

[Saltar al contenido principal](#)

- [Búsqueda](#)
- [Acceso](#)

- [Contenido](#)
- [Acerca de](#)
- [Publicar](#)

[Descargar PDF](#)

- Artículo
- [Publicado:31 enero 2022](#)

Reconocimiento e inhibición del SARS-CoV-2 por moléculas de reconocimiento de patrones de inmunidad innata humoral

- [Mateo Stravalaci](#) ,
- [Isabel Paganí](#) ,
- ...
- [Cecilia Garlanda](#)

Mostrar autores

[Inmunología de la naturaleza](#) **volumen 23** , paginas275–286

( 2022 ) [Citar este artículo](#)

- **10k** Accesos
- **236** Altmetric
- [Métricadetalles](#)

Abstracto

El brazo humoral de la inmunidad innata incluye diversas moléculas con funciones similares a las de los anticuerpos, algunas de las cuales sirven como biomarcadores de la gravedad de la enfermedad en la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). El presente estudio fue

diseñado para realizar una investigación sistemática de la interacción de las moléculas de reconocimiento de patrones de fase fluida humoral humana (PRM) con el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). De 12 PRM probados, la pentraxina 3 larga (PTX3) y la lectina de unión a manosa (MBL) se unieron a la nucleocápsida viral y las proteínas de pico, respectivamente. La MBL se unió a la proteína espiga trimérica, incluida la de las variantes de interés (VoC), de manera dependiente de glicanos e inhibió el SARS-CoV-2 en tres modelos *in vitro*. Además, después de unirse a la proteína espiga, la MBL activó la vía de la lectina de activación del complemento. Según la retención de los sitios de glicosilación y el modelado, se predijo que MBL reconocería el Omicron VoC. Polimorfismos genéticos en el *locus MBL2* se asoció con la gravedad de la enfermedad. Estos resultados sugieren que los PRM de fase fluida humoral seleccionados pueden desempeñar un papel importante en la resistencia y la patogénesis de COVID-19, un hallazgo con implicaciones traslacionales.

[Descargar PDF](#)

## Principal

---

El SARS-CoV-2 es un coronavirus altamente patógeno y el agente causal de la actual pandemia de COVID-19 [1](#)·[2](#)·[3](#) . Se considera que la inmunidad innata desempeña un papel fundamental en esta afección y puede erradicar la infección en sus primeras fases antes de que se produzcan las respuestas inmunitarias adaptativas. En las formas graves de la enfermedad, la activación descontrolada de la inmunidad innata y adaptativa resulta en respuestas hiperinflamatorias, que afectan el pulmón y los vasos sanguíneos, contribuyendo al síndrome de dificultad respiratoria aguda, shock y falla multiorgánica [4](#) .

La inmunidad innata incluye un brazo celular y un brazo humoral [5](#) . El brazo humoral está formado por PRM solubles pertenecientes a diferentes familias, que incluyen colectinas (por ejemplo, MBL), ficolinas, pentraxinas (proteína C reactiva (PCR), componente P de amiloide sérico (SAP) y PTX3) y C1q [5](#)·[6](#)·[7](#) . Los PRM humorales

representan ancestros funcionales de los anticuerpos (anteanticuerpos), ya que reconocen componentes microbianos y eliminan patógenos con mecanismos comunes que incluyen aglutinación, neutralización, activación de la cascada del complemento y opsonización facilitando la fagocitosis [5](#). Las investigaciones sobre el papel de la inmunidad innata humoral en la detección viral han demostrado que las colectinas se unen a las glicoproteínas de la envoltura de los virus con envoltura, incluido el virus de la influenza A, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis C y el virus del herpes simple, y al rotavirus sin envoltura [6](#). Esta interacción puede resultar en opsonización, aglutinación, inhibición de la fusión viral y entrada o activación del complemento, lo que generalmente conduce a la inhibición de la infección [6](#). Entre las pentraxinas, se ha demostrado que la pentraxina larga PTX3 interactúa con el virus de la influenza tipo A del subtipo H3N2 al interactuar con las glicoproteínas hemaglutinina y neuraminidasa de la cubierta viral a través de un residuo de ácido siálico en su fracción glucosídica [8](#), con el citomegalovirus (CMV) [9](#) y con la cepa 1 del virus de la hepatitis murina coronavirus (ref. [10](#)), previniendo la infección viral.

Varias líneas de evidencia, incluidas las asociaciones genéticas, indican que la inmunidad celular innata y las citocinas y quimiocinas relacionadas desempeñan un papel clave en el reconocimiento del SARS-CoV-2, la resistencia antiviral y, en etapas posteriores, la enfermedad grave [11](#)·[12](#)·[13](#)·[14](#). Por el contrario, hay poca información disponible sobre el papel del brazo humoral de la inmunidad innata en la resistencia y la patogénesis de COVID-19 a pesar de la importancia del pronóstico clínico de CRP y PTX3 (refs. [15](#)·[16](#)).

El presente estudio fue diseñado para realizar una investigación sistemática de la interacción de los PRM humorales humanos con el SARS-CoV-2. Descubrimos que PTX3 y MBL se unieron a la proteína de la nucleocápsida y la proteína de punta del SARS-CoV-2, respectivamente. MBL reconoció VoC, tuvo actividad antiviral y activó la vía de la lectina del complemento. Los polimorfismos genéticos en el locus *MBL2* se asociaron con la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, los PRM (anticuerpos) en fase fluida seleccionados desempeñan

un papel esencial en la resistencia y la patogénesis de COVID-19, un hallazgo con implicaciones traslacionales.

## Resultados

### **Interacción de PRM humorales con proteínas SARS-CoV-2**

Para estudiar el papel de los PRM humorales en el reconocimiento del SARS-CoV-2, primero investigamos la interacción entre las moléculas de inmunidad innata humoral humana recombinante y las proteínas del SARS-CoV-2 mediante un ensayo de unión en fase sólida. Primero analizamos las pentraxinas y no observamos la unión específica de CRP o SAP a ninguna de las proteínas del SARS-CoV-2 analizadas (subunidad S1 de proteína de punta, subunidad S2 de proteína de punta, trímero activo de proteína de punta, nucleocápside y proteína de envoltura) (Fig. [1a,b](#)). Por el contrario, PTX3 se unió de manera específica y dependiente de la dosis a la proteína de la nucleocápside, una de las proteínas más abundantes del SARS-CoV-2 (ref. [17](#)) (Fig. [1c](#)). Validamos este resultado al confirmar la unión de PTX3 con la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 obtenida de diferentes fuentes (Datos extendidos Fig. [1](#)). PTX3 es una glicoproteína multimérica dispuesta en una estructura octámera. Cada protómero comprende una región N-terminal flexible y un dominio C-terminal con homología con la familia de las pentraxinas cortas [5](#). Para definir qué porción de la molécula estaba involucrada en la interacción, comparamos la unión de PTX3 de longitud completa y sus dominios N-terminal o C-terminal a la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2. Los resultados indican que PTX3 interactúa con la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 principalmente a través de su dominio N-terminal, aunque con menor afinidad que la PTX3 de longitud completa (Fig. [1d](#)).

**Fig. 1: Interacción entre pentraxinas y proteínas SARS-CoV-2.**

**a – c** , proteínas recombinantes His tag SARS-CoV-2 (trímero activo de pico (S), S1, S2, nucleocápside (N) y envoltura (E); la leyenda se refiere a **a – c** ) se inmovilizaron en níquel de 96 pocillos -Placas recubiertas a diferentes concentraciones. Se incubaron concentraciones fijas de SAP (**a** ), CRP (**b** ) y PTX3 (**c** ) sobre las proteínas virales capturadas. Las pentraxinas unidas se detectaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con anticuerpos primarios específicos. **D**, PTX3 de longitud completa o los dominios N- o C-terminal se capturaron en placas de 96 pocillos. La proteína de la nucleocápsida del SARS-CoV-2 biotinilada se incubó a diferentes concentraciones. La nucleocápsida unida se detectó mediante ELISA usando estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Todos los datos se presentan como media  $\pm$  sem;  $n = 3$  experimentos independientes realizados por duplicado; DO450 , densidad óptica a 450 nm.

[Datos fuente](#)

[imagen a tamaño completo](#)

We next investigated the interaction between PRMs of the classical pathway and the lectin pathway of complement (C1q and the collectin MBL, respectively) and the viral proteins. C1q did not interact with any protein tested (Fig. [2a](#)). By contrast, human MBL bound to SARS-CoV-2 spike protein (Wuhan strain<sub>1</sub>, active trimer) but not to the individual SARS-CoV-2 spike protein subunits S1 (containing the receptor-binding domain (RBD)) and S2 (containing the membrane fusion domain) (Fig. [2b](#)). We validated these data by analyzing the binding of MBL to different recombinant SARS-CoV-2 spike proteins obtained

from different sources or produced in-house either in HEK293 cells, CHO cells or insect cells (Fig. [2c](#)). All these preparations were bound by MBL, although with some differences. Notably, we did not observe binding when we tested a non-covalent trimer of the SARS-CoV-2 spike protein. These results indicate that a native-like structure of the SARS-CoV-2 spike protein (presumably in the trimeric conformation) is indispensable for MBL recognition.

**Fig. 2: Interaction of C1q, MBL, ficolins and surfactant proteins with SARS-CoV-2 proteins.**

**a – c** , las proteínas recombinantes His tag SARS-CoV-2 (trímero activo de pico (S), S1, S2, nucleocápside (N) y envoltura (E)) se inmovilizaron en placas recubiertas de níquel de 96 pocillos a diferentes concentraciones. Se incubaron concentraciones fijas de C1q (**a**) o MBL (**b**) sobre las proteínas virales capturadas. Las proteínas de punta de SARS-CoV-2 recombinantes analizadas se expresaron en diferentes tipos de células (**c**). Se incubó MBL ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; 6,7 nM) sobre las proteínas virales capturadas. En **a – c** , las proteínas unidas fueron detectadas por ELISA con anticuerpos primarios específicos. Los datos en **ayb** se presentan como media  $\pm$  sem ; *norte* = 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Los datos en **c** se presentan como media  $\pm$  sem; *n* = 2 experimentos independientes, uno realizado por duplicado y otro por triplicado. **d** , **e** , placas recubiertas con MBL, CL-L1, CL-K1, CL-P1, SP-D y SP-A o (**d**) recubiertas con ficolin-1, ficolin-2 y ficolin-3 las placas (**e**) se incubaron con varias concentraciones de proteína de punta de SARS-CoV-2 biotinilada. La proteína espiga unida se detectó mediante ELISA con estreptavidina conjugada con HRP (media  $\pm$  sem; *n* = 3 experimentos independientes por duplicado). **f** , SPR muestra la unión del trímero de proteína de punta completa recombinante a MBL inmovilizada (constante de disociación ( $K_d$ ) = 34 nM, izquierda). No se detectó unión en ausencia de  $\text{CaCl}_2$  (derecha); RU, unidades de resonancia.

[Datos fuente](#)

[imagen a tamaño completo](#)

MBL es un miembro de la familia de las colectinas, una clase de PRM compuesta por un dominio de lectina de tipo  $\text{Ca}^{2+}$  (también llamado dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD)) y un dominio similar al colágeno [6](#) . Por lo tanto, analizamos la interacción de la proteína espiga del SARS-CoV-2 con otras colectinas involucradas en la inmunidad innata, como la colectina-10, la colectina-11 y la colectina-12 (también conocidas como CL-L1/CL-10, CL-K1 /CL-11 y CL-P1/CL-12) y las proteínas del surfactante pulmonar SP-A y SP-D. También ampliamos el análisis a ficolin-1, ficolin-2 y ficolin-3 recombinantes, una familia de proteínas conocidas por activar la vía de la lectina del complemento y estructuralmente relacionadas con MBL. A diferencia

de MBL, la colecta-10, la colecta-11, la colecta-12, la SP-A, la SP-D y las ficolinas no se unieron a la proteína espiga del SARS-CoV-2 (Fig. [2d](#), [Extended Data Fig. 1](#)), lo que indica que el reconocimiento de la proteína espiga es exclusivo de MBL.

Caracterizamos además la interacción de la proteína espiga SARS-CoV-2 con MBL mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Se hicieron fluir diferentes concentraciones de proteína de pico de SARS-CoV-2 recombinante o dominio RBD sobre MBL inmovilizado en la superficie del biosensor. La proteína de punta trimérica SARS-CoV-2 formó un complejo dependiente de calcio estable con afinidad nanomolar ( $K_d = 34$  nM), mientras que MBL no se unió al RBD aislado (Fig. [2f](#) y [Extended Data Fig. 2](#)), confirmando los resultados obtenidos utilizando la subunidad S1.

Estos resultados indican que de 12 PRM humorales probados en un ensayo de unión en fase sólida, PTX3 y MBL se unieron a la proteína de la nucleocápside y la proteína de pico del SARS-CoV-2, respectivamente.

### **Interacción de MBL con lentivirus pseudotipados en espiga**

Para imitar la interacción entre MBL y la proteína espiga del SARS-CoV-2 en su conformación fisiológica en la envoltura viral, investigamos la unión de partículas virales de la proteína espiga del SARS-CoV-2 seudotipadas en un vector de lentivirus a placas recubiertas con MBL. La interacción se determinó lisando el pseudovirus unido y midiendo la proteína central p24 del vector lentiviral liberada mediante ELISA. Si bien las partículas de control lentivirales seudotipadas con la glicoproteína g del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (pseudovirus VSV) no dieron como resultado ninguna unión, las que expusieron la proteína del pico del SARS-CoV-2 mostraron una interacción específica con la MBL (Fig. [3a](#)). Estos datos sugieren fuertemente que MBL también puede interactuar con la proteína de pico SARS-CoV-2 expuesta en la superficie del virus.

