

## Virus y enfermedades infecciosas

➤ **Artículo original:** Cell surface SARS-CoV-2 nucleocapsid protein modulates innate and adaptive immunity. López-Muñoz, A.D. et al. *Science Advances*. 2022.

# Dando “N” el clavo de la COVID-19

Alberto Domingo López Muñoz, Ph.D., M.Sc.

Los coronavirus que infectan al ser humano han sido descritos históricamente como virus del resfriado común. Sin embargo, en las dos últimas décadas, coronavirus humanos altamente patogénicos han emergido causando **síndromes respiratorios severos** (“*Severe Acute Respiratory Syndrome*” en inglés, abreviados como SARS), incluyendo el SARS-CoV-1 en 2002 y el MERS coronavirus en 2012. El agente causante de la COVID-19, el SARS-CoV-2, que apareció a finales de 2019 en un mercado de la ciudad china de Wuhan, se ha expandido mundialmente causando una pandemia que acumula una cifra de más de 6.5 millones de muertes según la Organización Mundial de la Salud (1).

A pesar de una respuesta científica global y de vacunación sin precedentes, aspectos críticos de la biología de este virus, su patogénesis y cómo modula el sistema inmune humano aún se desconocen. Algunos de estos fenómenos causados por la infección son la tormenta de citoquinas, los fenómenos de coagulación y la COVID-19 persistente (“*Long COVID-19*”, en inglés). La aparición constante de nuevas variantes virales, junto con el escaso entendimiento de estas secuelas de la infección **ponen en peligro una inmunidad colectiva duradera y un retorno mundial completo a la normalidad previa a la pandemia**.

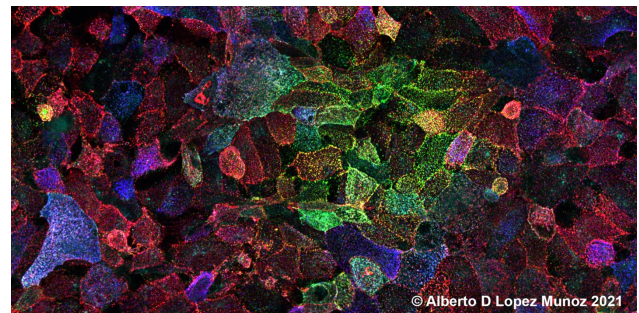
Un virus está formado por numerosas **proteínas ensambladas y material genético**. La proteína de la espícula (“*spike*” en inglés, o “S”), es una de las cuatro proteínas estructurales que forman el virus SARS-CoV-2. Otra proteína del virus es la proteína de la nucleocápsida, o nucleoproteína (“N”), que se encuentra dentro de la partícula viral, uniéndose y estabilizando el material genético del virus. La proteína N es la que más se produce durante la infección de los coronavirus (2). Tiene una capacidad inmunogénica muy elevada, es decir, despierta y desencadena fuertes reacciones en el sistema inmune. Además, es un determinante de virulencia y patogénesis. Mayores niveles de esta proteína en sangre han sido correlacionados con una peor prognosis de la infección (3). **Históricamente se ha considerado que la proteína N estaba localizada dentro de la célula** durante la infección viral. Sin embargo, se ha descrito que la proteína N de otros virus como el virus de la gripe, sarampión y el respiratorio sincitial secretan esta proteína fuera de la célula para inhibir o empeorar la respuesta del sistema inmunitario (4,5).

En el artículo original, publicado en *Science Advances*, una revista insignia de la ciencia mundial, identificamos cómo **la proteína N de SARS-CoV-2 se encuentra en la superficie celular** durante la infección, uniéndose a los azúcares extracelulares de células infectadas y células vecinas no infectadas. Además, N interacciona con 11 componentes clave en la orquestación de las primeras defensas inmunitarias contra infecciones. N también une anticuerpos, desencadenando respuestas inmunes mediadas por los mismos. Estos hallazgos invitan a reevaluar su

relevancia en la virulencia, la patogénesis y las estrategias de vacunación contra la COVID-19.

