, es importante desarrollar estrategias para prevenir la linfopenia inducida por virus.

[Vete a:](#)

Materiales y métodos

Muestras y ética

El hospital Tongji recolectó muestras de sangre y tejidos humanos de pacientes con COVID-19 o de donantes sanos con el consentimiento de todas las personas. Se prepararon secciones de biopsia pulmonar fresca de un paciente fallecido. El comité de ética de los hospitales designados para enfermedades infecciosas emergentes aprobó todas las muestras humanas.

Líneas celulares y cultivo de virus

Vero E6, Caco2, 293T-sg, GP2-293 y BEAS-2B en DMEM + 10% FBS, o células MT4 y Jurkat T en RPMI1640 + 10% FBS (Gibco, C22400500BT), o células A549 en DMEM/F12 + 10% FBS, o células T primarias en medio X-vivo (Lonza, 04-418Q) que

contenía IL-2 (PeproTech, 200-02) se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 . Todas las líneas celulares se probaron libres de contaminación por micoplasma y se aplicaron a la identificación de especies y se autenticaron mediante evaluación morfológica microscópica. Ninguna de las líneas celulares estaba en la lista de líneas celulares comúnmente identificadas erróneamente (por ICLAC). En este estudio se utilizó el aislado WIV04 del SARS-CoV-2 (número de acceso GISAID EPI_ISL_402124). WIV04 se aisló de células Huh7 de la muestra original y se pasó en células Caco2. El título viral (TCID₅₀/ml) se determinó en células Vero E6.

Proteínas y anticuerpos para el SARS-CoV-2

La cepa WIV04 NP del SARS-CoV-2 y la RBD predicha se insertaron en el vector pCAGGS con una etiqueta S N-terminal. Los plásmidos construidos se transfectaron transitoriamente en HEK293T-17. El sobrenadante recolectado para la purificación de proteínas se purificó con resina S-tag, la pureza y el rendimiento se probaron utilizando mAb anti-S-tag (generado internamente). Los conejos fueron inmunizados con proteínas NP purificadas tres veces a una dosis de 700 ng / cada una, intervalo de 2 semanas. El suero de conejo se recolectó a los 10 días después de la inmunización final. El título de anticuerpos se determinó en un ELISA utilizando proteína NP purificada como antígeno de detección.

Preparación de células de sangre periférica (PBC) e infección por SARS-CoV-2

Las muestras de sangre de pacientes con COVID-19 o donantes sanos se procesaron en el laboratorio BSL3 en WIV. En total, 1× tampón de lisis RBC se hizo a partir de eBioscience™ 10× RBC Lysis Buffer antes del experimento (Multi-especies, Invitrogen). Las muestras de sangre humana se centrifugaron a 500 × *g* durante 10 minutos antes de ser tratadas con 2 ml de tampón de lisis de eritrocitos de 1× durante no más de 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se hilaron a 500 × *g* durante 10 minutos , seguido de un tratamiento con 2 ml de 1× tampón de lisis de eritrocitos

durante otros 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos de glóbulos rojos. Las células estaban listas para su uso después de la centrifugación. Las células se lavaron por centrifugado ($500 \times g$ durante 10 minutos cada vez) tres veces con PBS que contenía 2% de BSA antes de la tinción de anticuerpos marcadores celulares.

Para la infección, las PBC se sembraron en placas de 24 pocillos en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640, ThermoFisher, 22400500BT) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Life Technologies, 10099141) a una densidad de 1×10^6 células/ml. Las PBC se infectaron con SARS-CoV-2 a 0,1 MOI. Una hora después de la incubación, las células se lavaron por centrifugado tres veces con RPMI1640. Las PBC se sembraron con RPMI1640 suplementado con FBS al 10% en nuevas placas de 24 pocillos a 37 °C suministradas con 5% de CO₂ durante 12 h o 24 h antes de ser recolectadas para su posterior análisis.