**Fig. 3: Interacción de MBL con la proteína espiga del SARS-CoV-2 a través de su CRD.**



**a** , Unión de MBL a la proteína espiga (Spike-LV) o lentivirus pseudotipado VSV-g (línea de puntos roja). Los datos se presentan como media  $\pm$  sem;  $n = 2$  experimentos independientes realizados con dos a seis repeticiones técnicas. **b** , Unión de MBL a proteína espiga, sola o en presencia de D -manosa, N -acetilglucosamina o D -glucosa. Los datos se presentan como media  $\pm$  sem;  $n = 4$  experimentos independientes. **c** , modelo trimérico MBL2 que muestra la distancia (aproximadamente 40 Å) entre los sitios de unión de manosa (esferas blancas). **D**, Catorce sitios de unión a manosa (triángulos rojos) impuestos a la proteína espiga, donde la región S1 (1–685) es verde, el comienzo de la región S2 (686–815) es negro y la región S2' es blanca. **e** , sitio de unión putativo de MBL2. La estructura se presenta con la probabilidad específica de sitio más alta de ser glicosilada con oligomanosa. **f** , El complejo espiga-MBL. Los sitios de glicosilación están coloreados según el contenido de oligomanosa: oro, <60%; púrpura, >80% hasta la región S2'; azul, >80% en la región S2'. **gramo**, Representación esquemática de los sitios de glicosilación y las sustituciones de nucleótidos en las cepas variantes identificadas hasta la fecha. Se muestran los sitios glicosilados con oligomanosa. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) comunes a todas las variantes están en negrita; NTD, dominio N-terminal; FP, péptido de fusión; HR1 y HR2, repetición heptada 1 y 2; se informan los sitios de escisión. **h** , Unión de MBL a variantes de proteína de punta de SARS-CoV-2. Los datos se presentan como media  $\pm$  sem;  $n = 2$  experimentos independientes realizados por triplicado. **i** , Deposición del complejo de ataque a la membrana (MAC) (C5b-9) sobre la proteína espiga. Los datos se presentan como media  $\pm$  sem;  $norte = 3$  de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se calculó mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey; NHS, suero humano normal; HI-NHS, suero humano normal inactivado por calor; C1qDHS, suero humano empobrecido en C1q; C4DHS, suero humano empobrecido en C4; C3DHS, suero humano empobrecido en C3; MBL ID, suero inmunodepletado de MBL; rhMBL, MBL humana recombinante.

[Datos fuente](#)

[imagen a tamaño completo](#)

## **La MBL interactúa con los sitios glucosídicos de la proteína espiga del SARS-CoV-2**

La proteína del pico SARS-CoV-2 está altamente glicosilada, como se describe recientemente en la ref. [18](#) . De los 22 sitios de N-glicosilación, 8 contienen glicanos de tipo oligomanosa, que podrían ser sitios de interacción para la MBL CRD. Para abordar esta posibilidad, realizamos un ensayo de competencia basado en solución con D -manosa y N -acetil-glucosamina, dos ligandos específicos de la lectina. LA D -manosa y la N -acetil-glucosamina inhibieron la unión de MBL a la proteína de punta (Fig. [3b](#) ), confirmando así la interacción dependiente de  $Ca^{2+}$  entre el dominio de lectina de MBL y los sitios glucosídicos expuestos por la proteína de punta. D-La glucosa, un ligando no específico de MBL, inhibió la interacción solo a concentraciones más altas (Fig. [3b](#) ). Según la alineación de la estructura cristalina de MBL con moléculas de manosa (Fig. [3c](#) ), identificamos 14 sitios de unión putativos en la proteína de punta (Fig. [3d](#) ). A continuación, consideramos los sitios que tienen una ocupación de oligomanosilación alta ( $> 80\%$ ) [18](#) . Este análisis proporcionó dos posibles sitios de unión a MBL, a saber, N603, N801 y N1074, todos en la misma cadena de picos, o N603, N1074 y N709, con N709 en una cadena vecina (Fig. [3e](#) ). Curiosamente, en ambos casos, los sitios de unión de MBL hipotéticos se extienden a lo largo de las regiones S1 y S2 de la proteína de pico (Fig. [3f](#) ), proporcionando pistas sobre un posible mecanismo de inhibición. Estos datos indican que el estado de glicosilación de la proteína espiga del SARS-CoV-2 es importante para su interacción con la MBL.

## **Interacción de MBL con proteína espiga de VoC**

Luego probamos si MBL reconocía las proteínas de punta de VoC. Primero, analizamos si las mutaciones reportadas afectaron los 22 sitios de glicosilación conocidos de cada protómero. La Fig. [3g](#) muestra una representación esquemática de las 22 posiciones de las secuencias de glicosilación unidas a N y de 66 mutaciones conocidas de VoC y variantes de interés, incluidas las variantes Epsilon, Lambda y Omicron recientemente agregadas, lo que indica que ninguna de estas mutaciones involucra los sitios de glicosilación. y sugiriendo que MBL podría interactuar con las variantes con la misma afinidad. De acuerdo con nuestros ensayos de unión, no se esperan sitios objetivo de MBL

en el RBD. Curiosamente, los sitios de unión a MBL predichos se conservan en Omicron VoC, como se muestra en el modelo complejo de espiga-MBL (Datos extendidos Fig. 3). Evaluamos mediante un ensayo de fase sólida la interacción de MBL con la proteína trimérica de punta SARS-CoV-2 D614G, la variante B.1.1.7 (Alpha; surgió en el Reino Unido), la B.1.1.28 o P.1 variante (Gamma; surgida en Brasil), la variante B.1.351 (Beta; surgida en Sudáfrica) y la variante B.1.617.2 (Delta; surgida en India), que actualmente es una gran preocupación en todo el mundo (Fig. 3h). De acuerdo con el análisis in silico, MBL se unió de manera eficiente a las proteínas pico de VoC probadas. Estos resultados indican que los sitios potenciales de unión a MBL se conservan en las proteínas de pico de VoC, y la afinidad de la interacción con MBL no se ve afectada por estas mutaciones.

### **Activación de la vía de las lectinas del complemento**

A continuación, probamos si la interacción de MBL con la proteína espiga podría activar la vía de la lectina del complemento. Incubamos placas recubiertas de proteína de pico de SARS-CoV-2 con suero humano o suero empobrecido en C1q, C4 o C3, y evaluamos la deposición de C5b-9. La incubación con suero humano normal o suero empobrecido en C1q dio como resultado la deposición de complemento mediada por la proteína de pico SARS-CoV-2 (Fig. 3i, izquierda). Por el contrario, la incubación con un suero empobrecido en C4 redujo fuertemente la deposición de C5b-9, con niveles comparables a los observados con suero inactivado por calor o suero empobrecido en C3. La reconstitución del suero empobrecido en C4 con C4 purificado restableció los niveles de depósito de C5b-9 similares a los observados con el suero humano normal. Para abordar aún más el papel de la MBL en la activación del complemento mediada por la proteína de pico de SARS-CoV-2, evaluamos la deposición de C5b-9 incubando suero humano normal o suero inmunodepletado de MBL sobre la proteína de pico de SARS-CoV-2 capturada, ya sea como activa o no. -trímero covalente (Fig. 3i, derecho). De acuerdo con los datos de unión, no se observó depósito de complemento con la proteína espiga trimérica no covalente. En particular, el inmunoagotamiento de MBL del suero humano resultó en una reducción significativa en la deposición de C5b-9, que podría revertirse por completo mediante la adición de rhMBL (Fig. 3i, derecha). Estos

datos indican claramente que la proteína espiga del SARS-CoV-2, al interactuar con la MBL, activa la vía de la lectina del complemento.

### **Inhibición del SARS-CoV-2 por MBL**

Para validar la relevancia de la interacción entre MBL y la proteína de pico SARS-CoV-2, investigamos si MBL inhibía la entrada de SARS-CoV-2 en células susceptibles. Primero probamos el efecto de MBL y otros PRM solubles (dilución en serie diez veces, de 0.01 a 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en la entrada de partículas virales de la proteína de punta del SARS-CoV-2 pseudotipada en un vector de lentivirus en células 293T que sobreexpresan angiotensina-enzima convertidora 2 (ACE2). Entre los PRM solubles probados, se descubrió que MBL era la única molécula con actividad anti-SARS-CoV-2. La entrada viral mediada por picos fue inhibida en un 90 % a la concentración más alta de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (34 nM), con un valor de concentración efectiva media máxima ( $\text{CE}_{50}$ ) de aproximadamente 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (1,7 nM) (Fig. [4a](#)). Como control, la entrada de partículas lentivirales pseudotipadas con la glicoproteína VSV-g no fue inhibida por MBL (Fig. [4a](#)).

**Fig. 4: Inhibición de la infección por SARS-CoV-2 por MBL.**

**a** , Entrada de partículas lentivirales pseudotipadas con proteína de pico de SARS-CoV-2 en células 293T que sobreexpresan ACE2 en presencia de diluciones seriadas de diez veces de PRM de inmunidad innata humoral (de 0,01 a 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Como control, se probó en paralelo la entrada de partículas lentivirales pseudotipadas con la glicoproteína VSV-g en presencia de MBL. El porcentaje de control se calculó como la proporción de células positivas para proteína fluorescente verde (GFP) en presencia de PRM humorales con respecto a las células positivas para GFP en ausencia de PRM humorales. Los datos se presentan como medias  $\pm$  sem;  $n = 3$  experimentos independientes por triplicado, con las curvas que representan un modelo de dosis-respuesta de tres parámetros. **segundo - f**, Inhibición de la infectividad del D614G (aislado EPI\_ISL\_413489) (**b**), B.1.1.7 (Alpha) (**c**), B.1.351 (Beta) (**d**), P.1 (Gamma) (**e**) y B. 1.617.2 (Delta) (**f**) Variantes de SARS-CoV-2 por MBL en células Calu-3. Las células SARS-CoV-2 (multiplicidad de infección (MOI) = 0,1) y Calu-3 se preincubaron en medio completo que contenía diferentes concentraciones de MBL (0,01–10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; 0,034–34 nM) antes de la infección. A las 48 y 72 h después de la infección, se determinó la infectividad del SARS-CoV-2 presente en los sobrenadantes de cultivos celulares mediante un ensayo de formación de placas en células Vero; NIL, sin MBL; PFU, unidades formadoras de placa. Los datos se presentan como valores medios; *norte* = 3 experimentos de cultivo celular independientes por duplicado (**b – d**) o  $n = 2$  experimentos de cultivo celular independientes por duplicado (**e y f**); \*\*\*  $P = 5,49 \times 10^{-4}$  y \*\*\*\*  $P = 6,38 \times 10^{-5}$  (**b**); \*\*  $P = 0,0072$  y \*\*\*\*  $P = 5,57 \times 10^{-5}$  (**c**); \*\*  $P = 0,0065$ , \*\*\*\*  $P = 4,91 \times 10^{-5}$  NIL frente a 1 y \*\*\*\*  $P = 7,14 \times 10^{-6}$  NIL frente a 10 (**d**); \*\*\*  $P = 3,40 \times 10^{-4}$  y \*\*\*\*  $P = 6,31 \times 10^{-6}$  (**e**); \*\*\*\*  $P = 5,68 \times 10^{-5}$  NIL frente a 1 y \*\*\*\*  $P = 4,04 \times 10^{-6}$  NIL frente a 10 (**f**). El análisis estadístico se determinó mediante ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

[Datos fuente](#)

[imagen a tamaño completo](#)

A continuación, probamos la actividad antiviral de MBL en la infección por SARS-CoV-2 de modelos epiteliales de pulmón relevantes para infecciones humanas. Entre varias líneas de células epiteliales derivadas de pulmón, se ha demostrado que las células Calu-3 (adenocarcinoma de pulmón humano) son permisivas a la infección por SARS-CoV-2 [19](#). El SARS-CoV-2 (variante D614G; MOI = 0,1 y 1) se preincubó en medio completo que contenía diferentes concentraciones de MBL (0,01–10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; 0,034–34 nM) antes de la incubación con células Calu-3. Después de 48 y 72 h, se determinó la infectividad del SARS-CoV-2 presente en los sobrenadantes de cultivos celulares mediante un ensayo de formación de placas en células Vero derivadas de mono. Las células Vero son una línea celular útil que se utiliza en todo el mundo, ya que carece de la respuesta de interferón (IFN) [20](#), por esta razón, es un gran apoyo para la replicación del virus. La MBL mostró una inhibición dependiente de la concentración de la infección por SARS-CoV-2 de las células Calu-3 a una MOI de 0,1 y 1 (datos extendidos Fig. [4a](#)) que fue estadísticamente significativa a 1 y 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (3,4 y 34 nM) 72 h después de la infección. Cuando tanto el virus como las células se preincubaron con las mismas concentraciones de MBL (0,01–10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; 0,034–34 nM), la actividad antiviral aumentó significativamente desde 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (0,34 nM) hasta la concentración máxima de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (34 nM) 72 h después de la infección (Fig. [4b](#) y datos extendidos Fig. [4b](#)). La  $\text{CE}_{50}$  calculada fue de 0,08  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (0,27 nM) a las 72 h después de la infección. En particular, MBL mostró una inhibición dependiente de la concentración de la infección de las células Calu-3 también por la variante SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Alpha) en un MOI de 0.1 (Fig. [4c](#)) y un MOI de 0.01 (Extendido Datos Fig. [4c](#)) y por la variante B.1.351 (Beta) a un MOI de 0,1 (Fig. [4d](#)), la variante P.1 (Gamma) a un MOI de 0,1 (Fig. [4e](#)) y el B.1.617. 2 (Delta) variante a un MOI de 0,1 (Fig. [4f](#)).

Además, se utilizó un modelo tridimensional (3D) de células epiteliales bronquiales humanas (HBEC) para probar si MBL inhibía la replicación del SARS-CoV-2. La producción de SARS-CoV-2 en la superficie apical epitelial aumentó considerablemente a las 48 h después de la infección (no se muestra), alcanzando  $48 \times 10^6 \pm 6 \times 10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  (media  $\pm$  sem) 72 h después de la infección. El tratamiento de HBEC con MBL disminuyó la producción viral a  $4 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  72 h

después de la infección a la concentración más alta de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  (170 nM) (Fig. [5a](#)). Por el contrario, el tratamiento con PTX3 no fue efectivo para inhibir la producción de virus (Datos extendidos Fig. [4d](#)). Luego evaluamos si MBL afectó las respuestas inflamatorias en HBEC después de la infección por SARS-CoV-2 en estas condiciones experimentales. El tratamiento con MBL inhibió la producción de interleucina-8 (IL-8) y CXCL5, dos quimiocinas implicadas en el reclutamiento y activación de células mieloides (Datos ampliados, Fig. [4e](#)).

