

CARACTERIZACIÓN PROFUNDA DE LA SERIE BLANCA DE PACIENTES CON PATOLOGÍA COVID-19 PARA SU CRIBADO POR AGRESIVIDAD

**Programa de Doctorado
Bioquímica y Biología Molecular**

D^a Silvia Martínez Diz

Dirección de la Tesis Doctoral:
Dra. D^a María Jesús Álvarez Cubero
Dr. D. Luis Javier Martínez-González



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado Bioquímica y Biología Molecular.

“Caracterización profunda de la serie blanca de pacientes con patología COVID-19 para su cribado por agresividad”

**Tesis doctoral presentada por D^a Silvia Martínez Diz, Licenciada en
Medicina y Cirugía, por la que opta al título de Doctora por la
Universidad de Granada.**

Directores de la Tesis Doctoral:

Dra. D^a María Jesús Álvarez Cubero

Dr. D. Luis Javier Martínez-González

Granada, Enero de 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Silvia Martínez Diz
ISBN: 978-84-1195-241-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/90725>

La doctoranda, D^a Silvia Martínez Diz, y los directores de la tesis: D^a María Jesús Álvarez Cubero y D. Luis Javier Martínez González,

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Lugar y fecha:

En Granada a 11 de enero de 2024

Director/es de la Tesis:

Doctoranda:

Firma

Firma

DEDICATORIA

A Jesús y Marina

Por vuestra tenacidad ante la adversidad.

*“Go placidly amid the noise and haste, and remember what peace
there may be in silence”.*

*“Camina plácidamente entre el ruido y la prisa, y recuerda cuánta
paz se puede encontrar en el silencio”.*

Max Ehrmann. Desiderata.

A Eloísa y Ana Loreto

*No dejéis de creer nunca en vuestras
capacidades y en vuestros sueños*

*“... el mundo es todavía hermoso.
Se cauto.
Esfuérzate por ser feliz”*

Max Ehrmann. Desiderata.

Agradecimientos

Fórmula magistral

Dp/ Para hacer una tesis
yo te daré la receta:
espera y cuando salga el sol
puedes sacar la chuleta.
Lo primero y principal
es tener un buen caldero
y google 2.0
pues una doctoranda cabal y de buen ver
no es nadie sin un puchero,
ni sin amigos a quien agradecer.
En noches de luna, luna
el aquelarre has de hacer
invocando a la fortuna,
y al portal seguimiento
de la UGR, a la vez.
No dejes de remover,
Ni dejes de agradecer
¡Nada de sapos ni arañas!
¡Es Zotero, o Mendeley lo que tienes que aprender!
Comenzarás la jornada,
con esencia de clorhexidina
Para llegar a ser,
una doctora divina,
quizás, alguna vez.
Un gran puñado de bibliografía
Tres tazas de introducción,
y, material y métodos,
con maestría y con tesón.

Coge el zumo de un secreto,
tres cucharadas de PubMed
y sumerge el amuleto
con diez hojas de laurel.
Para remover te basta
con la antena de un microbio
cabal y entusiasta
que haya perdido el agobio,
en un ambiente anaerobio.
Hueso de pandemia,
y la uña de un murciélago,
con síntomas ya, de anemia.
Y con esta fórmula genética,
de agradecimientos,
de rebotica
Falta lo más importante:
Abracadabra
no es.
Búscalo en esta tesis,
que te lo diré después.

Gracias. c.s.p 100 ml

h.s.a.

“Aplicar en cataplasma al amanecer y al anochecer, durante al menos un lustro, sin que te dé susto. Consultar de nuevo”

Adaptado de Conjuros y otras brujerías, 2007. María Rosa Madrid: Hiperión, Colecc. Ajonjolí.

“Como no estás experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen dificultad te parecen imposibles; confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”

Miguel de Cervantes.