Para IFA en PBC de pacientes, las células fijas durante la noche se untaron uniformemente sobre un cubreobjetos de vidrio. La presencia de NP viral se detectó con pAb de conejo contra la proteína NP SARS-CoV-2 (generada internamente, 1:1000) y una IgG anti-conejo de cabra conjugada con Cy3 (1:200, Abcam, ab6939). Los linfocitos T se detectaron utilizando un anticuerpo CD3 antihumano de conejo (1:100, Abcam, ab5690). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Beyotime, C1002). Los patrones de tinción se examinaron utilizando microscopía confocal en un microscopio FV1200 (Olympus).

Para el análisis inmunohistoquímico en el pulmón del paciente, los tejidos de biopsia de un paciente fallecido se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 24 h, se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones de 5- μ m. La tinción de inmunofluorescencia múltiple se obtuvo utilizando el kit PANO 7-plex IHC (0004100100, Panovue, Beijing, China). Los portaobjetos se desparafinaron y rehidrataron, seguidos de una recuperación de antígenos inducida por calor de 15 minutos con EDTA pH 9.0. Los portaobjetos se lavaron con PBS/0,02% Triton X-100 y luego

se bloquearon con BSA al 10% a RT durante 30 min, pAb de conejo contra la proteína NP del SARS-CoV-2 (generada internamente, 1:1000) y anticuerpo CD3 antihumano de conejo (1:100, Abcam, ab5690) se utilizaron en incubación a 37 °C 1 h, seguido de incubación secundaria de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante y amplificación de señal de tiramida. Los portaobjetos fueron tratados térmicamente por microondas después de cada operación de TSA. Los núcleos se teñieron con 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Beyotime, C1002) en la etapa final de la tinción. Para obtener imágenes multiespectrales, las diapositivas teñidas se escanearon utilizando el Sistema Mantra (PerkinElmer). Los escaneos se combinaron para construir una sola imagen de pila. Se utilizaron imágenes no teñidas y secciones de una sola tinción para extraer el espectro de autofluorescencia de los tejidos o de cada fluoresceína, respectivamente. Las imágenes extraídas se utilizaron además para establecer una biblioteca espectral requerida para la mezcla multiespectral por el software de análisis de imágenes InForm (PerkinElmer). Usando esta biblioteca espectral, obtuvimos imágenes reconstruidas de secciones con la autofluorescencia eliminada.

PBCs cocultivadas con células Caco2

Las PBC de cinco pacientes se lavaron tres veces con PBS antes de cocultivarse con células Caco2 durante 4 días y se analizaron para detectar ARN viral del SARS-CoV-2 en el sobrenadante o antígeno en las células Caco2. Mientras tanto, las PBC se analizaron para detectar la presencia de antígeno viral mediante citometría de flujo.

Cultivo de organoides de colon humano e infección por SARS-CoV-2

Los organoides de colon humano se generaron y cultivaron como se describió en el estudio anterior.²⁴ Brevemente, los organoides de colon en matrigel fueron digeridos y lavados dos veces con medio antes de la infección. Se agregó SARS-CoV-2 para infectar organoides de colon a un MOI de 0.01. 24 h más tarde, los

organoides de colon se hilaron y se lavaron dos veces con mediano. El ARN viral en organoides de colon se determinó mediante qPCR.

Activación de Jurkat y células T primarias

Para activar las células Jurkat, $2.5E + 06$ de células se sembraron en un pocillo de una placa de seis pocillos que contenía 2,5 ml de medio RPMI1640 que contenía 10% de FBS. En total, se añadieron 40 ng/ml de PMA (Invivogen, tlr1-pma) a las células y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Las células se centrifugaron a $300 \times g$ a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de desechar el sobrenadante y se cultivaron con un medio fresco RPMI1640 que contenía 10% de FBS. Los linfocitos T CD3 humanos primarios se aislaron de la sangre de donantes sanos utilizando microperlas CD3 de humanos (Miltenyi, 130-050-101). Para activar las células T primarias, las células T congeladas se descongelaron y se cultivaron con X-vivo (Lonza, 04-418Q) que contenía 1 µg/ml de IL-2 (Peprotech, 200-02). Las células se cultivaron con un volumen de 7,5 µl de T Cell TransAct (Miltenyi Biotec) en el medio durante 3 días a 37 °C. Luego, las células se hilaron y se cultivaron con un medio fresco IL-2 / X-vivo antes de la infección viral.