**Fig. 5: Inhibición por MBL de la infección por SARS-CoV-2 de células respiratorias primarias.**



**a** , producción de SARS-CoV-2 en la superficie apical de HBEC a las 72 h después de la infección en presencia de 10 o 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (34 o 170 nM) de MBL. Los datos se presentan como valores medios; *Se muestran*  $n = 3$  experimentos independientes realizados en cultivos celulares por triplicado (dos donantes) o individuales (un donante). *Los valores de*  $P$  se determinaron mediante ANOVA unidireccional con corrección de Bonferroni ( **a** ); \*\*\*\*  $P = 2,85 \times 10^{-5}$  y \*\*  $P = 0,0032$ . **b - e** , Colocalización de la proteína de pico SARS-CoV-2 y MBL en HBEC infectados. **B**, Análisis confocal de la localización de la proteína de pico de SARS-CoV-2 (verde) y MBL (rojo) en cultivos HBEC infectados con SARS-CoV-2 en presencia o ausencia de MBL (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ; 170 nM); izquierda, imágenes combinadas de señales de fluorescencia; derecha, señales individuales extraídas. Se muestran imágenes representativas de proyección de intensidad media (MIP) de pilas  $z$  adquiridas en la modalidad de mosaico;  $n = 2$  réplicas celulares por condición de un donante, cuatro y nueve pilas  $z$  ; barra de escala, 30  $\mu\text{m}$ . **c** , izquierda, señales extraídas de la proteína de pico SARS-CoV-2 y MBL de **b** ; barra de escala, 30  $\mu\text{m}$ ; derecha, tasa de colocalización entre la proteína de punta (S) del SARS-CoV-2 y la MBL (10 o 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; 34 o 170 nM). Cada punto corresponde a una sola imagen  $xyz$  presentada como MIP. Los datos se presentan como media  $\pm$  sem; basal (-),  $n = 4$   $z$  pilas; S,  $n = 4$  pilas  $z$  ; S/MBL, 10,  $n = 8$  pilas  $z$  ; S/MBL, 50,  $n = 12$  pilas  $z$  , de dos réplicas celulares. **d** , Una representación 3D de **b**(derecha), que muestra una reconstrucción combinada de la localización entre la proteína espiga del SARS-CoV-2 y la MBL en cultivos de HBEC; izquierda, contribución de señales combinadas; barra de escala, 30  $\mu\text{m}$ ; en el medio, imagen extraída de la señal de la proteína espiga del SARS-CoV-2 y MBL; a la derecha, imagen de primer plano que hace referencia al área delineada en blanco. Una representación 3D de una pila  $z$  *representativa de c* . **e** , análisis de agotamiento de emisiones estimuladas (STED) de la localización de la proteína de pico SARS-CoV-2 y MBL en HBEC;  $N = 1$  cultivo celular y siete adquisiciones STED; a la izquierda, señales combinadas de la proteína espiga del SARS-CoV-2 y la MBL y el núcleo; derecha, señales individuales extraídas; barra de escala, 3  $\mu\text{m}$ .

[Datos fuente](#)

[imagen a tamaño completo](#)

Luego evaluamos la aparición de interacción de proteína MBL-pico en HBEC infectados con SARS-CoV-2 mediante microscopía confocal. MBL colocalizado con proteína de punta SARS-CoV-2 en células infectadas (Fig. [5b, c](#)). En las imágenes renderizadas en 3D de los cultivos HBEC (Fig. [5d](#) y Video complementario [1](#)), la colocalización se asoció preferentemente con el lado apical de las células positivas para citoqueratina 14 (Krt14). También se obtuvo evidencia de la interacción entre MBL y la proteína de punta SARS-CoV-2 en HBEC infectados a escala molecular (resolución espacial  $< 100 \text{ nm xy}$ ) en microscopía de súper resolución basada en STED (Fig. [5e](#)).

Estos resultados indican que MBL inhibe la infección por SARS-CoV-2 de una línea de células epiteliales derivadas de pulmón humano y células bronquiales primarias, reduce la respuesta inflamatoria inducida y se colocaliza con la proteína de pico de SARS-CoV-2 en las células infectadas.

### **Las variantes de MBL2 están asociadas con COVID-19 grave**

La MBL humana está codificada por el gen *MBL2*, que contiene variantes polimórficas tanto en la parte reguladora como en la estructural del gen. Estas variantes están asociadas a la concentración sérica de la proteína [21](#). Se ha demostrado que las variantes genéticas *de MBL2 se correlacionan con una mayor susceptibilidad a infecciones seleccionadas, incluido el SARS* [22](#). Para explorar la importancia de nuestros resultados in vitro en el marco de la pandemia de COVID-19, investigamos la posible asociación de polimorfismos *MBL2* con COVID-19 grave con insuficiencia respiratoria en una cohorte italiana de 332 infectados y 1668 personas sanas (población general). Inicialmente nos enfocamos en seis SNP que se sabe que están asociados con los niveles de proteína MBL (Tabla [1](#)) [23](#)·[24](#)·[25](#)·[26](#). Observamos una diferencia significativa solo en la frecuencia del alelo [rs5030737](#) -A entre individuos infectados y sanos (7,7 % y 6,0 %, respectivamente; razón de probabilidad (OR) = 1,43, intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %) = 1,00–2,05,  $P = 0,049$ ; Tabla [1](#)), que, sin embargo, no pasó la corrección de prueba múltiple. También verificamos la distribución de individuos infectados y sanos que portan estos SNP funcionales en condiciones bialélicas centrándonos específicamente en las tres variantes sin sentido y en el

promotor SNP conocido por conferir el efecto más fuerte en la expresión de *MBL2* ([rs7096206](#)). De acuerdo con los ensayos funcionales in vitro, se observó un efecto predisponente significativo en aquellos individuos que portaban dos alelos disruptivos entre [rs5030737](#) , [rs1800450](#) y [rs1800451](#) (OR = 2,09, IC del 95 % = 1,18–3,71,  $P = 0,011$ ; Tabla complementaria [1](#) ).

### **Tabla 1 Resultados del análisis de asociación: análisis de asociación de SNP candidato**

[mesa de tamaño completo](#)

Cuando comparamos las frecuencias de haplotipos determinados por los seis SNP, encontramos que la frecuencia de haplotipos CCGGCC disminuyó significativamente en personas con COVID-19 grave (26,7 % en personas infectadas y 30,4 % en personas sanas). Este haplotipo muestra un efecto protector (OR = 0,78, IC del 95 % = 0,65–0,95,  $P = 0,025$ ; Tabla complementaria [2](#) ), consistente con la falta del alelo [rs5030737](#) -A, que solo está presente en el haplotipo CCAGCC (OR = 1,38, IC del 95 % = 1,00–1,90,  $P = 0,078$ ; Tabla complementaria [2](#) ).

Aunque en el límite, estos primeros resultados de asociación nos alentaron a investigar sistemáticamente la región genómica de 1 megabase (Mb) de largo que abarca el gen *MBL2* . Con este objetivo, realizamos análisis de asociación basados en haplotipos y SNP únicos utilizando datos genotipados/imputados en 3425 polimorfismos. El análisis de asociación de SNP único reveló tres señales sugestivas ([rs150342746](#) , OR = 3,47, IC del 95 % = 1,81–6,68,  $P = 1,86 \times 10^{-4}$  ; [rs10824845](#) , OR = 1,76, IC del 95 % = 1,30–2,39,  $P = 2,91 \times 10^{-4}$  ; [rs11816263](#) , OR = 1,42, IC del 95 % = 1,17–1,73,  $P = 3,47 \times 10^{-4}$  , tabla [2](#) y fig. [6a,b](#) ), mientras que el análisis basado en haplotipos reveló siete haplotipos de diferentes longitudes, de 2 a 24 SNP, fuertemente asociados con COVID-19 grave (todos pasaron la corrección para múltiples pruebas; Fig. [6](#) y Tabla complementaria [3](#) ). Entre ellos, el compuesto por los

polimorfismos [rs10824844](#) – [rs10824845](#) incorpora uno de los dos principales marcadores evidenciados por el análisis de asociación de SNP único y está presente en el 12,2 % de los individuos infectados y en el 6,9 % de los individuos sanos (haplotipo TA, OR = 1,88, 95 % IC = 1,44–2,45,  $P = 1,04 \times 10^{-5}$ , Tabla complementaria [3](#)). Por lo tanto, realizamos un metanálisis basado en el [rs10824845](#) polimorfismo al incluir el estudio Geisinger Health System (GHS) de personas con COVID-19; esto dio como resultado un OR combinado = 1,32, IC del 95 % = 1,15–1,52,  $P = 9,12 \times 10^{-5}$  (Tabla complementaria [4](#)). En particular, el polimorfismo [rs10824845](#) apunta a una región reguladora caracterizada por la presencia de un potenciador (GH10J052964), descrito como un modulador distante de la expresión del gen *MBL2*. Este elemento regulador es activo en células HepG2 (hepatocitos) y macrófagos M0 (de sangre venosa) y M1 (de cordón y sangre venosa) (datos de la base de datos GeneHancer [27](#), disponible a través de <http://www.genecards.org/>).

## Tabla 2 Análisis de asociación de todo el locus

[mesa de tamaño completo](#)

**Fig. 6: El locus *MBL2* : estructura y principales señales de asociación con COVID-19 grave.**

**a** , Se muestra una captura de pantalla del navegador del genoma de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/> ; versión de diciembre de 2013, GRCh38/hg38) que destaca específicamente la región de 1 Mb que rodea el gen *MBL2* . Se informa, en orden, de las siguientes pistas: (1) la regla con la escala en el nivel genómico; (2) numeración de nucleótidos del cromosoma 10 (chr10); (3) la pista UCSC RefSeq; (4) variantes de

riesgo de COVID-19 de nuestro estudio (las piruletas muestran solo señales en  $P < 3 \times 10^{-3}$ ); (5) Haplotipos de riesgo de COVID-19, marcados por el SNP de etiquetado, de nuestro estudio (las piruletas muestran todos los haplotipos informados en las Tablas complementarias [1](#) y [2](#)); (6) variantes de riesgo de COVID-19 del análisis C2 del estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) de la Iniciativa de Genética del Huésped (HGI) de COVID-19 (17 965 personas infectadas, 33 estudios, lanzamiento 4, octubre de 2020); (7) datos ENCODE ( <https://www.encodeproject.org/> ) para las marcas de modificación de histonas H3K27ac, H3K4me1 y H3K4me3, todas derivadas de siete líneas celulares, y (8) la pista de elementos reguladores de GeneHancer; kb, kilobases. **b** , gráfico de Manhattan del análisis de asociación de SNP único. La línea horizontal representa el nivel de significancia sugerido  $P = 5 \times 10^{-5}$  . Los SNP que muestran las señales de valor  $P$  más bajas se indican con una flecha; [rs150342746](#) :  $P = 1,86 \times 10^{-4}$  , OR = 3,474, IC 95% = 1,808–6,676; [rs10824845](#) :  $P = 2,91 \times 10^{-4}$  , OR = 1,762, IC del 95 % = 1,297–2,393; [rs11816263](#) :  $P = 3,47 \times 10^{-4}$  , OR = 1,422, IC del 95 % = 1,173–1,725. Se utilizó un análisis de regresión logística. El umbral de Bonferroni para la significación corresponde a  $P < 1,5 \times 10^{-5}$  . **c** , concentraciones plasmáticas de MBL en individuos con COVID-19 que portan el alelo de tipo salvaje (A/A) para los [SNP](#) [rs1800451](#) , [rs1800450](#) y [rs5030737](#) en comparación con individuos que portan al menos una copia de cualquier alelo alternativo (0). Los datos se presentan como media  $\pm$  sem;  $n = 17$  A/0- o 0/0- y  $n = 23$  individuos portadores de A/A. El valor de  $p$  se analizó mediante la prueba  $t$  de dos colas . **d** , concentraciones plasmáticas de MBL en personas con COVID-19 estratificadas en función de los genotipos de [rs10824845](#) (tipo salvaje (wt) o heterocigoto (het) en nuestra cohorte) y la presencia de alelos A o 0, como se describe para **c** . Se utilizó la transformación de Box-Cox para normalizar los datos. Los datos representan la media  $\pm$  sem;  $n = 10$  0/ht,  $n = 7$  0/wt,  $n = 13$  A/ht y  $n = 10$  A/wt individuos. El valor de  $p$  se analizó mediante ANOVA.

[Datos fuente](#)

[imagen a tamaño completo](#)

También consultamos la base de datos de Regeneron [28](#) para analizar el papel de las variantes genéticas raras en el gen *MBL2* en la predisposición a la COVID-19 grave. Representamos los análisis de carga tanto en singletons como en variantes dañinas raras con MAF <1% (Tabla complementaria [5](#)). El metanálisis se centró en la población europea y evidenció la contribución significativa de las variantes singleton. Esto se observó cuando solo se consideraron las variantes de pérdida de función (análisis M1, OR = 32,05, IC del 95 % = 2,27–452,7,  $P = 0,010$ ; Tabla complementaria [5](#)) y cuando se predijeron tanto la pérdida de función como las variantes sin sentido. como dañinos por cinco algoritmos, fueron analizados (análisis M3, OR = 23.6, 95% CI = 3.44–162.09,  $P = 0,0013$ ; Tabla complementaria [5](#)).

Además, la misma base de datos informa una asociación significativa para el polimorfismo [rs35668665](#) tanto con la susceptibilidad a COVID-19 (OR = 4,11, cohorte GHS) como con la gravedad de los síntomas (OR = 7,91, cohorte del Biobanco del Reino Unido). Curiosamente, esta variante se mapea en correspondencia con el último nucleótido del exón 1 de *MBL2*, lo que posiblemente interfiere con el proceso de empalme.

Finalmente, medimos las concentraciones plasmáticas de MBL al ingreso hospitalario en 40 personas de la cohorte del Centro Clínico y de Investigación Humanitas y las correlacionamos con las variantes genéticas de *MBL2*. Primero nos enfocamos en las tres variantes sin sentido (SNP funcionales [rs5030737](#), [rs1800450](#) y [rs1800451](#)) y agrupamos a los individuos que portan al menos un alelo alternativo (alelo 0) en comparación con los que portan el alelo de tipo salvaje. Observamos una concentración plasmática de MBL significativamente más baja ( $P = 6,2 \times 10^{-8}$ ) en individuos que portan al menos un alelo alternativo (alelo 0) en comparación con los que portan el alelo de tipo salvaje (Fig. [6c](#)). Luego analizamos el impacto de [rs10824845](#) SNP estratificando los mismos individuos según su genotipo. Observamos una reducción de la concentración de MBL en individuos heterocigotos, aunque no significativa (disminución de 1,2 veces en heterocigotos;  $P = 0,11$ ). Sin embargo, al considerar la contribución de los alelos A/0, surgió una clara modulación dependiente del genotipo de las concentraciones de MBL ( $P = 1,1 \times 10^{-}$

<sup>6</sup>; Fig. [6d](#) ). En conjunto, estos análisis indican que las variantes genéticas de *MBL2* están asociadas con la gravedad de la COVID-19 y el impacto en la abundancia de proteínas de este 'ante-anticuerpo'.