En un lugar de la lejana China, cuyo nombre casi no recuerdo, no ha mucho tiempo apareció un virus peculiar, adarga monocatenaria, huésped desconocido y espícula corredora, Así empezó esta tesis, fruto del trabajo de un gran equipo humano y científico, cuál hidalgo caballero, que ha brindado todas sus capacidades técnicas y humanas para buscar respuestas científicas desde el inicio de la declaración de la última pandemia de la edad contemporánea. No hubiera sido posible sin su apoyo, trabajo y confianza.

“Hechas, pues, estas prevenciones, no quiso aguardar más tiempo a poner en efeto su pensamiento”, para en primer lugar, agradecer a mis tutores, la Doctora D^a María Jesús Álvarez Cubero y al Doctor D. Luis Javier Martínez González, por su labor más allá de la tutoría de una tesis académica, por su incansable dedicación para buscar respuestas en los genes y en la ciencia, por ofrecer toda su maestría, talento y dedicación para aportar luz en el transcurso de una pandemia llena de oscuridad, por enseñarme a caminar de la mano de la ciencia con su inagotable talento científico para ver siempre un poquito más allá. Por haberme dado la ilusión para seguir trabajando desde el método científico y humano. Por tenderme vuestras manos y vuestro corazón. Por enseñarme a buscar respuestas a preguntas sin respuesta. Por transmitirme vuestro inagotable espíritu e inconformismo científico. Por confiar en mí y darme la oportunidad y la enorme responsabilidad de poder llegar a ser doctora.

“Y, así, fatigado deste pensamiento, abrevió su venteril y limitada cena; la cual acabada, llamó al ventero y, encerrándose con él en la caballeriza, se hincó de rodillas ante él, diciéndole”: al departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada y Centro de Genómica e Investigación Oncológica GENYO, siempre pendiente de los detalles de la investigación rigurosa, especialmente a Verónica Arenas, a Sergio, a Fernando, a Carmen y a tantos investigadores que, con su trabajo incansable, contribuyen a buscar explicaciones para conseguir un mundo mejor.

“La del alba sería [...],no había andado mucho cuando le pareció que a su diestra mano, de la espesura de un bosque que allí estaba salían unas voces delicadas” Al personal sanitario del Hospital Universitario San Cecilio, del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y Distrito Metropolitano Granada por el apoyo prestado en momentos sanitarios tan difíciles, especialmente al personal de enfermería del Servicio de Preventiva, de Urgencias, de UCI, de Medicina Interna en la obtención de muestras y a todos los que me brindaron su apoyo y su colaboración en el desarrollo de este proyecto. Al Doctor Ismael por mostrarme que se podía empezar una tesis en medio de una pandemia.

“Viendo, pues, que, en efeto, no podía menearse, acordó de acogerse a su ordinario remedio, que era pensar en algún paso de su libro”. A todo el profesorado que durante todos estos años me ha acompañado en el camino y especialmente a Dra. D^a Aurora Bueno Cabanillas por contagiarme su pasión por la prevención y la salud pública. Por brindarme aliento durante todos estos años y hacerme creer que podría llegar hasta aquí.

“El cual aún todavía dormía. Pidió las llaves a la sobrina del aposento donde estaban los libros autores del daño, y ella se las dio de muy buena gana” A la Dra.D^a Ana Rivas Velasco por mostrarme la inmensidad del talento científico y humano. A la Dra. D^a Lourdes Rodrigo, a Aurora, a María Jesús y a todos los amigos y amigas que me habéis

acompañado casi cada día en este proyecto, por vuestro apoyo incondicional, por vuestra confianza, por vuestro ilusionante espíritu crítico. Por levantarme cuando me caía, por apuntalar mi corazón cuando se rompía.

“Por acudir a este ruido y estruendo, no se pasó adelante con el escrutinio de los demás libros que quedaban, y así se cree que fueron al fuego, sin ser vistos ni oídos” A mi familia por aguantar mi testarudez.