Infección por células T

Las células T Jurkat o los linfocitos T CD3 humanos primarios se infectaron con SARS-CoV-2 a un MOI de 0.01, 0.1 o 1, dependiendo del propósito del experimento. El sobrenadante o las células se cosecharon a 0, 24, 48 o 72 hpi después de tres veces el lavado de PBS para las células T Jurkat, o 0, 4, 8 y 12 hpi para las células T primarias. La expresión celular o sobrenadante de ARN viral o proteína se determinó mediante qPCR, RNA-seq, WB o citometría de flujo. GAPDH se utilizó en qPCR como control interno y beta-tubulina se utilizó en WB (1:5000, 66240-1-Ig de Proteintech) como control interno.

Análisis por citometría de flujo de muestras de sangre periférica humana

Para la tinción superficial, las PBC se incubaron con anticuerpos marcados con fluorocromo específicos para humanos antes de la fijación: AF-700-anti-CD45 (2D1), percp-anti-CD19 (HIB19), APC/CY7-anti-CD3 (UCHT1), BV510-anti-CD4 (OKT4) y percp/Cy5.5-anti-CD8a (HTT8a). Las PBC teñidas con anticuerpos se fijaron durante la noche con PFA al 4% a 4 °C y se sacaron del laboratorio BSL3 para su análisis posterior. Las células se tiñeron aún más con SARS-CoV-1 NP pAb (1:500) de fabricación propia a 4 °C durante 30 min después de la permeabilización. Luego las células se tiñeron con FITC-anti-Rabbit IgG (H + L) a temperatura ambiente durante 30 min. Los anticuerpos AF-700-anti-CD45 (2D1), APC/CY7-anti-CD3 (UCHT1), BV510-anti-CD4 y percp/Cy5.5-anti-CD8a se compraron a Biolegend y todos se usaron en 1:100. FITC-anti-Rabbit IgG (H + L) fue de Proteintech (SA00003-2).

Extracción de ARN y qPCR

Siempre que se utilizaron kits comerciales, se siguieron las instrucciones del fabricante sin modificaciones. El ARN se extrajo de 140 µl de muestras con el QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). El ARN se eluyó en 50 µl de tampón de elución y se utilizó como plantilla. La detección por qPCR del SARS-CoV-2 se realizó utilizando HiScript II One-Step qPCR SYBR Green Kit más un kit de sonda qPCR de un paso dirigido a M para sgRNA (diseñado internamente) o RBD del gen de espiga (comercial) siguiendo las instrucciones del fabricante (Q222-CN, Vazyme Biotech Co., Ltd). QPCR se ejecutó en una máquina de PCR en tiempo real (ABI) Step-One Plus utilizando la configuración predeterminada. ®®®

Análisis de profundidad y cobertura del genoma del SARS-CoV-2

El ARN se extrajo de las células T Jurkat activadas infectadas con SARS-CoV-2 24 h con el kit RNAPrep Pure Cell/Bacteria (TIANGEN, DP430). El ARN se eluyó en 50 µl de tampón de elución y se utilizó como plantilla para RNA-seq. Las lecturas limpias se mapearon al genoma del SARS-CoV-2 (WIV04) utilizando el

software HISAT2 v2.1.0. Después de ordenar e indexar con samtools v1.10-24, la cobertura se calculó utilizando la función genomeCoverageBed de bedtools v2.29.2.

Análisis del transcriptoma

Las células T Jurkat infectadas con SARS-CoV-2 24 h y 48 h (3 réplicas cada una), muestras de sangre de tres donantes sanos y 3 pacientes graves con COVID-19 se sometieron a análisis de ARN-seq. Después de asignar lecturas limpias a GRCh38.p13 con HISAT2 v2.1.0 y conversión de formato con samtools v1.10-24, usamos stringtie v2.1.0 para ensamblar y cuantificar transcripciones. La tabla de recuentos de lecturas del transcriptoma generado por prepDE.py, una herramienta en stringtie, se utilizó para el análisis de expresión diferencial génica en R v4.1.0 con el paquete DESeq2 v1.32.0. El gen con cambio log₂ fold >2 y valor de $p < 0,05$ fue seleccionado para realizar análisis de enriquecimiento utilizando herramientas en línea Metascape.