## Discusión

---

Entre los 12 PRM en fase fluida probados en este estudio, solo PTX3 y MBL se unieron a los componentes del virus SARS-CoV-2. PTX3 reconoció la proteína de la nucleocápsida viral y no tuvo actividad antiviral. PTX3 se expresó en niveles altos por las células mieloides en la sangre y los pulmones, y sus concentraciones plasmáticas tienen una importancia pronóstica fuerte e independiente para la muerte en personas con COVID-19 (refs. [16](#)·[29](#) ). Queda por dilucidar si PTX3 juega un papel en la activación del complemento mediada por nucleocápside y en la producción de citocinas [30](#)·[31](#)·[32](#) .

MBL reconoció la proteína de pico del SARS-CoV-2, incluida la de cuatro VoC, y tuvo actividad antiviral in vitro contra todos ellos, incluida la variante B.1.617.2 (Delta), que actualmente es una gran preocupación en todo el mundo. Se ha demostrado previamente que MBL se une a la proteína de punta del SARS-CoV [33](#) . La interacción de MBL con la proteína espiga del SARS-CoV-2 requería una conformación trimérica de la proteína viral, no implicaba el reconocimiento directo de la RBD y dependía de los glicanos, como se esperaba. El análisis de glicosilación específico del sitio de la proteína espiga del SARS-CoV-2 reveló la presencia de varios glicanos de tipo oligomanosa en la proteína [18](#) .

El modelo molecular informado aquí sugiere que el trímero de MBL interactúa con los glicanos unidos a los residuos N603, N801 y N1074 en la misma cadena o N603, N709 y N1074 con N709 en una cadena diferente. En ambos casos, el sitio de unión a MBL hipotético se extiende por las regiones S1 y S2 de la proteína espiga del SARS-CoV-2, lo que sugiere un posible mecanismo de neutralización. La unión de MBL podría prevenir el desprendimiento de la región S1 y la liberación del péptido de fusión en la posición 815, inhibiendo así la entrada del virus en las células huésped. Sin embargo, los mecanismos responsables de la actividad antiviral de MBL aún no se han definido

completamente. Es de destacar que se ha informado que las lectinas de tipo C actúan como receptores de entrada (o co-receptores) [34](#)·[35](#)·[36](#), y es probable que MBL compita en este nivel.

En aparente contraste con nuestros resultados, recientemente se demostró que ficolin-2 y colectina-11 interactúan con proteínas de pico y nucleocápside, MBL con proteína de nucleocápside y SP-D con proteína de pico [37](#)·[38](#). Los enfoques experimentales utilizados en estos estudios pueden explicar la discrepancia con nuestros resultados; Mientras que en nuestro estudio se utilizaron pentraxinas recombinantes, C1q, MBL, ficolinas, proteínas tensioactivas y colectinas disponibles comercialmente y de producción propia, otros [37](#) utilizaron el suero como fuente de PRM, lo que puede dar lugar a una interacción indirecta de MBL, ficolina -2 o colectina-11 con proteínas virales mediadas por un componente sérico. Por ejemplo, se demostró que MASP-2 interactúa con la proteína de la nucleocápside [37](#), lo que confirma un estudio anterior [30](#). Las MASP normalmente están presentes en el plasma complejadas con moléculas de la vía de la lectina, lo que explica las interacciones de la MBL con la proteína de la nucleocápside, lo que no se observó en nuestro estudio. Con respecto a SP-D, Hsieh et al. observaron una interacción entre un fragmento recombinante de SP-D y la proteína de punta, mientras que la molécula recombinante de longitud completa mostró una afinidad muy baja por la proteína de punta [38](#). Para fortalecer nuestros resultados, repetimos los experimentos de unión usando cuatro preparaciones diferentes de ficolina-2 recombinante, dos de SP-D y dos de colectina-11 (como una sola molécula o como heterocomplejos de colectina-10/colectina-11) [39](#), y no observamos interacción con proteínas virales. Los estudios de Ali et al. [37](#) y Hsieh et al. [38](#) tienen el mérito de subrayar la implicación de la vía de la lectina en la activación del complemento dependiente del SARS-CoV-2. Aquí, proporcionamos una imagen rigurosa, sólida, confiable y completa del reconocimiento de los componentes del SARS-CoV-2 por 'ante-anticuerpos'.

Curiosamente, el análisis in silico presentado aquí indica que las mutaciones en las variantes reportadas hasta ahora, incluido Omicron, no afectan los sitios de glicosilación que contienen glucanos de tipo oligomanosa potencialmente reconocidos por MBL. Además, los

experimentos de unión e infección muestran que la actividad antiviral de MBL no se ve afectada por estas mutaciones. Este hallazgo indica que los sitios de glicosilación generalmente no se ven afectados por la presión selectiva, lo que sugiere que son esenciales para la infectividad del SARS-CoV-2. Recientemente se ha demostrado que los mecanismos de escape in vitro del SARS-CoV-2 del plasma convaleciente de COVID-19 altamente neutralizante incluyen la inserción de un nuevo sequon de glicano en el dominio N-terminal de la proteína de pico, lo que conduce a una resistencia completa a neutralización [40](#). Este resultado enfatiza aún más la relevancia de los restos glucosídicos de punta a los que se dirige MBL en la infectividad del SARS-CoV-2.

Se encontró que la MBL interactúa con la proteína espiga y tiene actividad antiviral con una  $CE_{50}$  de aproximadamente  $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$  (0,27 nM) y una afinidad de 34 nM. Estas concentraciones están dentro del rango de las que se encuentran en la sangre de individuos sanos (hasta  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), que aumentan de dos a tres veces durante la respuesta de fase aguda. Las concentraciones plasmáticas de MBL en individuos sanos son extremadamente variables, en parte dependiendo de la variación genética en el gen *MBL2* [21](#). La producción defectuosa de MBL se ha asociado con un mayor riesgo de infecciones, en particular en niños inmunodeficientes primarios o secundarios [41](#). En el SARS, se han informado resultados contradictorios con respecto a la relevancia de *Variantes genéticas MBL2* en esta condición [22](#)·[42](#)·[43](#). En COVID-19, un polimorfismo *MBL2* se ha asociado con el desarrollo y la gravedad de la infección [44](#). Investigamos el posible papel de las variantes genéticas de *MBL2* en la determinación de la susceptibilidad a la COVID-19 grave con insuficiencia respiratoria. Sorprendentemente, y en contraste con un estudio anterior [44](#), encontramos solo una correlación limítrofe entre un haplotipo de los seis SNP asociados con los niveles de MBL y la frecuencia de casos graves de COVID-19. Sin embargo, encontramos un efecto predisponente significativo en individuos portadores de *MBL2* variantes funcionales bialélicas y un total de siete haplotipos significativamente asociados, distribuidos a lo largo de la región genómica de *MBL2*, a menudo cartografiados en correspondencia con elementos reguladores (como potenciadores, regiones promotoras y marcas de histonas). Nuestros datos de

asociación se ven reforzados por los resultados del metanálisis obtenidos al integrar las estadísticas resumidas de una cohorte europea de >113 000 individuos y por el hecho de que una de nuestras segundas mejores asociaciones ( [rs10824845](#) ) mapea en la proximidad de un grupo de señales sugestivas identificadas por el COVID-19 HGI ( <https://www.covid19hg.org/> ), que incluye datos de hasta 33 estudios diferentes a nivel mundial. Además, la base de datos del Regeneron Genetic Center [28](#) informa asociaciones significativas en análisis de variantes raras y ultra raras. Finalmente, el [polimorfismo rs5030737](#) (p.Arg52Cys) en *MBL2* se ha descrito en la base de datos PheWeb de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) del Biobanco del Reino Unido ( <https://pheweb.org/UKB-SAIGE/> ) como una señal principal para determinar ambos ' dependencia del respirador [Ventilador] u oxígeno suplementario' (código ICD Z99.1;  $P = 2.7 \times 10^{-4}$  ) y 'Insuficiencia respiratoria, paro cardíaco' (código ICD J96;  $P = 2.7 \times 10^{-3}$  ). Estas observaciones sugieren que las variaciones genéticas en *MBL2*, posiblemente implicado en la modulación de la expresión del gen en hepatocitos y, curiosamente, en macrófagos, podría desempeñar un papel en la determinación de la susceptibilidad a la COVID-19 grave con insuficiencia respiratoria. Por lo tanto, el análisis genético es consistente con la opinión de que el reconocimiento MBL del SARS-CoV-2 juega un papel importante en la patogénesis de COVID-19.

Después de la interacción con la proteína espiga, se encontró que la MBL activaba la ruta de la lectina del complemento, como se esperaba. Al complemento se le atribuye un papel importante en la hiperinflamación subyacente a la enfermedad grave y se considera una diana terapéutica relevante [45](#)·[46](#) . Por lo tanto, en cuanto a la inmunidad innata en general, incluida la vía IFN [47](#) , el reconocimiento del SARS-CoV-2 mediado por MBL puede actuar como un arma de doble filo. En fases tempranas de la enfermedad, la MBL puede servir como un mecanismo de resistencia antiviral al bloquear la entrada viral, mientras que en etapas avanzadas de la enfermedad, puede contribuir a la activación del complemento y la inflamación descontrolada.

La MBL se ha administrado de forma segura a personas con fibrosis quística e infecciones pulmonares crónicas en las que la deficiencia de

MBL contribuye a la patogénesis [48](#)·[49](#) . Por lo tanto, los resultados presentados aquí tienen implicaciones traslacionales tanto en términos de evaluación integral del riesgo genético como de desarrollo de enfoques terapéuticos locales o sistémicos.

## Métodos

---

### **Cohortes de participantes y aprobaciones éticas**

Se obtuvieron las aprobaciones de los comités de ética pertinentes (Humanitas Clinical and Research Center, número de referencia, 316/20; Facultad de Medicina de la Universidad de Milano-Bicocca, Hospital San Gerardo, número de referencia, 84/2020). Se eliminó el requisito de consentimiento informado.

Para los análisis de asociación genética, investigamos a 2000 individuos. Esta población incluyó a 332 personas con COVID-19 grave, definida como hospitalización con insuficiencia respiratoria y una prueba PCR de ARN viral SARS-CoV-2 confirmada a partir de hisopos nasofaríngeos. Los individuos fueron reclutados de unidades de cuidados intensivos y salas generales en dos hospitales en el área de Milán (Centro Clínico y de Investigación Humanitas, IRCCS, Rozzano, Italia (140 individuos); Hospital San Gerardo, Monza, Italia (192 individuos)). Además, se investigaron 1.668 individuos sanos de la población general italiana con estado desconocido de COVID-19.

MBL plasma concentrations were analyzed in a cohort of 40 individuals, including all males and non-pregnant females, 18 years of age or older and admitted to Humanitas Clinical and Research Center (Rozzano, Milan, Italy) between March and April 2020 with a laboratory-confirmed diagnosis of COVID-19.

### **Recombinant proteins and antibodies**

Las proteínas de SARS-CoV-2 recombinantes utilizadas se enumeran en la Tabla complementaria [6](#) . La PTX3 humana recombinante y sus dominios se produjeron internamente, como se describe en la ref. [50](#) . La SP-A humana recombinante era de Origene. MBL humana recombinante, colectina-12, ficolin-1, ficolin-2 y ficolin-3 eran de

Biotechne. Otras preparaciones recombinantes de ficolin-2 fueron de Abnova, Origene y SinoBiological. SP-D era de Biotechne y SinoBiological. La colectina-10 y la colectina-11 humana recombinante procedían de Abnova. Los heterocomplejos de colectina-11 o colectina-10/colectina-11 humana recombinante también se expresaron y purificaron, como se describe en la ref. [39](#). El C1q humano purificado era de Complement Technology, el CRP purificado era de Millipore y el SAP purificado era de Abcam. El anti-PTX3 de conejo (1:5000) se produjo internamente [50](#) y el anti-MBL de conejo (1:5000) fue de Abcam. El anti-C1q policlonal (1:5.000) era de Dako. Anti-CRP (1:5.000) y anti-SAP (1:5.000) eran de Merck. Coleccionina-11 antihumana IgG monoclonal de ratón (clon Hyb-15, 1:2000) y ficolina-2 antihumana IgG monoclonal de ratón (clon FCN219) se produjeron internamente [39](#)·[51](#) . Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo de burro ligada a HRP (GE Healthcare, 1:5000) e IgG anti-ratón de oveja ligada a HRP (GE Healthcare, 1:5000).

### **Unión de PRM humorales a proteínas SARS-CoV-2**

Las proteínas recombinantes His tag SARS-CoV-2 se inmovilizaron (concentraciones que oscilaron entre 6,25 y 50 pmol ml<sup>-1</sup>) en placas recubiertas de níquel de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) durante 1 h a 20 °C. A continuación, las placas se bloquearon durante 2 h a 37 °C con 200 µl de albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y Tween 20 al 0,1 % (TBST -Ca<sup>2+</sup>). Las placas se lavaron tres veces con TBST-Ca<sup>2+</sup> y se incubaron durante 1 h a 37 °C con 100 µl de PTX3 (4 µg ml<sup>-1</sup> (12 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>), MBL (1–2 µg ml<sup>-1</sup> (3,4–6,7 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>), C1q (4 µg ml<sup>-1</sup> (10 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>), PCR (3 µg ml<sup>-1</sup> (25 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>) y SAP (4 µg ml<sup>-1</sup> (32 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>), ficolin-2 (1 µg ml<sup>-1</sup> (2,5 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>), colectina-11 (1 µg ml<sup>-1</sup> (6,7 nM) en TBST-Ca<sup>2+</sup>). Después de los lavados, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C con anticuerpos primarios específicos, seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con HRP diluidos en TBST-Ca<sup>2+</sup>buffer. Después del revelado con el sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB; Thermo Fisher Scientific), la unión se detectó mediante absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas Spectrostar Nano (BMG Labtech). Los valores de los pocillos en blanco se restaron de los registrados en los pocillos de muestra.

