

## **Modelación de la respuesta inmune y las trayectorias de señalización metabólicas en la infección por el virus SARS-CoV-2.**

### **Resumen**

Actualmente la pandemia COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 ha causado más de 128 millones de infecciones y 2.8 millones de decesos. A pesar de que se han desarrollado diferentes vacunas eficaces contra esta infección, aún es apremiante comprender los mecanismos de respuesta inmune y los desordenes metabólicos que contribuyen a padecer un COVID-19 grave, incluso a fallecer. En esta investigación se tiene como objetivo determinar la relación de la respuesta inmune al virus SARS-CoV-2 y las trayectorias de señalización asociadas a desordenes metabólicos (Hipertensión cardiovascular, Diabetes y Obesidad). Los resultados podrían conducir a identificar los factores moleculares asociados a la susceptibilidad o protección a la infección por virus del tipo SARS-CoV-2.

### **Introducción**

#### **Antecedentes**

A finales del 2002 en la provincia China de Guangdong surge el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), una nueva enfermedad infecciosa con alta morbilidad y mortalidad [1]. Los primeros casos del SARS se reconocieron en diciembre de 2002 y durante los siguientes 6 meses se presentaron 8,403 casos en más de 29 países, con una tasa de letalidad global del 10%. La estadística de este brote indicó más mortalidad en pacientes varones, siendo más susceptibles las personas mayores a 65 años o pacientes con alguna comorbilidad (hipertensión, diabetes, obesidad) y/o fumadores [2, 3, 4]. Sin embargo, los niños abajo de 12 años fueron menos susceptibles a este brote infeccioso, se contabilizaron un número muy reducido de casos. De hecho, un reporte de la Organización Mundial de la Salud (WHO) indica que no hubo transmisión del virus entre niños a pesar de estar en convivencia escolar [5].

En diciembre de 2019, después de 17 años, surge en la provincia China de Wuhan una nueva cepa de coronavirus llamada SARS-CoV-2, propiciando de esta manera la enfermedad COVID-19; llamada por la OMS. Esta enfermedad viral es altamente contagiosa y produce cuadros clínicos severos de neumonía con falla múltiple de órganos [6]. Hasta el 23 de marzo de 2021 se habían contabilizado más de 128 millones personas infectadas y más de 2.8 millones de decesos en 210 países, con una tasa de letalidad global del 2.2% [7]. El SARS-CoV-2 como su antecesor el SARS-CoV-1, son derivados de una zoonosis que relaciona al murciélago como fuente principal de contagio [8]. Las infecciones por estos tipos de coronavirus conducen al mismo cuadro clínico con síntomas primarios de fiebre, fatiga, tos seca, mialgia, dolor de cabeza, disnea progresiva y en casos críticos (14%) dolor abdominal, diarrea, náusea, vomito, neumonía, daño alveolar, trombosis y fallo cardio-respiratorio como principal causa de muerte [6,9]. Por otra parte, estudios recientes apuntan a que el periodo de incubación para COVID-19 es aproximadamente de 7 a 10 días y enfatizan la importancia de considerar la longitud de la cuarentena de personas expuestas al SARS-CoV-2. Donde los monitoreos más largos pueden

ser justificados en casos extremos [11]; finalmente, estudios más cautelosos alertan sobre la diversidad de resultados respecto al periodo de incubación para SARS-CoV-2, por lo que refieren que debe estar todavía en discusión [12].