Análisis de datos NGS de una sola célula pública

Se descargaron datos públicos de NGS unicelular, los datos de pacientes con COVID-19 se descargaron de GSE158055 ¹⁴ y los datos de donantes sanos fueron de [GSE134355](#) (paisaje celular humano). De acuerdo con la información original de cada artículo, se extrajeron datos de células T primarias de pulmón, timo y sangre periférica de donantes sanos y células T positivas para virus de pacientes con COVID-19. Siguiendo el flujo de trabajo estándar de Seurat v4.0.4, normalizamos los datos y los escalamos con información UMA. La expresión de receptores candidatos o cofactores se visualizó con la función Seurat FeaturePlot.

Análisis Western blot (WB)

Las células infectadas o transducidas se recolectaron en el punto de tiempo indicado y se lisaron con RIPA Lysis Buffer (Beyotime, P0013C) para WB. Las proteínas en los lisados celulares se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10-12% de SDS y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, SLHVR33RB). Los blots se

incubaron con anti-ACE2 policlonal de conejo (Servicebio, GB11267, dilución 1:1000), policlonal de conejo anti-2019-nCoV NP (dilución 1:1000), anti-beta-tubulina monoclonal de ratón (Proteintech, 66240-1-Ig, dilución 1:5000), y luego anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de conejo o ratón (Proteintech, dilución 1:5000, SA00001-2 o SA00001-1). Se utilizó sustrato HRP quimioluminiscente occidental Immobilon (Millipore, WBKLS0500) para la detección de proteínas.

Ensayo terminal de etiquetado de extremo de níquel (TUNEL) de desoxinucleotidiltransferasa dUTP

El kit de ensayo TUNEL comprado a Beyotime Biotechnology (C1088) se utilizó para detectar la apoptosis en células infectadas por SARS-CoV-2 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fijadas en paraformaldehído al 4% se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25% durante 20 min a 4 °C. Luego, la mezcla de reacción TdT que contenía la enzima TdT y la solución de etiquetado fluorescente se agregó a las células para etiquetar el ADN fragmentado. Las células se tiñeron aún más con Rp3-CoV NP pAb (1:8000) o Rabbit anti-SARS-CoV-2 NP pAb (1:500) y CY3-anti-Rabbit IgG (H + L) (Proteintech, SA00009-2) después de la fijación. Las células marcadas se analizaron con un citómetro de flujo (BD LSRFortessa).

Experimentos de inhibición de la competencia ACE2 y bloqueo de anticuerpos

Se utilizaron proteínas ACE2-Fc humanas recombinantes de longitud completa (GenScript, Z03484), Anti-ACE2 Ab (R&D, AF933) y RD#4-anti-Spike Ab (anticuerpos monoclonales caseros). La proteína ACE2-Fc se diluyó a 20 µg/µl en medio de cultivo y luego se incubó con una solución del virus SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) a un volumen de 1:1 a 37 °C durante 30 min. El RD#4-anti-Spike Ab se diluyó a 320 ng/µl en medio de cultivo y luego se incubó con una solución del virus SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) a un volumen de 1:1 a 37 °C durante 30 min. Las mezclas virus-ACE2 o virus-anticuerpo se agregaron a las células de Jurkat o células Caco2. Las células se recogieron para su posterior

análisis a las 24 h después de la infección. Para experimentos de bloqueo de anticuerpos anti-ACE2, las células Jurkat o Caco2 se trataron previamente con 3,33 ng / μ l de anticuerpos anti-ACE2 (R&D Systems, cabra, AF933) a 37 °C durante 30 min antes de la infección.

Generación de líneas celulares de sobreexpresión de KO, KD

KO, KD y plásmidos de sobreexpresión se construyeron en diferentes vectores (pLenti-V2 para knockout, vector pLKO.1 para knockdown y vector pQCXIH para sobreexpresión). La eliminación de ACE2 se logró mediante la transducción de células Caco2 y Jurkat con lentivirus que expresan sgRNAs específicos dirigidos a ACE2 (F: CACCG GCCTCCATCGATATTAGCAA; R: AAAC TTGCTAATATCGATGGAGGCC).