Para los experimentos de unión de la proteína espiga del SARS-CoV-2 a los heterocomplejos de colectina-10/colectina-11, la proteína espiga se inmovilizó en una placa Nunc Maxisorp de 96 pocillos. A continuación, se incubaron MBL ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; 3,4 nM) o heterocomplejos de colectina-10/colectina-11 ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; 3,4 nM) en TBST- $\text{Ca}^{2+}$  durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , seguido de incubación con anticuerpos primarios específicos [39](#), anticuerpos secundarios conjugados con HRP y desarrollo de TMB.

En otros experimentos,  $100 \mu\text{l}$  de  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  de rhMBL (6,7 nM), colectina-12 (6,7 nM), ficolin-1 (5 nM), ficolin-2 (5 nM) y ficolin-3 (3 nM) y SP-A (3 nM) o SP-D (3,4 nM) en PBS se inmovilizaron en Nunc Maxisorp Immunoplates de 96 pocillos (Costar) durante la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Las placas se bloquearon con  $200 \mu\text{l}$  de BSA-TBST- $\text{Ca}^{2+}$  al 2 % durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ . Se añadió proteína de pico de SARS-CoV-2 biotinilada durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , seguida de la adición de estreptavidina conjugada con HRP (1:10 000, Biospa) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  y desarrollo de TMB.

Para los experimentos basados en la competencia, se capturó la proteína de punta de SARS-CoV-2 biotinilada en placas recubiertas con neutravidina de 96 pocillos durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Las placas se incubaron durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con  $100 \mu\text{l}$  de rhMBL ( $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; 0,83 nM) sola o en presencia de D -manosa, N -acetil-glucosamina o D -glucosa (Sigma-Aldrich). La MBL unida se detectó mediante incubación con anti-MBL de conejo, seguida de desarrollo de TMB y anticuerpo secundario conjugado con HRP.

Para los estudios de interacción de nucleocápside PTX3/SARS-CoV-2, PTX3 y sus dominios recombinantes se inmovilizaron en una placa Nunc Maxisorp de 96 pocillos. Luego se agregó la proteína de la nucleocápsida del SARS-CoV-2 biotinilada durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , seguida de la adición de estreptavidina conjugada con HRP.

### **estudios SPR**

Los análisis SPR se realizaron a  $25^\circ\text{C}$  en un instrumento Biacore 8K (GE Healthcare). Se inmovilizó MBL en la superficie de un chip sensor CM5 a través del acoplamiento de amina estándar. Brevemente, después de

la activación de la superficie con una mezcla de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida, se diluyó MBL a 50 nM en tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 4,5, y se inyectó sobre la superficie. (caudal de  $10 \mu\text{l min}^{-1}$ ). Los sitios activados libres se bloquearon haciendo fluir etanolamina 1 M, pH 8,5. Los niveles finales de inmovilización de MBL fueron de alrededor de 4500 RU (con  $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg mm}^{-2}$ ). Se preparó una segunda superficie sin ningún ligando y se usó como referencia. RBD recombinante y proteína de punta trimérica se produjeron en células Expi293 y se purificaron como se informa en la ref. [52](#). Se inyectaron concentraciones crecientes de SARS-CoV-2 RBD o proteína de pico (2,5, 7,4, 22, 67, 200 y 600 nM) utilizando una configuración de cinética de ciclo único (velocidad de flujo de  $30 \mu\text{l min}^{-1}$ ); se siguió la disociación durante 10 minutos. El tampón de ejecución fue solución salina tamponada con Tris 10 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y Tween 20 al 0,005 %. La interacción también se analizó utilizando el tampón de ejecución sin  $\text{CaCl}_2$ . Las respuestas de los analitos se corrigieron para la unión no específica y las respuestas del tampón mediante el uso de canales de referencia. La cinética de unión se determinó ajustando las curvas experimentales con el modelo Langmuir 1:1 según procedimientos estándar; los análisis de datos se realizaron con Biacore Insight Evaluation Software v2.0.15.12933. En presencia de  $\text{CaCl}_2$ , la proteína espiga trimérica se unió a la MBL con una  $K_a$  (1/ms) de  $2,1 \times 10^4$ , una  $K_d$  (1/s) de  $7,3 \times 10^{-4}$  y una  $K_D$  de 34 nM.

### **Modelado computacional de la interacción del pico MBL-SARS-CoV-2**

El modelo del trímero MBL (UniProt [53](#) [P11226](#)) se creó a partir de la estructura cristalina de la proteína de unión a manosa humana [54](#) (Protein Data Bank (PDB): [1HUP](#)). [El extremo N de MBL se modeló como colágeno basándose en la estructura cristalina molde del modelo \[55\]\(#\) de triple hélice de colágeno \(PDB: \[1K6F\]\(#\)\)](#). El sitio de unión de las moléculas de manosa se determinó alineando la estructura de la MBL con la estructura cristalina de la proteína A [56](#) de manosa de rata (PDB: [1KX1](#)). Las distancias de referencia ( $\sim 40 \text{ \AA}$ ) entre las moléculas de manosa se calcularon en PYMOL.

Se determinaron los sitios de unión putativos de MBL identificando todos los triplete de sitios de N-glicosilación a una distancia entre 35

Å y 50 Å en la proteína de pico de SARS-CoV-2 en estado cerrado [57](#) . Las distancias se calcularon con el programa CASI [58](#) .

### **Producción de virus pseudotipados**

Las células 293T humanas se transfectaron con un vector lentiviral que expresaba GFP bajo el control de un promotor [59](#) *de fosfoglicerato quinasa humana ( PGK )* y un vector que expresaba pCMV que contenía la secuencia del pico del SARS-CoV-2 (número de acceso [MN908947](#) ) que se optimizó por codones para humanos. expresión y contenía una deleción en el extremo 3' destinada a eliminar 19 residuos de aminoácidos en el extremo C terminal. *Un pol de la mordaza del VIH* la construcción de empaquetamiento y un plásmido que codifica rev se cotransfectaron con fosfato de calcio para la producción de partículas virales infecciosas. Dieciséis horas después de la transfección, se reemplazó el medio y, 30 h después, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm de poro. Las partículas virales se sedimentaron por ultracentrifugación. Como control, las partículas de lentivirus se pseudotiparon con la glicoproteína VSV-g que permite una infección de alta eficiencia independientemente de la unión a ACE2.

### **Ensayo de unión a lentivirus pseudotipado**

Las inmunoplasmas Nunc Maxisorp (96 pocillos, Costar) se recubrieron con 100 µl de rhMBL (3 y 1 µg ml<sup>-1</sup> ; 10 y 3,4 nM en PBS). Después de la incubación durante la noche, las placas se bloquearon con BSA al 2 % en TBST-Ca<sup>2+</sup> durante 1 h a 37 °C, se lavaron y se incubaron durante 1 h con 100 µl de lentivirus pseudotipado con proteína de pico de SARS-CoV-2 o lentivirus pseudotipado con VSV. (de 0,1 a 1 µg ml<sup>-1</sup> en TBST- Ca<sup>2+</sup> ). Después del lavado, las partículas de virus pseudotipadas unidas se lisaron con Triton X-100 al 0,5 %, y la proteína del núcleo p24 del VIH se detectó mediante ELISA (PerkinElmer).

### **Ensayo de depósito de complemento**

Cien microlitros de proteína de pico de SARS-CoV-2 (ya sea trímero activo o trímero no covalente; 1 µg ml<sup>-1</sup> en PBS) se capturaron en placas de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Después del lavado, los pocillos se incubaron durante 1 h a 37 °C con suero humano normal al

10 % (Complementech), suero empobrecido en C1q al 10 % o suero empobrecido en C4 al 10 % reconstituido o no con  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  de C4 purificado (Calbiochem); Se utilizaron como controles negativos suero humano inactivado con calor al 10 % (30 min a  $56^\circ\text{C}$ ) y suero empobrecido en C3 al 10 %. Los sueros se diluyeron en solución salina tamponada con Tris 10 mM que contenía  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y Tween 20 al 0,05%, que también se usó como tampón de lavado. Para la inmunodepleción de MBL, se incubó suero humano normal al 10 % durante la noche con  $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$  conejo anti-MBL. Los complejos MBL-anticuerpo unidos se separaron mediante Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific), y el sobrenadante (denominado MBL-ID) se utilizó en el ensayo (concentración final del 10 %). La deposición de C5b-9 se analizó mediante incubación durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con anti-c5b-9 de conejo (Complementech) diluido 1:2000 en tampón de lavado [60](#), seguido de incubación con anticuerpos secundarios conjugados con HRP específicos y desarrollo de TMB.

### **Líneas celulares**

Las líneas celulares Vero y Vero E6 se obtuvieron del Istituto Zooprofilattico de Brescia, Italia, y ATCC, respectivamente, y se mantuvieron en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM; Lonza) con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Euroclone) y penicilina-estreptomicina (medio completo).

Se cultivaron células 293T de riñón embrionario humano que contenían el gen mutante del antígeno T grande SV40 (ATCC, CRL-3216) como se describe en la ref. [61](#).

La línea celular epitelial de pulmón humano Calu-3 se obtuvo de NovusPharma y se cultivó en EMEM suplementado con FBS al 20 % y penicilina-estreptomicina (medio completo).

### **HBEC**

El aislamiento, cultivo y diferenciación de HBEC primarios se realizaron como se informa en la ref. [62](#). En resumen, se obtuvieron células de bronquios humanos principales derivados de tres individuos sometidos a trasplante de pulmón (BE37, BE63 y BE177). Las células epiteliales se

separaron mediante el tratamiento durante la noche de los bronquios con proteasa XIV y se cultivaron en un medio sin suero (LHC9 mezclado con RPMI 1640; 1:1) que contenía suplementos [62](#) . La recolección de células epiteliales bronquiales fue aprobada por el Comité de Ética del Istituto Giannina Gaslini siguiendo las pautas del Ministerio de Salud italiano (número de registro ANTECER, 042-09/07/2018). Los participantes dieron su consentimiento informado para el estudio.

Para obtener epitelios diferenciados, las células se sembraron a alta densidad ( $5 \times 10^5$  células por snapwell) en membranas porosas de 12 mm de diámetro (insertos Snapwell, Corning, 3801). Después de 24 h, el medio sin suero se retiró de ambos lados y, solo en el lado basolateral, se reemplazó con medio Pneumacult ALI (StemCell Technologies), y la diferenciación de células (durante 3 semanas) se realizó bajo interfaz aire-líquido (ALI ) condiciones.

### **Ensayo de entrada con partículas de lentivirus con pseudotipado de pico de SARS-CoV-2**

Las células 293T se diseñaron para sobreexpresar el receptor de entrada del SARS-CoV-2 mediante la transducción de un vector lentiviral que expresa ACE2 (proporcionado por M. Pizzato, Universidad de Trento). El ensayo de entrada se optimizó en placas de 96 pocillos sembrando  $5 \times 10^4$  células 293T que sobreexpresan ACE2 por pocillo; 24 h más tarde, las células y el stock de lentivirus con pseudotipado de pico de SARS-CoV-2 (1: 500) se incubaron con diluciones en serie de PRM soluble durante 30 min. Se añadió a las células el lentivirus con pseudotipado de punta SARS-CoV-2 y, 48 h después, las células se separaron con accutase, se fijaron y se analizaron para determinar la expresión de GFP mediante citofluorimetría.

### **Aislados virales SARS-CoV-2**

El aislamiento viral de muestras clínicas y su uso con fines de investigación fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Hospital San Raffaele dentro del proyecto de biobancos COVID-19 'COVID-Biob' (34 /int/2020 19 de marzo de 2020; Identificador

ClinicalTrials.gov: [NCT04318366](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04318366) ). Cada individuo proporcionó su consentimiento informado.

Los siguientes aislamientos de SARS-CoV-2 se obtuvieron a partir de hisopos nasofaríngeos: (1) linaje B.1 con la mutación de la espiga D614G (ID de acceso de GISAID: EPI\_ISL\_413489) de un individuo levemente sintomático mediante la inoculación de células Vero E6 [63](#)·[64](#), (2) linaje sudafricano B.1.351 (Beta) (ID de acceso de GISAID: EPI\_ISL\_1599180) de un hombre italiano de 80 años, (3) linaje B.1.1.7 (Alpha) (ID de acceso de GISAID: EPI\_ISL\_1924880) de una mujer italiana de 58 años, (4) linaje P.1 (Gamma) (ID de acceso de GISAID: EPI\_ISL\_1925323) de una mujer italiana de 43 años y (5) B.1.617.2 (Delta) linaje (ID de acceso de GISAID: EPI\_ISL\_4198505) de un individuo masculino italiano de 50 años. Se generaron stocks virales secundarios por infección de células Vero E6. Las reservas se mantuvieron a -80 °C y se titularon mediante un ensayo de formación de placas.

### **Infecciones**

Se sembraron células Calu-3 en placas de 48 pocillos (Corning) a una concentración de  $5 \times 10^4$  células por pocillo en medio completo 24 h antes de la infección. Se incubaron diluciones en serie de diez veces de MBL (de 0,01 a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; 0,034–34 nM) durante 1 h con alícuotas de sobrenadante que contenía SARS-CoV-2 para obtener una MOI de 0,1 o 1 antes de la incubación con Calu- 3 células (virus + MBL). La incubación de virus con MBL también se combinó con la incubación de células diana. Brevemente, tanto el virus como las células Calu-3 se incubaron con diluciones en serie de diez veces de MBL (de 0,01 a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; 0,034–34 nM). Después de 1 h, se añadieron suspensiones de virus incubadas con diluciones en serie de MBL a células tratadas con MBL (virus + células + MBL). En ambos casos, 48 y 72 h después de la infección, los sobrenadantes de los cultivos celulares se recolectaron y almacenaron a -80 °C hasta la determinación de los títulos virales.