“En esto, descubrieron treinta o cuarenta molinos de viento que hay en aquel campo”, A los que no creyeron en mis capacidades para llevar a cabo este proyecto; en cada dificultad planteada surgieron nuevas ilusiones

“Causóme esto mucha pesadumbre, porque el gusto de haber leído tan poco se volvía en disgusto de pensar el mal camino que se ofrecía para hallar lo mucho que a mi parecer faltaba de tan sabroso cuento. Parecióme cosa imposible y fuera de toda buena costumbre” Este trabajo ha supuesto una tabla donde poder agarrarse en el abismo de la enfermedad, sin vosotros queridos tutores, queridos amigos, el camino hasta llegar aquí no hubiera sido posible.

“Como las cosas humanas no sean eternas, yendo siempre en declinación de sus principios hasta llegar a su último fin, especialmente las vidas de los hombres”. No existen suficientes palabras de agradecimiento, para todas y cada una de las personas, pacientes y profesionales sanitarios, que respondieron sin dudarlos a nuestra llamada y ofrecieron un poquito de sí mismos para buscar respuestas en medio de la inmensidad del caos, donde urgía buscar respuestas, donde urgía aportar esperanza, donde la ciencia tenía que dar lo mejor de sí misma. Esta tesis no hubiera sido posible sin la aportación altruista e incondicional de pacientes y trabajadores sanitarios que ofrecieron su colaboración y su corazón. Gracias.

“Recordar es fácil para quien tiene memoria,
Olvidar es difícil para quien tiene corazón”.

Gabriel García Márquez

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL

ARN: Ácido Ribonucleico.

ACE: Enzima convertidora de angiotensina.

ACE2: Receptor celular la enzima convertidora de angiotensina 2.

ARNsg: AR subgenómico.

CAS: Búfer de adquisición de células.

CEI: Comité Ético de Investigación.

CST: Tampón de tinción celular.

C-Mo: Monocitos clásicos.

COVID-19: Enfermedad por coronavirus COVID 19.

CyTOF: Cytometry by time of flight, citometría de masas que cuantifica marcadores de superficie celular

DMV: Vesículas de doble membrana inducidas por virus.

DC: Células dendríticas.

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control.

EDTA: Anticoagulante del ácido etilendiaminotetraacético.

FIO₂: Fracción Inspirada de Oxígeno.

HCoV: Coronavirus humanos.

IL-6: interleucina-6.

IC: Intervalo de confianza.

IgM: Prueba de anticuerpos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: Marcos de lectura abiertos.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio.

NSPS: Proteínas no estructurales complejas de replicasa individuales.

Nt: Nucleótidos.

NK: Células Natural Killer.

MAF: Frecuencia de alelo menor.

MX1: MX Dynamin como GTPasa 1.

NC-Mo: Monocitos no clásicos.

MERS-CoV: Síndrome respiratorio de Oriente Medio.

MIS-C: Síndrome de inflamación multisistémica.

PaO₂: Presión parcial de oxígeno.

PaO₂/FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCT: Procalcitonina.

pDC: Células dendríticas plasmocitoides.

PFA: Paraformaldehído.

RdRp: Polimerasa de ARN dependiente de ARN.

RB: Receptor de glicoproteína de la superficie de la espiga.

TCR: *Gen del* receptor de los linfocitos T.

TMPRSS2: Proteasa transmembrana serina 2.

T-Mo: Monocitos transicionales.

RBD: Receptor de glicoproteína de la superficie de la espiga.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

R₀: Número básico de reproducción.

RT: Temperatura ambiente.

S proteína: de Spike, pico de SARS-CoV-2.

SpO₂: Saturación de oxígeno periférico.

SARS-CoV-1: Virus coronavirus SARS Cov-1.

SARS-CoV-2: Virus Coronavirus SARS Cov-2.

SDRA: Síndrome Distrés Respiratorio Agudo.

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido.

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

VSG: Tasa de sedimentación globular.

VOC: Variantes preocupantes.

VOI: Variantes de interés.