## En profundidad...

Utilizando citometría de flujo, una técnica especializada que permite detectar las proteínas que se encuentran en la superficie de células individuales, detectamos a la proteína N en 8 tipos celulares diferentes que infectamos con el virus SARS-CoV-2. Mediante otra técnica, inmunofluorescencia de microscopio confocal, la cual permite observar y fotografiar células vivas e intactas, similarmente encontramos **que muchas de las células infectadas con el virus tenían N en su superficie celular**. Como ejemplo, podemos observar cómo en células VERO (procedentes de mono verde africano), altamente susceptibles al SARS-CoV-2, la proteína N aparece abundantemente en su superficie (Figura 1). Estos resultados demostraban que la proteína N es expresada en la superficie de las células vivas infectadas.



**Figura 1.** Inmunofluorescencia de microscopía confocal de células VERO vivas infectadas con el virus SARS-CoV-2 por 24h, mostrando en su superficie la proteína N (verde) la proteína S (azul) y los azúcares extracelulares de membrana (rojo). Imagen usada por la revista *Science Advances* en su número del 3 de agosto de 2022 como portada temporal online para promocionar el artículo científico original.

Este hallazgo es muy relevante ya que, hasta el momento, la comunidad científica pensaba que esta proteína viral se encontraba recluida dentro de la célula durante las infecciones por coronavirus. El hecho de que la detectemos fuera de la célula **abre la puerta a preguntas sobre su función y papel extracelular durante la infección**.

En los experimentos mencionados anteriormente, siempre encontramos un gran número de células que tenían exclusivamente la proteína N en su superficie celular pero ninguna otra proteína del virus. Esto nos llamó la atención, ya que normalmente una célula infectada expresa y secreta diferentes proteínas virales siendo la proteína S la más común en el caso de la infección por SARS-CoV-2.

Para evaluar la posibilidad de que las células infectadas estuvieran **donando la proteína N a las células vecinas**, diseñamos unos

experimentos de transferencia de proteínas extracelulares en los cuales incubamos células infectadas donantes con células receptoras que no son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2. Después de 24 horas, analizamos las proteínas virales en la superficie de las células receptoras. Para nuestra sorpresa, la proteína N de las células donantes había sido transferida a la superficie de las células receptoras, mientras que la proteína S solamente aparecía en las células donantes infectadas, no en las células receptoras no infectadas. Estos hallazgos demostraban que la proteína N es transferida a las células vecinas.

Con el fin de entender el mecanismo por el cual esta transferencia intercelular es posible, incubamos células donantes infectadas con células receptoras no susceptibles al virus que no tienen azúcares en la superficie celular. Cuando analizamos estas células receptoras **sin azúcares, no encontramos rastro de la proteína N en su superficie**. Esto significa que N no solamente es transferida a células vecinas sanas, sino que esta transferencia está mediada por los azúcares naturales presentes en la superficie celular de todas las células de nuestro cuerpo.

El hecho de que la proteína N apareciera en la superficie celular de las células infectadas y colindantes sugería una función evolutiva significativa, lo que nos llevó a investigar posibles funciones en la modulación de la respuesta inmunitaria. Encontramos que N interacciona con 11 quimiocinas humanas, unas moléculas del sistema inmune innato implicadas en el reclutamiento de leucocitos en el sitio de infección. Mediante ensayos de migración celular, descubrimos que la habilidad natural de estas quimiocinas para reclutar leucocitos se veía fuertemente inhibida en presencia de concentraciones crecientes de la proteína N. Desde un punto de vista evolutivo, la proteína N de los virus SARS-CoV-1 y MERS-CoV, coronavirus humanos muy patógenos, también produjeron efectos inhibitorios similares. Además, encontramos que células infectadas eran capaces de unir anticuerpos contra N y activar células reporteras que suelen participar en procesos

de señalización y muerte celular, uno de los mecanismos de acción del sistema inmune contra segundas y sucesivas infecciones por un mismo virus.