La eliminación de ACE2, AXL, LFA-1 se logró mediante la transducción de células Caco2 o Jurkat con lentivirus que expresan siRNAs específicos (ACE2: 5'-GCCGAAGACCTGTTCTATCAA-3'; AXL: 5'-CCTGTGGTCATCTTACCTT-3'; LFA-1: 5'-GCCATCAATTATGTTCGCGACA-3' o revuelto siRNA).

Luego las células transducidas se cultivaron con puromicina (5 μ g/ml para Caco2 o 1,5 μ g/ml para Jurkat) durante 7 días.

Para la sobreexpresión, la longitud total de AXL o dominio I de la subunidad alfa LFA-1 se amplificó a partir de células Hep G2 o células Jurkat, respectivamente. Las células transducidas por Lentivirus se cultivaron con higrocinina (35 μ g/ml para las células Caco2 y Jurkat) durante 7 días. Para la infección, se agregó virus a las células hasta el final del experimento con 0.01 MOI. Las células infectadas se cosecharon a 24 hpi después de lavar dos veces con PBS. La expresión de proteínas virales intracelulares se determinó mediante ensayo western blotting con anticuerpos contra la proteína NP del virus y el ARN viral en el citoplasma se determinó mediante qPCR.

Ensayo de bloqueo TMPRSS2

El mesilato de camostato (MCE, HY-13512-10 mM) se diluyó hasta una concentración final de 20 μ M o 2 μ M. En total, se agregaron 100 μ l (para una placa de 48 pocillos) o 200 μ l (para una placa de 24 pocillos) de soluciones de Camostat a las células. Una hora más tarde, las células activadas de Jurkat y Caco2 se infectaron con SARS-CoV-2 a 0,01 MOI. El lisado celular se recolectó a 24 hpi y el ARN viral en el citoplasma se determinó mediante qPCR. La NP viral fue analizada por Western blot.

Experimentos de inhibición de la competencia de proteínas receptoras candidatas

La proteína AXL humana recombinante (MedChemExpress, HY-P7622) se diluyó a diferentes concentraciones con medio de cultivo y luego se incubó con el virus SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) a un volumen de 1:1 a 37 °C durante 30 min. Luego se agregaron mezclas para infectar células Jurkat activadas y células BEAS-2B. Las muestras se recolectaron a 24 hpi y el ARN viral celular se determinó mediante qPCR.

Experimento de inhibición de LFA-1

Lifitegrast (MedChemExpress, HY-19344) se diluyó a diferentes concentraciones y se pretrataron células Jurkat activadas a 37 °C antes de la infección. Treinta minutos más tarde, las células se infectaron con SARS-CoV-2 (MOI = 0,01) y las muestras se cosecharon a 24 hpi. El ARN viral en el citoplasma se determinó mediante qPCR.

Microscopía electrónica

Las células activadas de Jurkat y MT4 se infectaron con el SARS-CoV-2 (MOI = 1) durante 72 h. Las células se recolectaron y fijaron con glutaraldehído al 2,5% (p/v) y tetróxido de osmio al 1%, se deshidrataron a través de una serie gradual de concentraciones de etanol (de 30 a 100%) y se incrustaron con resina epoxi. Se prepararon secciones ultrafinas (80 nm) de células incrustadas, depositadas en rejillas de cobre recubiertas de Formvar (malla

200), teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y analizadas con un microscopio electrónico Tecnai G2 de 200 kV.

Análisis estadístico

Los análisis de los datos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0. Los datos se mostraron como media \pm DE. Los datos fueron analizados con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y confirmados a la distribución gaussiana. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student con dos colas, 95% de confianza. Los valores de *p* inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

[Vete a:](#)

Información complementaria

[Materiales suplementarios para la infección independiente de ACE2 de linfocitos T por SARS-CoV-2](#) (896K, docx)

[Vete a:](#)