RESUMEN

Resumen

La aparición del síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus (SARS-Cov-2), el brote de la enfermedad por COVID-19 y la posterior declaración de pandemia representaron el mayor reto infeccioso mundial en décadas, planteando grandes desafíos diagnósticos y terapéuticos. La interacción del SARS-CoV-2 con el sistema inmunológico y la posterior disfuncionalidad inmunitaria, son esenciales para la progresión de la enfermedad. Entre los aspectos de la desregulación inmune, la linfopenia es el más reconocido, con células T CD4+ y CD8+ significativamente reducidas. El SARS-Cov-2, que pertenece a la misma familia de beta-coronavirus que el SARS-CoV y el MERS-CoV, invade las células humanas uniéndose sus proteínas S a una proteína transmembrana del huésped llamada ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) con varios cofactores. La susceptibilidad a la COVID-19 y la gravedad de la enfermedad se han asociado con marcadores inflamatorios y polimorfismos genéticos de los genes *ACE* y *ACE2*, pero la evidencia no ha sido concluyente. Las células T patógenas y los monocitos inflamatorios se consideran los impulsores centrales de la tormenta de citoquinas asociada con la gravedad. COVID-19 puso de manifiesto la necesidad de estratificar pacientes con biomarcadores rápidos y efectivos ya que no existe ningún biomarcador que pueda anticipar qué pacientes desarrollarán una etapa agresiva.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es caracterizar nuevos marcadores de agresividad mediante citometría de masa unicelular (CyTOF) para la clasificación de pacientes con COVID-19. Mediante un panel de 15 parámetros (kit de panel de fenotipado de monocitos/macrófagos humanos Maxpar®). La citometría mediante panel de espectrometría de masas (CyTOF) se realizó en combinación con el análisis genético de las variantes *ACE2* (rs2285666), *MX1* (rs469390) y *TMPRSS2* (rs2070788).

Estos estudios pusieron de manifiesto que la frecuencia de la población CD163+/CD206- de monocitos transicionales (T-Mo) disminuyó en el grupo leve en comparación con el grave, mientras que los T-Mo CD163-/CD206- aumentaron en el grupo leve en comparación con el grave. Se encontraron diferencias en la expresión de CD11b en monocitos CD14dim en el grupo grave, con niveles disminuidos en el grupo femenino. Al comparar la enfermedad leve y grave, se encontró que los monocitos CD45 y CD14dim/CD33+ fueron las mejores opciones como biomarcadores para discriminar pacientes graves a la vez que se describe el CD33 como un buen biomarcador para la

estratificación de pacientes. Entre los marcadores genéticos, se ha encontrado que los portadores G de *TMPRSS2* (rs2070788) tienen un mayor riesgo de COVID-19 grave en comparación con aquellos con genotipo A/A. Esta fuerza aumenta cuando se combina con CD45-, T-Mo CD163+/CD206- y C14dim/CD33+. Con todo esto podemos concluir que, *TMPRSS2*, CD45-, CD163/CD206 y CD33 pueden considerarse biomarcadores para la agresividad de COVID-19. Este hallazgo se ve reforzado para los biomarcadores de agresividad cuando se combinan *TMPRSS2* y CD14dim/CD33+.

Palabras clave: Biomarcadores, Genotipado, Citometría de masas y medicina de precisión, COVID-19.

Abstract

The emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus (*SARS-Cov-2*), the outbreak of COVID-19 disease and the subsequent declaration of a pandemic represented the greatest global infectious challenge in decades, posing great diagnostic and therapeutic challenges. The interaction of SARS-CoV-2 with the immune system and subsequent immune dysfunction are essential for the progression of the disease. Among aspects of immune dysregulation, lymphopenia is the most recognized, with CD4+ and CD8+ T cells significantly reduced. *SARS-Cov-2*, which belongs to the same beta-coronavirus family as *SARS-CoV* and *MERS-CoV*, invades human cells by binding its S proteins to a host transmembrane protein called ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) with several cofactors. Susceptibility to COVID-19 and disease severity have been associated with inflammatory markers and genetic polymorphisms of the *ACE* and *ACE2* genes, but the evidence has been inconclusive. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes are considered the central drivers of the severity-associated cytokine storm. COVID-19 highlighted the need to stratify patients with rapid and effective biomarkers since there is no biomarker that anticipates which of these patients will develop an aggressive stage.