## En conclusión...

Estos resultados invitan a **reevaluar el papel de la proteína N en la COVID-19**. El hecho de que la proteína N se encuentre en el espacio extracelular, uniéndose a azúcares anticoagulantes, sugiere que podría tener un papel importante en los episodios de coagulación anómala asociados a la COVID-19. La proteína N ha sido encontrada en el intestino y pulmones de pacientes recuperados y fallecidos por COVID-19 (6), lo cual es consistente con un papel potencial en el desarrollo del cuadro clínico crónico característicos de la *long* COVID-19. Un estudio reciente realizado con más de 2500 pacientes correlaciona la presencia de altos niveles de la proteína N en la sangre con una peor prognosis de la enfermedad (3). **Además, nuestros resultados presentan a N como la primera proteína secretada** de un coronavirus que une quimiocinas humanas, inhibiendo la función de estas moléculas del sistema inmunitario humano. La proteína N es un candidato atractivo para futuras vacunas contra la COVID-19, debido a su alta capacidad inmunogénica y su menor tasa de mutación. Esta mayor estabilidad genética puede ser particularmente relevante dada la sorprendente capacidad de la proteína S de adquirir mutaciones, ilustrado en la variante Ómicron, con más de 30 cambios respecto a la cepa original.

En resumen, nuestros resultados demuestran un **papel inesperado** y novedoso de la proteína N en la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos, que puede contribuir a la patogénesis del virus, pero también a una protección a largo plazo contra el mismo. N puede ser una de las claves para una futura vacuna universal que provea amplia protección contra futuras variantes de SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos.

## Referencias:

1. Maxmen A. Wuhan market was epicentre of pandemic's start, studies suggest. 2022. *Nature*. 603:15-16.
2. Sariol A, Perlman S. 2020. Lessons from COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*. 53:248-263.
3. Rogers et al., 2022. The association of baseline plasma SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen level and outcomes in patients hospitalized with COVID-19. *Annals of Internal Medicine*.
4. Marie JC et al., 2004. Cell Surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J. Virol*. 78:11952-61.
5. Cespedes PF et al., 2014. Surface expresión of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *PNAS*. 111:3214-3223.
6. Grootemaat et al., 2022. Lipid and nucleocapsid N-protein accumulation in COVID-19 patient lung and infected cells. *Microbiol Spectr*. 10:e0127121.


## Conflictos de interés

El autor de este artículo es a su vez el primer autor del artículo original. No declara tener otros conflictos de interés.

## Sobre el autor

**Alberto Domingo López Muñoz, Ph.D., M.Sc.**, es virólogo molecular, apasionado por entender como los virus son capaces de mimetizar y modular el sistema inmune humano. Recibió su doctorado y máster en la Universidad Autónoma de Madrid (España), donde estudió mecanismos de inmunomodulación y evolutivos de los virus humanos del herpes simplex, entre otros. Durante su etapa predoctoral, realizó dos estancias de investigación, en el Imperial College de Londres (Reino Unido) y en el Instituto Americano de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID, USA).

Actualmente es investigador postdoctoral en el Laboratorio de Enfermedades Virales dentro del NIAID (National Institutes of Health, NIH, USA), estudiando coronavirus humanos y gripe. Su deseo por mejorar la visibilidad de los científicos españoles e interconectar las comunidades científicas española y americana le han motivado a liderar el capítulo de Washington DC y a participar en el programa E-Visibility.

 Alberto D. López-Muñoz

## ECUSA News&Views Editors-in-Chief:

**Antonio Cembellin Prieto, B.S.**

**Fernando de Miguel, Ph.D**

Copyright © 2022 Españoles científicos en Estados Unidos (ECUSA) News&Views