### **Mecanismos de la infección por SARS-CoV-2**

Estudios del SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 indican que la glicoproteína viral S (spike) utiliza los receptores de membrana celular ACE2 (enzima 2 convertidora de angiotensina) y serina proteasa TMPRSS2. Esta última proteína modifica a ACE2 en el extremo carboxilo haciendo un corte en los residuos de las posiciones 741 a 761aa para facilitar la entrada del virus [13]. Estas proteínas de membrana son expresadas en múltiples tejidos en humanos, siendo más abundante y ampliamente distribuida TMPRSS2 [14,15]. En el pulmón se ha identificado una alta expresión de ACE2 en células alveolares tipo II [16,17,18], así como en células de la parte superior de esófago, células epiteliales estratificadas, enterocitos de íleon y colon [18,19], células de miocardio, células del túbulo proximal del riñón y células uroteliales de vejiga [16,20,21]. La glicoproteína viral S posee un dominio de unión al receptor (RBD) entre los residuos 318 a 510aa, este motif tiene alta afinidad para el receptor humano ACE2 [22,23]. Por otra parte, en la proteína ACE2 se han identificado regiones de interacción a la proteína S, que involucran los residuos 30-41aa, 82-84aa, 90-93aa (el aminoácido 90 posee glicosilación de reconocimiento) y 353-357aa [22]. Además, se ha reportado que células que expresan las lectinas CD209L ó CD209 (DC-SIGNR ó DC-SIGN) pueden interactuar con ACE2 para potenciar la infección por SARS-CoV. Estas lectinas forman parte de los patrones moleculares de reconocimiento de patógenos y son dependientes de alto contenido de manosa [24]. También se ha descrito que la susceptibilidad a SARS-CoV puede estar relacionada con algunas variantes del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-B\*4601, HLA-B\*0703, HLA-DR B1\*1202 [11,19] y HLA-Cw\*0801 [12]), mientras que otras pueden conferir protección (HLA-DR0301, HLA-Cw1502 y HLA-A\*0201).

La función homeostática de la proteína ACE2 juega un papel importante en la regulación de la presión arterial, como parte del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA). El sistema inicia la respuesta cuando la presión arterial sistólica disminuye, entonces las células yuxtaglomerulares (células granulares) del riñón liberan la enzima renina al torrente sanguíneo. Esta enzima cataliza el angiotensinógeno, una proteína liberada por hígado, riñón, vasos sanguíneos y sistema nervioso como estímulo por inflamación, la insulina, los estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea y la Angiotensina II. El producto de la reacción renina-angiotensinógeno se conoce como angiotensina I, que es activada por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) la cual produce angiotensina II (AGT II). ACE es una metaloproteasa de zinc, la cual es expresada mayormente en el endotelio pulmonar. Posteriormente la AGT II es captada por el receptor 1 de angiotensina (AGTR1), después con estímulo de  $Ca^{+2}$  y la proteína CYP11B2 se libera la hormona aldosterona en la zona glomerulada de las glándulas suprarrenales y vasopresina (hormona antidiurética) en la neurohipófisis (pituitaria). La aldosterona y vasopresina incrementan la retención de sodio en riñones, en consecuencia, se produce retención de agua aumentando la presión arterial. La

AGT II puede ser transformada por una aminopeptidasa en Angiotensina III (AGT III), un péptido con escaso nivel vasoconstrictor que se une a AGTR1 y con mayor afinidad al receptor 2 de angiotensina (AGTR2). Después la AGT III es degradada por otra aminopeptidasa que remueve una arginina de su extremo amino, dando lugar a la AGT IV. Este último producto también puede ser generado a partir de AGT II por la aminopeptidasa D. La AGT IV trae como consecuencia el incremento de óxido nítrico (NO) en células endoteliales de pulmón y regulación del transportador GLUT-4 a través de la unión de AGT IV a su receptor AGTR4, el receptor AGTR4 se localiza en pulmón, corazón, riñón e hígado [26,27,28].

El estímulo sostenido de AGT II puede generar liberación de catecolaminas, proliferación celular vascular, hormona antidiurética, hipertrofia miocárdica y fibrosis. La trayectoria de AGT II mediada por ACE inactiva a los péptidos vasodilatadores bradiquinina y kaliceína, entonces cuando se utilizan inhibidores de ACE (fármacos) evitan la formación de AGT II y actúan estos vasodilatadores. Resulta evidente que la AGT II es una hormona que produce aumento de presión por la vasoconstricción de las paredes de músculo liso de las arteriolas. Sin embargo, existe la contraparte que involucra al receptor ACE2, el proceso inicia cuando la AGT I es convertida en Angiotensina 1-9 (sin actividad) por ACE2, posteriormente ACE la reduce en Angiotensina 1-7 con actividad vasodilatadora compitiendo con AGT II por el AGTR1. También se ha demostrado que AGT II es convertida en Angiotensina 1-7 por ACE2 en otra vía de regulación de vasodilatación. Por otro lado, existe una vía de síntesis de AGT II independiente de ACE y este proceso no se ve alterado por los inhibidores de ACE. En esta trayectoria el angiotensinógeno se convierte en AGT II directamente por la catexina G y tonina [29]. También la AGT I puede ser convertida a AGT II por la cimasa en tejidos de miocardio y riñón, la cimasa es una enzima sensible a cimostatina y catexina G. Se estima que en humanos el 40% de la AGT II procede de vías independientes a ACE [30].