Agradecimientos

Agradecemos a todos los pacientes y sus familias por su dedicación a este estudio. También agradecemos al personal clínico por su dedicación a salvar vidas y recolectar muestras. Agradecemos al Sr. Ding Gao y a la Sra. Pei Zhang de la instalación central de WIV por su ayuda con la producción de inmunohistología y gráficos EM. Agradecemos al Centro Nacional de Recursos de Virus (NCRC) en el Instituto de Virología de Wuhan. Agradecemos a Hai-Feng Ye de la universidad normal del este de China por el apoyo de las células T primarias. Agradecemos a Liu-Yang Wang, del Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Duke por su apoyo bioinformático. Este trabajo fue financiado por la Fundación de Ciencias Naturales de China (excelentes académicos 81822028, 82041013 y 81772199 a P.Z., y 81974456 y 82170081 a H.L.Z.) y el Programa de Investigación Estratégica Prioritaria del CAS (número de subvención XDB29010204) a P.Z.

[Vete a:](#)

Contribuciones del autor

P.Z. y H.-L.Z. concibió el proyecto, planificó los experimentos y escribió el manuscrito con contribuciones de todos los demás autores. Z.-L.S. y K.P. ayudaron con el diseño del experimento. X.-R.S., Q.L., R.G., Y.C., S.-F.L. R.-D.J., X.-L.Y. y M.Q.L. realizaron la infección de células T BSL3 y ayudaron con la preparación de figuras. X.W., X.-S.Z. y J.M. hicieron citometría de flujo. Y.C. realizó inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. B.L., Z.Q.G., X.-R.S. y Q.L. detectaron la qPCR del virus. Q.W. e Y.Z. hicieron análisis de RNA-seq. R.G. hizo la detección de Western blot. X.-R.S. y S.-F.L. Apoptosis detectada. Y.Y. preparó la microscopía electrónica y las imágenes de microscopio de alto contenido. H.-L.L., Y.-L.Z., Z.-H.Z. y J.-K.J. ayudó a construir líneas celulares ACE2-KO. Q.-C.G. ayudó con el organoide. H.-L.Z. proporcionó las muestras de pacientes o donantes sanos. Todos los autores han leído y aprobado el artículo.

[Vete a:](#)

Disponibilidad de datos

Los datos presentados en este estudio están disponibles a petición de los autores correspondientes. Los datos no están disponibles públicamente debido a limitaciones en el acuerdo de transferencia de material.

[Vete a:](#)

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no hay intereses contrapuestos.

[Vete a:](#)

Declaración de consentimiento

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio.

[Vete a:](#)

Notas

Estos autores contribuyeron por igual: Xu-Rui Shen, Rong Geng, Qian Li, Ying Chen, Shu-Fen Li

[Vete a:](#)

Información del colaborador

Hui-Lan Zhang, correo electrónico: moc.361@67_znaliuh.

Peng Zhou, correo electrónico: nc.voi.hw@uohz.gnep.

[Vete a:](#)

Información complementaria

La versión en línea contiene material complementario disponible en 10.1038/s41392-022-00919-x.

[Vete a:](#)

Referencias

1. Hoffmann M, et al. La entrada de células SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de la proteasa clínicamente probado. *Celda*. 2020;181:271–280 E278. DOI: 10.1016/j.Cell.2020.02.052. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Li W, et al. La enzima convertidora de angiotensina 2 es un receptor funcional para el coronavirus del SARS. *Naturaleza*. 2003;426:450–454. doi: 10.1038/nature02145. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Monteil V, et al. Inhibición de las infecciones por SARS-CoV-2 en tejidos humanos diseñados utilizando ACE2 humana soluble de grado clínico. *Celda*.

2020;181:905–913 E907. DOI: 10.1016/J.cell.2020.04.004. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

4. Wang Q, et al. Bases estructurales y funcionales de la entrada de SARS-CoV-2 mediante el uso de ACE2 humana. *Celda*. 2020;181:894–904 E899. DOI: 10.1016/J.Cell.2020.03.045. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

5. Zhou, P, et al. Un brote de neumonía asociado con un nuevo coronavirus de probable origen murciélago. *Nature* **579**, 270–273 (2020). [[Artículo libre de PMC](#)] [[PubMed](#)]

6. Guan WJ, et al. Características clínicas de la enfermedad por coronavirus 2019 en China. *N. Engl. J. Med.* 2020;382:1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

7. Huang C, et al. Características clínicas de pacientes infectados con el nuevo coronavirus 2019 en Wuhan, China. *Lanceta*. 2020;395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