Cuarenta y ocho horas antes de la infección, la superficie apical de las HBEC se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de HBSS durante 1,5 horas a 37 °C y los cultivos se trasladaron a medio ALI fresco. Inmediatamente antes de la infección, las superficies apicales se lavaron dos veces para eliminar la

mucosidad acumulada con 500 µl de HBSS durante 30 min a 37 °C. Se añadió PTX3 o MBL a la superficie apical durante 1 hora antes de la adición de 100 µl de inóculo viral a una MOI de 1. Las HBEC se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Luego se eliminó el inóculo viral y la superficie apical de los cultivos se lavó tres veces con 500 µl de PBS. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 72 h después de la infección. El virus infeccioso producido por HBEC se recolectó lavando la superficie apical del cultivo con 100 µl de PBS cada 24 h hasta 72 h después de la infección. Los lavados apicales se almacenaron a -80 °C hasta el análisis y se titularon mediante ensayo de placa.

Todos los experimentos de infección se realizaron en un laboratorio BSL-3 (Laboratorio de Microbiología Médica y Virología, Universidad Vita-Salute San Raffaele).

Las medidas se tomaron de distintas muestras.

### **Ensayo de formación de placa**

El título del stock viral se midió mediante un ensayo de formación de placas en células Vero. Brevemente, las células Vero confluentes ( $1,5 \times 10^6$  células por pocillo) sembradas en placas de seis pocillos (Corning) se incubaron por duplicado con 1 ml de EMEM con FBS al 1 % que contenía diluciones en serie diez veces mayores de stock de SARS-CoV-2. Después de 1 h, se eliminó el inóculo viral y se superpuso metilcelulosa (Sigma; 1 ml en EMEM con FBS al 5 %) en cada pocillo. Después de 4 días, las células se tiñeron con cristal violeta al 1 % (Sigma) en metanol al 70 %. Las placas se contaron con un microscopio estereoscópico (SMZ-1500, Nikon Instruments) y el título del virus se calculó como UFP por mililitro.

Para determinar los títulos virales del sobrenadante recolectado de células Calu-3 y HBEC, se sembraron células Vero confluentes ( $2,5 \times 10^5$  células por pocillo) en placas de 24 pocillos (Corning) 24 h antes de la infección. A continuación, las células se incubaron con 300 µl de EMEM con FBS al 1 % que contenía sobrenadantes que contenían virus diluidos en serie (1:10). El ensayo de formación de placas se realizó como se describe anteriormente.

## **Cuantificación de quimioquinas**

La mitad del medio ALI (1 ml) se recogió de cada pocillo de la cámara inferior cada 24 h después de la infección y se reemplazó con medio ALI nuevo. El medio recolectado se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Antes de la cuantificación de quimioquinas, se trataron 250  $\mu\text{l}$  de medio con 27  $\mu\text{l}$  de Triton X-100 y se calentaron durante 30 min a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  para inactivar la infectividad del SARS-CoV-2.

Las quimioquinas (IL-8 y CXCL5) se cuantificaron mediante ELISA (kits Quantikine ELISA, DY208 y DY254, R&D Systems).

## **Microscopía de superresolución confocal y STED**

Después de la fijación con paraformaldehído al 4 %, los cultivos HBEC se incubaron durante 1 h con PBS y Triton X-100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich), suero de burro normal al 5 % (Sigma-Aldrich), BSA al 2 % y Tween al 0,05 % (tampón de bloqueo) . A continuación, las células se incubaron durante 2 h en tampón de bloqueo con los siguientes anticuerpos primarios: anti-citoqueratina 14 de ratón (Krt14; LL002;  $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; 33-168, ProSci-Incorporated), proteína policlonal anti-spike de conejo (944– 1218 aminoácidos;  $2\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; 28867-1-AP, Proteintech), anti-MBL de rata (8G6;  $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; HM1035, Hycult Biotech) y anti-MBL de rata (14D12;  $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; HM1038, Hycult Biotech). Después de lavarlas con PBS y Tween al 0,05 %, las células se incubaron durante 1 h con los siguientes anticuerpos secundarios de adsorción cruzada específicos de especies de Invitrogen-Thermo Fisher Scientific: burro anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 ( $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; A- 21206), burro anti-rata IgG Alexa Fluor 594 ( $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; A-21209) y burro anti-ratón IgG Alexa Fluor 647 ( $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  ; A-31571). Se usó DAPI (Invitrogen) para la tinción del núcleo. Las células se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich) y se analizaron con un sistema de microscopio confocal Leica SP8 STED3X equipado con una lente de inmersión en aceite Leica HC PL APO CS2  $\times 63/1.40\text{-NA}$ . Las imágenes confocales ( $1.024 \times 1.024$  píxeles) se adquirieron en xyzy modalidad de mosaico (grosor de corte de  $0,25\text{ }\mu\text{m}$ ) y a 1 unidad Airy de resolución lateral (abertura estenopeica de  $95,5\text{ }\mu\text{m}$ ) a una frecuencia de 600 Hz en modo bidireccional. Alexa Fluor 488 se excitó con un láser de argón de 488 nm y la emisión se recogió de 505 a 550 nm. Alexa Fluor 594 se excitó con un láser de luz blanca sintonizado de 594/604 nm y la

emisión se recolectó de 580 a 620 nm. Alexa Fluor 647 se excitó con un láser de luz blanca sintonizado de 640/648 nm y la emisión se recolectó de 670 a 750 nm. Se aplicó la adquisición secuencial de fotogramas para evitar la superposición de fluorescencia. Se aplicó una activación entre 0,4 y 7 ns para evitar la acumulación de reflexión y autofluorescencia. El análisis 3D STED se realizó utilizando la misma configuración de adquisición. Se usó un láser de agotamiento CW de 660 nm (30 % de potencia) para excitaciones de Alexa Fluor 488 (señal de pico) y Alexa Fluor 594 (señal MBL). Las imágenes STED se adquirieron con un objetivo blanco STED de aceite Leica HC PL APO × 100/1,40-NA a 572,3 unidades de miliabsorción. Se aplicaron CW-STED y CW-STED controlado a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594, respectivamente. Las imágenes confocales se procesaron, renderizaron en 3D y analizaron como tasa de colocalización entre la proteína de punta y MBL con el software Leica Application Suite X (LASX, versión 3.5.5.19976) y se presentaron como MIP. Las imágenes STED se desconvolucionaron con el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging BV, versión 19.10) y se presentaron como MIP. Se aplicaron CW-STED y CW-STED controlado a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594, respectivamente. Las imágenes confocales se procesaron, renderizaron en 3D y analizaron como tasa de colocalización entre la proteína de punta y MBL con el software Leica Application Suite X (LASX, versión 3.5.5.19976) y se presentaron como MIP. Las imágenes STED se desconvolucionaron con el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging BV, versión 19.10) y se presentaron como MIP. Se aplicaron CW-STED y CW-STED controlado a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594, respectivamente. Las imágenes confocales se procesaron, renderizaron en 3D y analizaron como tasa de colocalización entre la proteína de punta y MBL con el software Leica Application Suite X (LASX, versión 3.5.5.19976) y se presentaron como MIP. Las imágenes STED se desconvolucionaron con el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging BV, versión 19.10) y se presentaron como MIP.

### **Análisis e imputación genética**

Los detalles sobre la extracción de ADN, el genotipado de matrices y los controles de calidad se informan en otros lugares [12·65](#) . La cobertura genética se incrementó al realizar la imputación de SNP en la

construcción del genoma GRCh38 utilizando el servidor de imputación de Michigan (<https://imputation.biodatacatalyst.nhlbi.nih.gov/index.html#!>), y los haplotipos fueron generados por Trans-Omics para Programa de medicina de precisión (TOPMed) (congelación 5) [66](#) para personas infectadas y sanas. Usamos el panel de población 'TODOS' y filtramos por una imputación de  $R^2 > 0.1$ . A continuación, solo conservamos los SNP con  $R^2 \geq 0,6$  y  $MAF \geq 1\%$ . Luego verificamos a los individuos infectados y sanos para resolver las relaciones dentro de Italia y para probar la posible existencia de estratificación de la población dentro y entre lotes mediante la realización de un análisis de componentes principales (PCA) utilizando un subconjunto de SNP podado en desequilibrio de ligamiento (LD) a través del cromosoma. 10 y el paquete Plink v.1.9 [67](#). El conjunto final de variantes analizadas estaba compuesto por 3425 SNP distribuidos en la región *MBL2* (gen  $\pm$  500 kb).

### **concentración plasmática de MBL**

Se recogieron muestras de sangre venosa durante los primeros días tras el ingreso hospitalario (mediana (rango intercuartílico): 3 (1-6) d), y el plasma EDTA se almacenó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Las concentraciones plasmáticas de MBL se midieron mediante ELISA (Hycult Biotech, HK323-02, límite de detección de  $0,41\text{ ng ml}^{-1}$ ) por personal que desconocía las características de los participantes. Las medidas se tomaron de distintas muestras analizadas por duplicado. En cada sesión analítica se utilizó como control interno una muestra de un pool de plasma de donantes sanos.

### **análisis estadístico**

Se utilizó el software Prism GraphPad v. 8.0 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) para los análisis estadísticos. Las comparaciones entre los grupos se realizaron utilizando ANOVA de una o dos vías y una corrección de Bonferroni. El ajuste no lineal de los datos transformados se determinó utilizando el logaritmo (agonista) frente a la respuesta (tres o cuatro parámetros). Se aplicó la prueba ROUT o la prueba de Rosner para identificar valores atípicos. No se identificaron valores atípicos y todos los datos se incluyeron en los análisis estadísticos utilizados para las

Figs. [1](#) – [5](#) y datos ampliados Figs. [1](#) , [2](#) y [4](#) . Para la Fig. [6c, d](#) , se excluyeron tres valores atípicos según la prueba de Rosner.

Para los estudios genéticos, se realizaron pruebas de asociación de dosis y alelos de casos y controles utilizando el marco de regresión logística PLINK v.1.9 para datos de dosis. Edad, sexo, edad × edad, sexo × edad y los primeros diez componentes principales del PCA se introdujeron en el modelo como covariables. Los análisis se realizaron siempre con referencia al alelo minoritario. Todos los valores de *P* se *presentan como no corregidos y van acompañados de OR y valores de IC del 95 %*; sin embargo, en las tablas/figuras relevantes, los umbrales de importancia corregidos por Bonferroni se indican en la nota al pie/leyenda.

En el análisis de genotipado evaluamos la distribución de individuos infectados y sanos portadores de SNP funcionales ([rs5030737](#) , [rs1800450](#) , [rs1800451](#) y [rs7096206](#) ) <sup>23·24·25·26</sup> en condiciones bialélicas. [RS5030737](#) , [RS1800450](#) y [RS1800451](#) están ubicados en la región codificante del gen, y se sabe que dan como resultado un deterioro grave del ensamblaje de la estructura trimérica de MBL. Los alelos alternativos de estos SNP se denominan clásicamente 'D', 'B' y 'C', pero normalmente la presencia de cualquiera de ellos se indica como 'alelo 0', mientras que el alelo de tipo salvaje se indica como 'alelo A '. [Rs7096206](#) se encuentra en la región promotora y se ha asociado con la modulación de las concentraciones de MBL; el alelo de tipo salvaje se indica clásicamente como 'Y', mientras que la alternativa se llama 'X'. El análisis estadístico en condiciones bialélicas se realizó utilizando un modelo glm binomial en R con las siguientes covariables: edad, sexo, edad × edad, sexo × edad y diez componentes principales como ya se calculó para análisis previos.

Para probar la correlación entre las variantes genéticas y las concentraciones de MBL, los individuos se estratificaron según los genotipos de [rs10824845](#) y/o la presencia de al menos un alelo 0 en uno de los [genotipos rs5030737](#) , [rs1800450](#) o [rs1800451](#) . Los valores atípicos se identificaron mediante la prueba de Rosner y los valores plasmáticos de MBL > 1,5 × rango intercuartílico se excluyeron del análisis estadístico. Se utilizó la transformación de Box-Cox para

normalizar los datos antes de aplicar más análisis estadísticos. Se utilizaron pruebas ANOVA y *t* para evaluar las diferencias en las concentraciones transformadas por MBL en diferentes grupos de estudio.

El análisis de haplotipos se realizó de dos formas, entre ellas (1) seleccionando SNP relevantes y utilizando la opción hap-logística implementada en PLINK v.1.07 (ref. [68](#)) y (2) un enfoque no supervisado por medio del software Beagle v3.3 y 5.1 (<http://faculty.washington.edu/browning/beagle/b3.html>), que utiliza el método descrito por Browning y Browning [69](#) para inferir la fase de haplotipo. En este caso, usamos la configuración predeterminada de 1000 permutaciones para calcular los valores de *P* corregidos.

En el metanálisis, aprovechamos los datos de asociación depositados en la base de datos del Regeneron Genetic Center (<https://rgc-covid19.regeneron.com/home>) para el estudio GHS (datos disponibles para 869 personas infectadas y 112 862 personas sanas de ascendencia europea). Los OR y los IC agrupados se calcularon utilizando el modelo de Mantel-Haenszel [70](#).

Para probar el papel de las variantes raras en la susceptibilidad a un resultado grave, analizamos datos de Regeneron, centrándonos en el análisis de carga genética en cohortes europeas considerando el fenotipo 'COVID-19-positivo hospitalizado versus COVID-19-negativo o COVID-19 Estado desconocido'. En la base de datos, las variantes se agrupan en cuatro categorías según su efecto previsto a nivel de proteína y su frecuencia en la población. Las variantes missense se clasifican según la predicción realizada por cinco algoritmos (SIFT, PolyPhen2 HDIV, PolyPhen2 HVAR, LRT y Mutation Taster) [28](#). Nos enfocamos en el análisis de las clases más severas de variantes: M1 (que comprende solo variantes de pérdida de función) y M3 (que comprende pérdida de función y todas las variantes sin sentido predichas como dañinas por los cinco algoritmos antes mencionados) y en raras ( $MAF < 1\%$ ), así como variantes ultra raras (singleton).

No se utilizaron métodos estadísticos para determinar los tamaños de muestra, pero nuestros tamaños de muestra son similares a los

informados en publicaciones anteriores [12](#)·[64](#)·[71](#) . Para los experimentos con células, no fue necesaria la aleatorización, porque todos los grupos se derivaron del mismo cultivo celular.

### Resumen de informes

Más información sobre el diseño de la investigación está disponible en el [Resumen de informes de investigación de Nature](#) vinculado a este artículo.