## **Justificación**

En infecciones por SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 se ha descrito que los varones son 1.6 veces más propensos al contagio respecto a las mujeres, además las personas con más de 60 años, hipertensión, diabetes u obesidad poseen mayor riesgo de complicaciones y decesos. Sin embargo, estos son datos estadísticos que no están soportados por una justificación biomédica que relacione las causas moleculares asociadas a patrones metabólicos o de género. Tampoco se tiene claro cuales fármacos son los más convenientes para disminuir el malestar, dolor y fiebre en la infección o cuales pueden estar contraindicados por interferir en el sistema RAA que regula la presión arterial. Por ejemplo se ha descrito que fármacos anti-inflamatorios no esteroideos causan retención de agua y sales, lo que puede incrementar la presión arterial. Actualmente se sabe que en los casos de Covid-19 graves, las citocinas pro-inflamatorias están sobre reguladas, la glucosa se desequilibra en personas con Diabetes tipo 2 y el sistema RAA altera la homeostasis cardiovascular. Por lo anterior es urgente atender las causas moleculares implícitas en la respuesta inmune y virulencia de la infección por el virus SARS-CoV-2. El conocimiento de los mecanismos de acción del virus permitirá diseñar mejor las estrategias prevención y tratamiento de los pacientes.

## Hipótesis

La infección por SARS-CoV-2 modula la respuesta inmune viral y altera las trayectorias de señalización implicadas en el metabolismo en cuadros graves de COVID-19.

## Objetivo

**Determinar redes de regulación genéticas para modelación de la respuesta inmune y patrones metabólicos asociados a los pacientes con mayor riesgo durante la infección por SARS-CoV-2.**

## Objetivos específicos

1. Revisar y analizar extensas bases de datos y literatura reciente de diversas poblaciones infectadas por SARS-CoV-2, así como las trayectorias metabólicas de señalización comprometidas en la infección por SARS-CoV-2.
2. Modelar las redes de regulación génica de la respuesta inmune y vías metabólicas en la infección por SARS-CoV-2.
3. Validar estadísticamente la información en las poblaciones infectadas por SARS-CoV-2 considerando género, edad, condiciones clínicas metabólicas (hipertensión, diabetes y obesidad). Lo anterior para identificar patrones de vulnerabilidad en pacientes jóvenes y personas con comorbilidades.

## Metodología

Revisión de bibliografía reciente y bases de datos de variantes asociadas a los genes de las trayectorias del sistema RAA (*ace*, *ace2*, *agrtr1*, *mas1*, *cyp11b2*, *tmprss2*) y genes de respuesta inmune en pacientes COVID-19. Se realizará minería de datos utilizando machine learning (método de Random Forest y Diffusion maps) para extraer información estadísticamente confiable y para clasificar los datos por su nivel de expresión. También se registrarán las variables de la posición genómica, región, expresión génica, fenotipo molecular, frecuencia alélica y desequilibrio de ligamiento en las trayectorias de señalización de interés. La información depurada será sometida a meta-análisis para obtener las distribuciones de riesgo/protección para hipercolesterolemia, hipertensión arterial, diabetes y obesidad en poblaciones amplias. También se realizará un análisis topológico de datos para establecer relaciones confiables con la métrica Wasserstein que compararán las distancias de las estructuras topológicas entre grupos de genes. Este agrupamiento por distancias definirá las redes de regulación de los riesgos por cada conexión que posea la red entre los grupos de variantes asociadas y permitirá establecer relaciones de proximidad. Las redes de regulación serán comparadas con la literatura para determinar correlación con las asociaciones de riesgo en diferentes grupos poblacionales con las condiciones clínicas de interés. En una etapa posterior se estimará el riesgo de las trayectorias de señalización involucradas en la susceptibilidad de la infección por SARS-CoV-2. Se identificarán las variantes implicadas en riesgo fármaco-genómico en el sistema RAA y se clasificarán por trayectorias de señalización

comunes en la red de regulación de variantes metabólicas asociadas a las enfermedades relacionadas a esta investigación. Es importante destacar que podrían surgir variantes raras o que presenten alguna inconsistencia con las probables trayectorias de la red de regulación de variantes genómicas. Para ello podremos establecer estrategias de retroalimentación con poblaciones de otros Países para buscar la explicación más probable a los resultados. Finalmente se integrarán los resultados para proporcionar estimaciones confiables de los riesgos metabólicos en la infección por SARS-CoV-2.