The main objective of this doctoral thesis is to include new severity markers using single-cell mass cytometry (CyTOF) for the classification of patients with COVID-19. Mass cytometry panel was performed in combination with genetic analysis for the *ACE2*

(rs2285666), *MX1* (rs469390), and *TMPRSS2* (rs2070788) variants. The results showed that frequency of the CD163+/CD206- population of transitional monocytes (T-Mo) decreased in the mild group compared to the severe group, while T-Mo CD163-/CD206- increased in the mild group compared to the severe group. Differences in CD11b expression on CD14dim monocytes were found in the severe group, with decreased levels in the female group. When comparing mild and severe disease, it was found that CD45 and CD14dim/CD33+ monocytes were the best options as biomarkers to discriminate severe patients while CD33 was described as a good biomarker for patient stratification. Among genetic markers, *TMPRSS2* (rs2070788) G carriers have been found to have a higher risk of severe COVID-19 compared to those with A/A genotype. This strength increases when combined with CD45-, T-Mo CD163+/CD206- and CD14dim/CD33+. In conclusion, we can observe that: *TMPRSS2*, CD45-, CD163/CD206 and CD33 can be considered biomarkers for COVID-19 aggressiveness. This finding is reinforced for biomarkers of aggression when *TMPRSS2* and CD14dim/CD33+ are combined.

Keywords: Biomarkers, genotyping, mass cytometry, precision medicine, COVID-19.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
ÍNDICE	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN POR CORONAVIRUS Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL HUÉSPED SUSCEPTIBLE	8
1.1.1 Características generales de los coronavirus	8
1.1.2 Características del SARS-CoV-2.....	10
1.1.2.1 Mecanismo de Entrada del SARS-CoV-2 en la célula	11
1.1.2.2 Patogenia de la infección por SARS-CoV-2.....	13
1.1.2.3 Tropismo tisular del SARS-CoV-2.....	15
1.1.2.4 Transmisión del SARS-CoV-2.....	17
1.1.3 Epidemiología de la infección por SARS-CoV-2 y evolución de la pandemia por COVID-19.....	20
1.1.4 Presentación clínica de COVID-19	22
1.1.5 Respuesta inmune e inflamación en la infección por SARS-Cov2	26
1.1.6 La cascada coagulativa y la inflamación creciente	26
1.1.7 Linfocitopenia	27
1.2. Biomarcadores en la infección por COVID-19.....	29
1.2.1 Definición.....	29
1.2.2 Uso de marcadores en la práctica clínica	31
1.2.3 Evolución temporal de biomarcadores en COVID-19	31
1.2.4 Uso de marcadores moleculares en clínica	32
1.3. Enfoque traslacional y Ultracaracterización de linfocitos	35
2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	40
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	43
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	43

4. MATERIAL Y MÉTODOS	46
4.1 Diseño del estudio.....	46
4.2 Población de estudio.....	46
4.2.1 Criterios de inclusión	52
4.2.2 Criterios de exclusión	52
4.2.3 Reclutamiento.....	52
4.3 Recolección de datos.....	54
4.4 Análisis de datos	55
4.4.1 Pacientes.....	55
4.4.2 Análisis de citometría	56
4.4.2.1 Procesamiento de muestras de sangre total.....	56
4.4.2.2 Adquisición de datos	56
4.4.3 Análisis de datos	57
4.4.4 Análisis genético.....	58
4.4.5 Análisis estadístico	59
5. RESULTADOS	62
5.1 Análisis de citometría	62
5.1.1. Descripción general de la población.....	62
5.1.2. Comparaciones de grupos de pacientes graves <i>versus</i> leves.....	65
5.1.3. Comparaciones de edad.....	66
5.1.4. Comparaciones de género	68
5.2 Análisis genético	70
6. DISCUSIÓN.....	74
6.1 Variantes genéticas y características celulares que se asocian con grupos riesgo de COVID-19 e identificación de marcadores genéticos, tipo SNP y celulares mediante citometría de masas que ayudan a la descripción fenotípica de COVID-19.	74
6.2 Biomarcadores para desarrollar un algoritmo de decisión que contemple las variables clínicas, celulares y genéticas con la mala respuesta y agresividad de COVID-19.	81
7. CONCLUSIONES	86
8. COMENTARIOS FINALES	89