### Disponibilidad de datos

---

Todos los datos que respaldan los hallazgos de este estudio están presentes en el texto principal y/o en la [Información complementaria](#) . Los datos adicionales están disponibles de los autores correspondientes. Para estudios genéticos, el conjunto de datos de individuos infectados está disponible públicamente en el Instituto Europeo de Bioinformática ( [www.ebi.ac.uk/gwas](http://www.ebi.ac.uk/gwas) ) con los números de acceso [GCST90000255](#) y [GCST90000256](#) (ref. [12](#) ), mientras que el conjunto de datos de individuos sanos está depositado en el Base de datos de genotipos y fenotipos ( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/> ) con el código de acceso [phs000294.v1.p1](#) [65](#) . [Los datos de origen](#) se proporcionan con este documento.

### Referencias

---

1. 1.

Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Scholar](#)

---

2. 2.

---

Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Scholar](#)

---

3. 3.

---

Hartenian, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.* **295**, 12910–12934 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Scholar](#)

---

4. 4.

---

Wang, J., Jiang, M., Chen, X. & Montaner, L. J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 17–41 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Scholar](#)

---

5. 5.

---

Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Una visión integrada de la inmunidad innata humoral: las pentraxinas como paradigma. *año Rev. Inmunol.* **28**, 157–183 (2010).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

6. 6.

---

Holmskov, U., Thiel, S. & Jensenius, JC Colecciones y ficolinas: lectinas humorales de la defensa inmune innata. *año Rev. Inmunol.* **21**, 547–578 (2003).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

7. 7.

---

Garlanda, C., Bottazzi, B., Magrini, E., Inforzato, A. & Mantovani, A. PTX3, una molécula de reconocimiento de patrones humorales, en inmunidad innata, reparación de tejidos y cáncer. *Fisiol. Rev.* **98** , 623–639 (2018).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

8. 8.

---

Lectura, PC et al. Actividad antiviral de la pentraxina PTX3 de cadena larga contra los virus de la influenza. *J. Immunol.* **180** , 3391–3398 (2008).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

9. 9.

---

Bozza, S. et al. Pentraxin 3 protege de la infección y reactivación de MCMV a través de vías de detección de TLR que conducen a la activación de IRF3. *Sangre* **108** , 3387–3396 (2006).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

10.10

---

Han, B. et al. Efectos protectores de la pentraxina larga PTX3 sobre la lesión pulmonar en un modelo de síndrome respiratorio agudo severo en ratones. *Laboratorio. Invertir.* **92** , 1285–1296 (2012).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

11.11

---

Merad, M. & Martin, JC Inflamación patológica en pacientes con COVID-19: un papel clave para monocitos y macrófagos. *Nat. Rev. Immunol.* **20** , 355–362 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

12.12

---

Severo Covid-19 GWAS Group et al. Estudio de asociación del genoma de Covid-19 grave con insuficiencia respiratoria. *N. ingl. J.Med.* **383** , 1522–1534 (2020).

[Google Académico](#)

---

13.13

---

Zhang, Q. et al. Errores congénitos de la inmunidad de IFN tipo I en pacientes con COVID-19 potencialmente mortal. *Ciencia* **370** , eabd4570 (2020).

---

14.14

---

Pairo-Castineira, E. et al. Mecanismos genéticos de la enfermedad crítica en COVID-19. *Naturaleza* **591** , 92–98 (2021).

[PubMed](#) [Google Académico](#)

---

15.15.

---

Fajgenbaum, DC y June, CH Tormenta de citocinas. *N. ingl. J.Med.* **383** , 2255–2273 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

16.dieciséis.

---

Brunetta, E. et al. Expresión de macrófagos e importancia pronóstica de la pentraxina larga PTX3 en COVID-19. *Nat. inmunol.* **22** , 19–24 (2021).

[PubMed](#) [Google Académico](#)

---

17.17

---

Zeng, W. et al. Caracterización bioquímica de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2. *Bioquímica Biografía. Res. común* **527** , 618–623 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

18.18

---

Watanabe, Y., Allen, JD, Wrapp, D., McLellan, JS y Crispin, M. Análisis de glucano específico del sitio del pico SARS-CoV-2. *Ciencia* **369** , 330–333 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

19.19

---

Chu, H. et al. Tropismo comparativo, cinética de replicación y perfil de daño celular de SARS-CoV-2 y SARS-CoV con implicaciones para manifestaciones clínicas, transmisibilidad y estudios de laboratorio de COVID-19: un estudio observacional. *Lancet Microbe* **1** , e14–e23 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

20.20

---

Desmyter, J., Melnick, JL & Rawls, WE Defectuosidad de la producción de interferón y de la interferencia del virus de la rubéola en una línea de células renales de mono verde africano (Vero). *J.Virol.* **2** , 955–961 (1968).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

21.21

---

Garred, P. et al. Un viaje a través de la vía de la lectina del complemento-MBL y más allá. *inmunol. Rev.* **274** , 74–97 (2016).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

22.22

---

IP, WK et al. Lecitina de unión a manosa en la infección por coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *J. infectar. Dis.* **191** , 1697–1704 (2005).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

23.23

---

Lipscombe, RJ et al. Altas frecuencias en poblaciones africanas y no africanas de mutaciones independientes en el gen de la proteína de unión a manosa. *Tararear. mol. Gineta.* **1** , 709–715 (1992).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

24.24

---

Sumiya, M. et al. Base molecular del defecto opsónico en niños inmunodeficientes. *Lancet* **337** , 1569-1570 (1991).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

25.25

---

Madsen, HO et al. Un nuevo alelo frecuente es el eslabón perdido en el polimorfismo estructural de la proteína de unión a manano humana. *Inmunogenética* **40** , 37–44 (1994).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

26.26

---

Madsen, HO et al. La interacción entre el promotor y las variantes del gen estructural controlan el nivel sérico basal de la proteína de unión a manano. *J. Immunol.* **155** , 3013-3020 (1995).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

27.27

---

Fishilevich, S. et al. GeneHancer: integración en todo el genoma de potenciadores y genes diana en GeneCards. *Base de datos* **2017** , bax028 (2017).

28.28

---

Kosmicki, JA et al. Un catálogo de asociaciones entre variantes de codificación raras y resultados de COVID-19. Preimpresión en *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.20221804> (2021).

29.29

---

Schirinzi, A. et al. Pentraxina 3: potencial papel pronóstico en pacientes con SARS-CoV-2 ingresados en urgencias. *J. infectar.* **82** , 84–123 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

30.30

---

Gao, T. et al. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates lung injury by MASP-2-mediated complement over-activation. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.1103.1129.20041962> (2020).

---

31.31.

---

Karwaciak, I., Salkowska, A., Karas, K., Dastyh, J. & Ratajewski, M. Nucleocapsid and spike proteins of the coronavirus SARS-CoV-2 induce IL6 in monocytes and macrophages-potential implications for cytokine storm syndrome. *Vaccines* **9**, 54 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Scholar](#)

---

32.32.

---

McBride, R., van Zyl, M. & Fielding, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* **6**, 2991–3018 (2014).

[PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Scholar](#)

---

33.33.

---

Zhou, Y. et al. Un solo sitio de glicosilación ligado a la asparagina de la glicoproteína del pico del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo facilita la inhibición por la lectina que se une a la manosa a través de múltiples mecanismos. *J.Virol.* **84**, 8753–8764 (2010).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

34.34.

---

Lu, Q. et al. El SARS-CoV-2 exacerba las respuestas proinflamatorias en las células mieloides a través de los

receptores de lectina tipo C y el miembro de la familia Tweety  
2. *Immunity* **54** , 1304–1319 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

35.35.

Lempp, FA et al. Las lectinas mejoran la infección por SARS-CoV-2 e influyen en los anticuerpos neutralizantes. *Naturaleza* **598** , 342–347 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

36.36.

Chiodo, F. et al. Nueva unión a carbohidratos independiente de ACE2 de la proteína espiga del SARS-CoV-2 para albergar lectinas y microbiota pulmonar. Preimpresión en *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.092478> (2020).

37.37.

Ali, YM et al. La vía de la lectina media la activación del complemento por las proteínas del SARS-CoV-2. *Parte delantera. inmunol.* **12** , 714511 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

38.38.

Hsieh, MH et al. La proteína D del surfactante humano se une a la proteína de punta y actúa como un inhibidor de entrada de partículas virales pseudotipadas de SARS-CoV-2. *Parte delantera. inmunol.* **12** , 641360 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

39.39.

---

Bayarri-Olmos, R. et al. Desarrollo de un ensayo cuantitativo para la caracterización de la colectina-11 humana (CL-11, CL-K1). *Parte delantera. inmunol.* **9** , 2238 (2018).

[PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

40.40

---

Andreano, E. et al. Escape de SARS-CoV-2 in vitro de un plasma convaleciente de COVID-19 altamente neutralizante. Preimpresión en *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.424451> (2020).

---

41.41.

---

Koch, A. et al. Infecciones agudas del tracto respiratorio e insuficiencia de lectina de unión a manosa durante la primera infancia. *JAMA* **285** , 1316–1321 (2001).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

42.42.

---

Zhang, H. et al. Asociación entre los polimorfismos del gen de la lectina de unión a manosa y la susceptibilidad a la infección por coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *J. infectar. Dis.* **192** , 1355–1361 (2005).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

43.43.

---

Yuan, FF et al. Influencia de los polimorfismos *FcyRIIA* y *MBL* en el síndrome respiratorio agudo severo. *Antígenos tisulares* **66** , 291–296 (2005).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

44.44.

---

Medetalibeyoglu, A. et al. La variante sin sentido del gen 2 de la lectina de unión a manosa (rs1800450) puede contribuir al desarrollo y la gravedad de la infección por COVID-19. *Infectar. Ginet. Evol.* **89**, 104717 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

45.45.

---

Risitano, AM et al. ¿Complemento como diana en COVID-19? *Nat. Rev. Inmunol.* **20**, 343–344 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

46.46.

---

Carvelli, J. et al. Asociación de inflamación por COVID-19 con activación del eje C5a-C5aR1. *Naturaleza* **588**, 146–150 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

47.47.

---

King, C. & Sprent, J. Naturaleza dual de los interferones tipo I en la inflamación inducida por SARS-CoV-2. *Tendencias Immunol.* **42**, 312–322 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

48.48.

---

Garred, P. et al. Terapia de lectina de unión a manosa (MBL) en un paciente con deficiencia de MBL con enfermedad pulmonar de fibrosis quística grave. *pediatra Pulmonol.* **33** , 201–207 (2002).

[PubMed](#) [Google Académico](#)

---

49.49.

Jensenius, JC, Jensen, PH, McGuire, K., Larsen, JL y Thiel, S. Lectina recombinante de unión a manano (MBL) para la terapia. *Bioquímica Soc. Trans.* **31** , 763–767 (2003).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

50.50

Bottazzi, B. et al. Formación de multímeros y reconocimiento de ligandos por la pentraxina larga PTX3. Similitudes y diferencias con la proteína C reactiva de las pentraxinas cortas y el componente amiloide P sérico. *J. Biol. química* **272** , 32817–32823 (1997).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

51.51.

Munthe-Fog, L. et al. El impacto de los polimorfismos y haplotipos de *FCN2* en los niveles séricos de ficolin-2. *Escanear. J. Immunol.* **65** , 383–392 (2007).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

52.52.

De Gasparo, R. et al. La IgG biespecífica neutraliza las variantes del SARS-CoV-2 y evita el escape en ratones. *Naturaleza* **593** , 424–428 (2021).

[PubMed](#) [Google Académico](#)

---

53.53.

---

Consortio, TU UniProt: la base de conocimiento universal de proteínas en 2021. *Nucleic Acids Res.* **49** , D480–D489 (2020).

[Google Académico](#)

---

54.54.

---

Sheriff, S., Chang, CY y Ezekowitz, RAB El dominio de reconocimiento de carbohidratos de la proteína de unión a manosa humana se trimeriza a través de una bobina en espiral triple  $\alpha$ -helicoidal. *Nat. Estructura. Biol.* **1** , 789–794 (1994).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

55.55.

---

Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L. & Zagari, A. Estructura cristalina del modelo de triple hélice de colágeno [(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>]<sub>3</sub>. *Ciencia de las proteínas* **11** , 262–270 (2002).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

56.56.

---

Ng, KK et al. Orientación de ligandos unidos en proteínas de unión a manosa. Implicaciones para el reconocimiento de ligandos multivalentes. *J. Biol. química* **277** , 16088–16095 (2002).

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Académico](#)

---

57.57.

---

Casalino, L. et al. Más allá del blindaje: las funciones de los glucanos en la proteína de punta del SARS-CoV-2. *Ciento ACS. ciencia* **6** , 1722-1734 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

58.58.

Fu, B. et al. CASI: un conjunto de herramientas de simulación molecular de todos los átomos para la determinación de la estructura de proteínas. *J.Comp. química* **35** , 1101–1105 (2014).

[CAS](#) [Google Académico](#)

---

59.59.

Cesana, D. et al. Descubrimiento y disección de la genotoxicidad de vectores lentivirales autoinactivantes in vivo. *mol. El r.* **22** , 774–785 (2014).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

60.60

Stravalaci, M. et al. Control de la activación del complemento por la pentraxina larga PTX3: implicaciones en la degeneración macular relacionada con la edad. *Parte delantera. Farmacia* **11** , 591908 (2020).

[CAS](#) [Google Académico](#)

---

61.61.

Follenzi, A., Ailles, LE, Bakovic, S., Geuna, M. y Naldini, L. La transferencia de genes mediante vectores lentivirales está limitada por la translocación nuclear y rescatada por secuencias pol del VIH-1. *Nat. Gineta.* **25** , 217–222 (2000).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

62.62.

Scudieri, P. et al. Asociación de la sobreexpresión del canal de cloruro de TMEM16A con metaplasia de células caliciformes de las vías respiratorias. *J. Physiol.* **590** , 6141–6155 (2012).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

63.63.

Clementi, N. et al. El uso profiláctico y terapéutico combinado maximiza los efectos anti-SARS-CoV-2 de la hidroxiclороquina in vitro. *Parte delantera. Microbiol.* **11** , 1704 (2020).

[PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

64.64.

Mycroft-West, CJ et al. La heparina inhibe la invasión celular por SARS-CoV-2: dependencia estructural de la interacción del dominio de unión al receptor de pico S1 con heparina. *trombo. Hemost.* **120** , 1700–1715 (2020).

[PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

65.sesenta y cinco.