### Resultados esperados

La investigación proporcionará evidencia de la correlación entre redes de regulación génica metabólica y los mecanismos de infección por SARS-CoV-2 en pacientes graves. Estos resultados serán útiles para identificar las genes, variantes génicas y haplotipos metabólicos que más influyen en las condiciones clínicas de comorbilidad (hipertensión, diabetes, obesidad) durante la infección por SARS-CoV-2. Tendremos los patrones genéticos de riesgo asociados a pacientes que desde su infección deban ser catalogados como de alto riesgo, así como las causas del desequilibrio en la tasa de infección y letalidad por género y la edad de los pacientes COVID-19. La comprensión de los mecanismos de infección y las redes de regulación génicas asociadas proporcionarán las causas por las que aparecen los cuadros clínicos severos. Esto deberá aportar nuevas estrategias preventivas y de tratamiento en el abordaje de la infección por SARS-CoV-2. Finalmente en perspectiva, la información obtenida podría evidenciar dianas terapéuticas más eficaces para aplicar o desarrollar nuevos fármacos de acuerdo a las trayectorias de señalización comprometidas durante la infección por SARS-CoV-2.

### Bibliografía

- [1] (COVID-19) based on current evidence, *International Journal of Antimicrobial Agents*(2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105948>
- [2] Hoffmann et al., SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor, *Cell* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- [3] Demogines A., Farzan, Mi M. and Sawyer, S.L. (2012). Evidence for ACE2-Utilizing Coronaviruses (CoVs) Related to Severe Acute Respiratory Syndrome CoV in Bats. *Journal of Virology*, 86 (11) 6350-6353. Doi: 10.1128/JVI.00311-12
- [4] Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
- [5] Zou, X., Chen, K., Zou, J. et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>

- [6] Zhao Y., Zhao Z., Wang Y., Zhou Y., Ma Y., Zuo W., Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCov. Preprint at *bioRxiv* 2020.01.26.919985; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.26.919985>
- [7] Zhang H et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. Preprint at *bioRxiv* 2020.01.30.927806; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.30.927806>
- [8] Xu, H., Zhong, L., Deng, J. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* 12, 8 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
- [9] Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., & McCray, P. B., Jr (2005). ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *Journal of virology*, 79(23), 14614–14621. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005>
- [10] Chai, X. et al. Specific ACE2 Expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. Preprint *bioRxiv* 2020.02.03.931766; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.03.931766>
- [11] Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J. H., Moore, M. J., Luo, S., et al. (2005c). Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24, 1634–1643. doi: 10.1038/sj.emboj.7600640
- [12] Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020; 367: 1444–8.
- [13] Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Möller, P., Rennekamp, A. J., Krumbiegel, M., ... & Steinkasserer, A. (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology*, 78(21), 12090-12095.
- [14] Wang, S. F., Chen, K. H., Chen, M., Li, W. Y., Chen, Y. J., Tsao, C. H., Yen, M. Y., Huang, J. C., & Chen, Y. M. (2011). Human-leukocyte antigen class I Cw 1502 and class II DR 0301 genotypes are associated with resistance to severe acute respiratory syndrome (SARS) infection. *Viral immunology*, 24(5), 421–426. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0024>
- [15] Lavoie, J. & Sigmund, C. (2003) Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology, Volume 144, Issue 6*, 1 June 2003, Pages 2179–2183, <https://doi.org/10.1210/en.2003-0150>
- [16] Ribeiro-Oliveira, A., Jr, Nogueira, A. I., Pereira, R. M., Boas, W. W., Dos Santos, R. A., & Simões e Silva, A. C. (2008). The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vascular health and risk management*, 4(4), 787–803.

- [17]Castro, C. H., Santos, R. A., Ferreira, A. J., Bader, M., Alenina, N., and Almeida, A. P. (2005). Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* 46, 937–942; doi: 10.1161/01.HYP.0000175813.04375.8a
- [18]Wolny A, Clozel JP, Rein J, et al. (1997) Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res.* 1997;80(2):219–227; doi:10.1161/01.res.80.2.219
- [19]Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 1998;32(3):387–392; doi:10.1161/01.hyp.32.3.387.