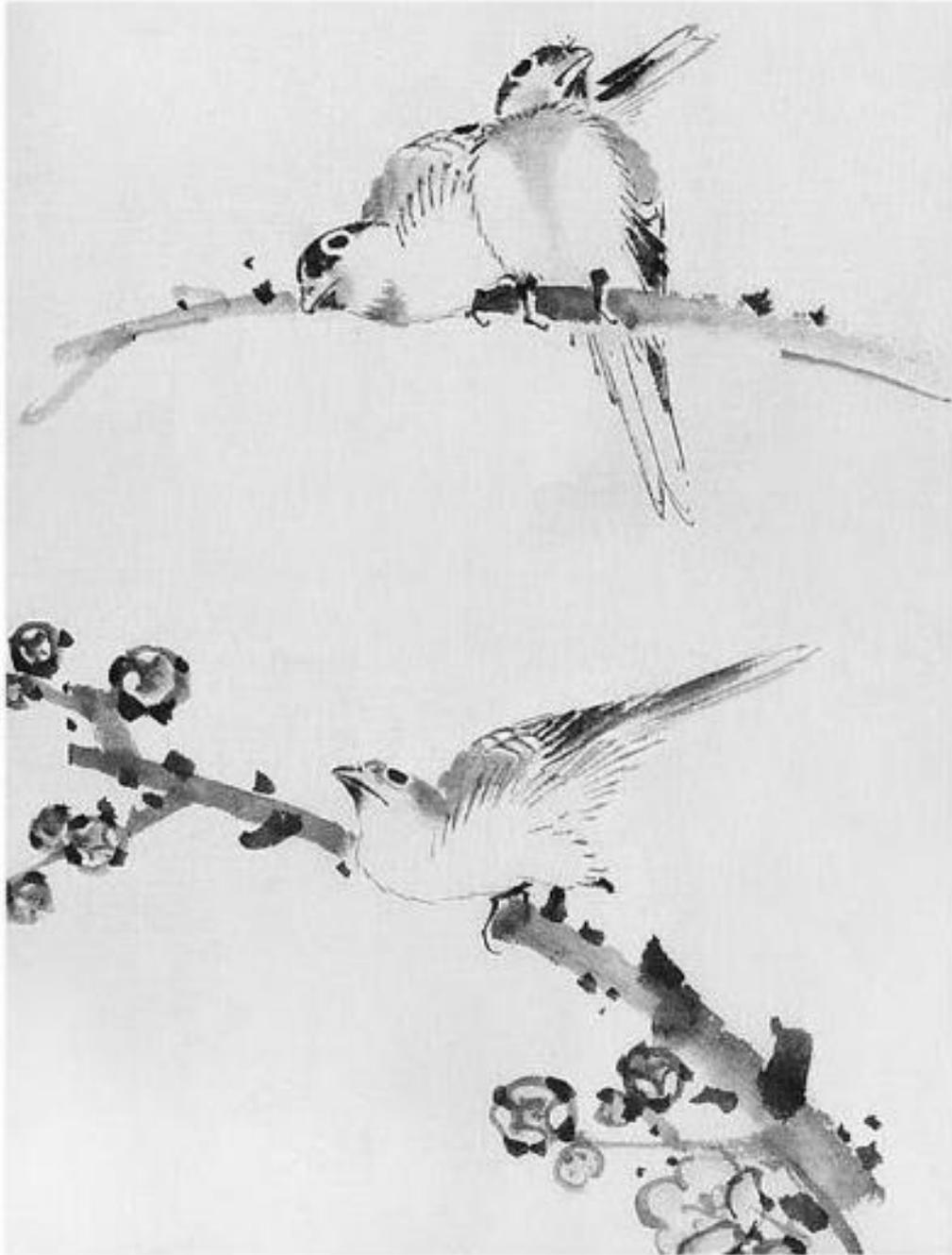
8.1 Publicaciones asociadas a la Tesis.....	89
8.2 Líneas futuras de investigación.....	90
Agradecimientos	91
9. REFERENCIAS	96
10. ANEXOS.....	111
ANEXO I. DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÉ DE ÉTICA PROVINCIAL	111
ANEXO II. DOCUMENTO DE AUTORIZACIÓN DE ACCESO A DATOS	112
ANEXO III. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PACIENTES.....	113
ANEXO IV. CONSENTIMIENTO INFORMADO	115