8. Wang D, et al. Características clínicas de 138 pacientes hospitalizados con neumonía infectada por el nuevo coronavirus 2019 en Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323:1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

9. Xu Z, et al. Hallazgos patológicos de COVID-19 asociados con el síndrome de dificultad respiratoria aguda. *Lancet Respir*. 2020;8:420–422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X. [[Artículo libre PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

10. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Desarrollo, localización y función de las células T humanas a lo largo de la vida. *Inmunidad*. 2018;48:202–213. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.007. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

11. Chu H, et al. El coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio infecta eficientemente a los linfocitos T primarios humanos y activa las vías de apoptosis extrínsecas e intrínsecas. *J. Infectar. Dis.* 2016;213:904–914. doi: 10.1093/infdis/jiv380. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

12. Gu J, et al. Infección de múltiples órganos y la patogénesis del SARS. *J. Exp. Med.* 2005;202:415–424. DOI: 10.1084/JEM.20050828. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

13. Bian XW, Equipo de patología COVID-19. Autopsia de víctimas de COVID-19 en China. *Natl Sci. Rev.* 2020;7:1414–1418. DOI:

10.1093/NSR/NWAA123. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

14. Ren X, et al. COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas (Características inmunes de COVID-19 reveladas por un atlas de transcriptoma unicelular a gran escala). *Celda*. 2021;184:1895–1913 E1819. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.053. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

15. Delorey TM, et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Naturaleza*. 2021;595:107–113. DOI: 10.1038/S41586-021-03570-8. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Codo AC, et al. Los niveles elevados de glucosa favorecen la infección por SARS-CoV-2 y la respuesta de monocitos a través de un eje dependiente de HIF-1alfa/glucólisis. *Celda Metab*. 2020;32:498–499. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.07.015. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

17. Zheng J, et al. Activación inmune inducida por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo y la muerte de macrófagos humanos derivados de monocitos y células dendríticas. *J. Infectar. Dis*. 2021;223:785–795. doi: 10.1093/infdis/jiaa753. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

18. Cantuti-Castelvetri L, et al. La neuropilina-1 facilita la entrada de células del SARS-CoV-2 y la infectividad. *Ciencia*. 2020;370:856–860. doi: 10.1126/science.abd2985. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

19. Wang S, et al. AXL es un receptor candidato para el SARS-CoV-2 que promueve la infección de las células epiteliales pulmonares y bronquiales. *Celda Res*. 2021;31:126–140. doi: 10.1038/s41422-020-00460-y. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

20. Gu Y, et al. El perfil de Receptome identifica KREMEN1 y ASGR1 como receptores funcionales alternativos del SARS-CoV-2. *Celda Res*. 2022;32:24–37. doi: 10.1038/s41422-021-00595-6. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

21. Hanel K, Willbold D. SARS-CoV accessory protein 7a interactúa directamente con LFA-1 humano. *Biol. Chem*. 2007;388:1325–1332. doi: 10.1515/BC.2007.157. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]

22. Mao D, Lu S, Li N, Zhang Y, Long M. Conformational stability analysis of alpha subunit I domain of LFA-1 and Mac-1. *PLoS ONE*. 2011; 6:E24188. doi: 10.1371/journal.pone.0024188. [[Artículo gratuito PMC](#)][[PubMed](#)] [[CrossRef](#)][[Google Scholar](#)]

23.Darcy CJ, et al. Los neutrófilos con función supresora derivada de mieloides agotan la arginina y constriñen la función de las células T en pacientes con shock séptico. *Cuidado crítico*. 2014; 18:R163. DOI: 10.1186/CC14003. [[Artículo gratuito PMC](#)][[PubMed](#)] [[CrossRef](#)][[Google Scholar](#)]

24.Crespo M, et al. Organoides colónicos derivados de células madre pluripotentes inducidas por humanos para modelar el cáncer colorrectal y pruebas farmacológicas. *Nat. Med.* 2017; 23:878–884. DOI: 10.1038/NM.4355. [[Artículo gratuito PMC](#)][[PubMed](#)] [[CrossRef](#)][[Google Scholar](#)]