Consortio de Genética del Infarto de Miocardio et al. Asociación de todo el genoma del infarto de miocardio de aparición temprana con polimorfismos de un solo nucleótido y variantes del número de copias. *Nat. Gineta.* **41** , 334–341 (2009).

[Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

66.66.

---

Taliun, D. et al. Secuenciación de 53.831 genomas diversos del programa NHLBI TOPMed. *Naturaleza* **590** , 290–299 (2021).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

67.67.

---

Chang, CC et al. PLINK de segunda generación: a la altura del desafío de conjuntos de datos más grandes y ricos. *Gigaciencia* **4** , 7 (2015).

[PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

68.68.

---

Purcell, S. et al. PLINK: un conjunto de herramientas para la asociación del genoma completo y los análisis de vinculación basados en la población. *Soy. J. Hum. Genet* **81** , 559–575 (2007).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

69.69.

---

Browning, SR & Browning, BL Fases de haplotipos rápidas y precisas e inferencia de datos faltantes para estudios de asociación del genoma completo mediante el uso de agrupamientos de haplotipos localizados. *Soy. J. Hum. Genet* **81** , 1084–1097 (2007).

[CAS](#) [PubMed](#) [Centro de PubMed](#) [Google Académico](#)

---

70.70.

---

Mantel, N. & Haenszel, W. Aspectos estadísticos del análisis de datos de estudios retrospectivos de enfermedades. *Instituto Nacional del Cáncer J.* **22** , 719–748 (1959).

[CAS PubMed Google Académico](#)

---

71.71.

---

Asselta, R., Paraboschi, EM, Mantovani, A. & Duga, S. Variantes y expresión de *ACE2* y *TMPRSS2* como candidatos a las diferencias de sexo y país en la gravedad de COVID-19 en Italia. *Envejecimiento* **12** , 10087–10098 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

---

[Descargar referencias](#)

## Agradecimientos

---

Este trabajo fue apoyado por una donación filantrópica de la casa de moda Dolce & Gabbana (a AM, CG y EV), del Ministerio de Salud italiano para COVID-19 (COVID-2020-12371640 a AM y CG), del Ministerio italiano de Universidad e Investigación (a PI) y por el proyecto del Departamento de Excelencia PREMIA (PREcision Medicine Approach: llevar la investigación de biomarcadores a la clínica, a PI). También agradecemos la generosa contribución de Banca Intesa San Paolo y AMAF Monza ONLUS y AIRCS por la financiación de la investigación sin restricciones. LV ha recibido financiación del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea en virtud del acuerdo de subvención número 101003650 y de la subvención 31003A\_182270 de SNF (Swiss National Science Foundation). Este trabajo se realizó en el marco de, y fue posible gracias a, [Nota Complementaria](#) ). Este artículo está dedicado a S. Duga, quien falleció el 10 de noviembre de 2021 y realizó una contribución clave a la sección genética de este informe.

Información del autor

---

**Notas del autor**

1. Estos autores contribuyeron igualmente: Matteo Stravalaci, Isabel Pagani.

#### **afiliaciones**

- 1. Hospital de Investigación IRCCS Humanitas, Milán, Italia**  
Matteo Stravalaci, Elvezia Maria Paraboschi, Andrea Doni, Francesco Scavello, Sarah N. Mapelli, Marina Sironi, Chiara Perucchini, Stefano Duga, Barbara Bottazzi, Rosanna Asselta, Alberto Mantovani & Cecilia Garlanda
- 2. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad Humanitas, Milán, Italia**  
Matteo Stravalaci, Elvezia Maria Paraboschi, Stefano Duga, Mariagrazia Uguccioni, Rosanna Asselta, Alberto Mantovani & Cecilia Garlanda
- 3. Unidad de Bioseguridad y Patogénesis Viral, Instituto Científico IRCCS San Raffaele, Milán, Italia**  
Isabel Pagani y Elisa Vicenzi
- 4. Instituto de Investigación en Biomedicina, Università della Svizzera italiana (USI), Bellinzona, Suiza**  
Mattia Pedotti, Luca Varani, Milos Matkovic, Andrea Cavalli y Mariagrazia Uguccioni
- 5. Instituto Suizo de Bioinformática, Lausana, Suiza**  
Andrea Cavalli
- 6. San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS, Instituto Científico San Raffaele, Milán, Italia**  
Daniela Cesana y Pierangela Gallina
- 7. UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Génova, Italia**  
Nicoletta Pedemonte y Valeria Capurro
- 8. Laboratorio de Microbiología y Virología, Instituto Científico IRCCS y Universidad Vita-Salute San Raffaele, Milán, Italia**  
Nicola Clementi y Nicasio Mancini

- 9. División de Gastroenterología, Centro de Enfermedades Autoinmunes del Hígado, Departamento de Medicina y Cirugía, Universidad de Milano-Bicocca, Monza, Italia**  
Pietro Invernizzi
- 10. Red Europea de Referencia en Enfermedades Hepatológicas (ERN RARE-LIVER), Hospital San Gerardo, Monza, Italia**  
Pietro Invernizzi
- 11. Laboratorio de Medicina Molecular, Departamento de Inmunología Clínica, Sección 7631, Rigshospitalet, Hospital Universitario de Copenhagen, København, Dinamarca**  
Rafael Bayarri-Olmos & Peter Garred
- 12. Laboratorio de descubrimiento de anticuerpos monoclonales, Fondazione Toscana Life Sciences, Siena, Italia**  
Rino Rapuoli
- 13. Facultad de Medicina, Imperial College London, Londres, Reino Unido**  
Rino Rapuoli
- 14. El Instituto de Investigación William Harvey, Universidad Queen Mary de Londres, Charterhouse Square, Londres, Reino Unido.**  
Alberto Mantovani

### **Contribuciones**

A.M. and C.G. conceived the study in March 2021 and catalyzed the interaction between different institutions. C.G., E.V. and B.B. supervised the development of the effort. M. Stravalaci and I.P. conducted the core experimental work related to binding, antiviral activity and complement activation. The genetic analysis was conducted by E.M.P. and was supervised by S.D. and R.A. A.D. performed the imaging analysis. M.P., L.V., M.M. and A.C. performed SPR analysis and modeling. S.N.M. performed the bioinformatic analysis. M.U., R.R., P.I., R.B.-O. and P. Garred provided essential tools and materials. F.S., M. Sironi, C.P., D.C., P. Gallina, N.P., V.C., N.C. and N.M. conducted complementary experiments.

## Corresponding authors

Correspondence to [Elisa Vicenzi](#), [Alberto Mantovani](#) or [Cecilia Garlanda](#).

Ethics declarations

---

## Competing interests

A.M., C.G. and B.B. are inventors of a patent (EP20182181) on PTX3 and obtain royalties on related reagents. A.M., C.G., B.B. and E.V. are inventors of two patents (102021000002738 and EP21214373.9) on MBL. R.R. is a full-time employee of the GSK group of companies. The other authors declare no competing interests.

Peer review

---

## Peer review information

*Nature Immunology* thanks Hideharu Sekine and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. L.A. Dempsey was the primary editor on this article and managed its editorial process and peer review in collaboration with the rest of the editorial team.

Additional information

---

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Extended data

---

[Extended Data Fig. 1 Interaction between PRM and SARS-CoV-2 proteins.](#)

**a)** Binding of PTX3 to captured SARS-CoV-2 Nucleocapsid proteins from different companies. **b)** Binding of PTX3, Ficolin-2 and CL-K1 to SARS-CoV-2 N protein-coated plate. **c)** Binding of MBL, Ficolin-2 and CL-K1 to SARS-CoV-2 S protein-coated plate. **d)** Binding of MBL and CL-L1/CL-K1 heterocomplexes to SARS-CoV-2 S protein-coated plate. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 2$  (a, d) or  $n = 3$  independent experiments (b, c) performed in duplicate.

## [Source data](#)

### [Extended Data Fig. 2 SPR analysis of RBD and MBL interaction.](#)

Interaction between recombinant RBD and immobilized MBL in the presence or absence of calcium, as assessed by SPR analysis.

## [Source data](#)

### [Extended Data Fig. 3 A model for the Omicron Spike-MBL complex.](#)

Glycosylation sites are colored according to the oligomannose content: Gold < 60%. Purple > 80% up until S2' region. Blue > 80% in the S2' region. Omicron mutations are in magenta.

## [Source data](#)

### [Extended Data Fig. 4 Inhibition of viral infection and chemokine production by MBL.](#)

( **a - c** ) Inhibición de la infectividad de las variantes de SARS-CoV-2 D614G (a, b) y B.1.1.7 ( $\alpha$ ) (c) por MBL en células Calu-3. SARS-CoV-2 (un panel superior: MOI = 0,1; b: MOI = 0,1; c: MOI 0,01; un panel inferior, MOI = 1) se preincubó en medio completo que contenía diferentes concentraciones de MBL (0,01–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – 0,034–34 nM) antes de la incubación con células Calu-3 (Virus+MBL) (a), o tanto el virus como las células se preincubaron con las mismas concentraciones de MBL (Virus+Cells+MBL) (b, c). Después de 48 y 72 h, se determinó la infectividad del SARS-CoV-2 presente en los sobrenadantes de cultivos celulares mediante un ensayo de formación de placas en células Vero. NIL: sin MBL. ( **d** ) Producción de SARS-CoV-2 en la superficie apical de HBEC a las 72 h PI, en presencia de 25 o 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (75 o 300 nM) de PTX3. ( **mi** ) Producción de quimiocinas por HBEC infectado con SARS-CoV-2 en presencia de MBL. Se muestran los valores medios, n = 2 (a, b, d) o n = 1 (c, e) de experimentos independientes en cultivos celulares por duplicado. (a, panel superior) \*\*P = 0,0011, \*\*\*\*P < 0,001; (a, panel inferior) \*\*\*P =  $1,63 \times 10^{-4}$ , \*\*\*\*P < 0,001; (b) \*\*P = 0,0027, \*\*\*P =  $1,35 \times 10^{-4}$ , \*\*\*\*P < 0,001; (c) \*\*P = 0,0024, \*\*\*P =  $8,32 \times 10^{-4}$  El análisis estadístico se determinó mediante ANOVA bidireccional (a, b, c, e) o unidireccional (d), seguido de la comparación múltiple de Bonferroni prueba.

## Información suplementaria

---

### [Información suplementaria](#)

Tablas complementarias 1–6 y Nota.

### [Resumen de informes](#)

### [Información de revisión por pares](#)

### [41590 2021 1114 MOESM4 ESM.mp4](#)

Video complementario 1 Proteína S SARS-CoV-2 y MBL colocalizados en células HBEC infectadas. Representación 3D que muestra una reconstrucción combinada de la colocalización entre la proteína de pico SARS-CoV-2 y MBL en cultivos HBEC, preferentemente asociada al lado apical.

## Datos fuente

---

### [Fuente de datos Fig. 1](#)

Fuente de datos estadísticos.

### [Fuente de datos Fig. 2](#)

Fuente de datos estadísticos.

### [Fuente de datos Fig. 3](#)

Fuente de datos estadísticos.

### [Fuente de datos Fig. 4](#)

Fuente de datos estadísticos.

### [Fuente de datos Fig. 5](#)

Fuente de datos estadísticos.

### [Fuente de datos Fig. 6](#)

Fuente de datos estadísticos.

[Datos de origen Datos ampliados Fig. 1](#)

Fuente de datos estadísticos.

[Datos de origen Datos ampliados Fig. 2](#)

Fuente de datos estadísticos.

[Datos de origen Datos ampliados Fig. 3](#)

Fuente de datos estadísticos.

Derechos y permisos

---

[Reimpresiones y permisos](#)

Acerca de este artículo

---

---

### **Citar este artículo**

Stravalaci, M., Pagani, I., Paraboschi, EM *et al.* Reconocimiento e inhibición del SARS-CoV-2 por moléculas de reconocimiento de patrones de inmunidad innata humoral. *Nat Immunol* **23**, 275–286 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01114-w>

[Descargar cita](#)

- Recibió 21 junio 2021
- Aceptado 09 diciembre 2021
- Publicado 31 enero 2022
- Fecha de asunto febrero 2022
- DOI <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01114-w>

### **Comparte este artículo**

Cualquier persona con la que compartas el siguiente enlace podrá leer este contenido:

Obtener enlace para compartir

Proporcionado por la iniciativa de intercambio de contenido Springer Nature SharedIt

## Asignaturas

- [Cascada del complemento](#)
- [Receptores de reconocimiento de patrón](#)
- [Infección viral](#)

Inmunología de la Naturaleza ( *Nat Immunol* ) ISSN 1529-2916 (en línea) ISSN 1529-2908 (impresión)

- [Sobre nosotros](#)
- [Comunicados de prensa](#)
- [oficina de prensa](#)
- [Contáctenos](#)

- 
- 
- 

## Descubrir contenido

- [Revistas de la A a la Z](#)
- [Artículos por tema](#)
- [Nano](#)
- [Intercambio de protocolo](#)
- [Índice de naturaleza](#)

## Políticas de publicación

- [Pólizas de cartera de naturaleza](#)
- [Acceso abierto](#)

## Servicios de autor e investigador

- [Reimpresiones y permisos](#)
- [Datos de la investigación](#)
- [Edición de idioma](#)
- [edición científica](#)
- [Clases magistrales de naturaleza](#)
- [Academias de investigación de la naturaleza](#)

## Bibliotecas e instituciones

- [Servicio y herramientas de bibliotecario](#)
- [Portal del bibliotecario](#)
- [Investigación abierta](#)
- [Recomendar a la biblioteca](#)

## Publicidad y asociaciones

- [Publicidad](#)
- [Asociaciones y servicios](#)
- [kits de medios](#)
- [Contenido de marca](#)

## Desarrollo de carrera

- [Carreras en la naturaleza](#)
- [Naturaleza Conferencias](#)
- [Naturaleza eventos](#)

## Sitios web regionales

- [Naturaleza África](#)
- [naturaleza china](#)
- [Naturaleza India](#)
- [Naturaleza Italia](#)
- [Naturaleza Japón](#)
- [naturaleza corea](#)
- [Naturaleza Medio Oriente](#)

## Legal y privacidad

- [Política de privacidad](#)
- [Uso de cookies](#)
- [Administrar cookies/No vender mis datos](#)

- [Aviso Legal](#)
- [Declaración de accesibilidad](#)
- [Términos y condiciones](#)
- [Declaración de privacidad de California](#)