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. El ciclo de vida del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)	8
Figura 2 Clasificación de los coronavirus. Esquema de la estructura del SARS-CoV	10
Figura 3 Huésped intermedio del Coronavirus.	13
Figura 4 Síntomas clínicos de la Enfermedad Infecciosa por Coronavirus 2019.	17
Figura 5 Datos COVID-19 en tiempo real https://covid19.who.int/more-resources	20
Figura 6 Factores asociados con la admisión en el hospital de pacientes críticos.	22
Figura 7 CD45 representado por el algoritmo de Cen-se´ con el software GemStone™.	54
Figura 8 Comparaciones de monocitos de transición CD163+/CD206.....	55
Figura 9 Análisis de citometría mediante comparaciones de edad.....	57
Figura 10 Comparaciones de grupos leves entre hombres y mujeres en análisis de citometría.....	58
Figura 11 Gráficos de FlowSOM a partir del análisis de monocitos en pacientes leves.	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Lista de biomarcadores en COVID-19 clasificados según órgano/sistema involucrado	28
Tabla 2 Lista de biomarcadores en COVID-19 clasificados según evolución temporal.	31
Tabla 3 Características descriptivas de las muestras.....	40
Tabla 4 Características descriptivas de las muestras.....	43
Tabla 5 Información de Anticuerpos	49
Tabla 6 Análisis de variables de citometría en las principales poblaciones de células de sangre periférica.	53
Tabla 7 Comparaciones de agresividad genética y COVID-19.....	60
Tabla 8 TMPRSS2 y comparaciones de citometría en la agresividad de COVID-19.....	61



I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2), el brote de la enfermedad por covid-19 (COVID-19) y la posterior declaración de pandemia representan el mayor desafío infeccioso mundial en décadas y continúa planteando desafíos diagnósticos y terapéuticos. La pandemia de la COVID-19 ha puesto de manifiesto la necesidad en la estratificación de los pacientes, precisando biomarcadores rápidos y efectivos que permitan una gradación de esta patología desde el inicio; lo que sin duda hubiera reducido el número de ingresos y de muertes por esta causa. Los pacientes con COVID-19 experimentan diferentes manifestaciones de la enfermedad desde infección asintomática, neumonía de diversa gravedad, hasta el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y sepsis con insuficiencia multiorgánica y muerte. El control primario de la infección viral requiere una respuesta inmune compleja y multifocal. La interacción del SARS-CoV-2 con el sistema inmunológico y la posterior contribución de respuestas inmunitarias disfuncionales son esenciales para la progresión de la enfermedad. Entre los aspectos de la desregulación inmune, el más reconocido es la linfopenia (células T CD4+ y CD8+ reducidas significativamente). El SARS-Cov-2, que pertenece a la misma familia de beta-coronavirus que el SARS-CoV y el MERS-CoV, invade las células humanas uniendo sus proteínas S a una proteína transmembrana del huésped llamada ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) con varios cofactores. La susceptibilidad a la COVID-19 y la gravedad de la enfermedad se han asociado con marcadores inflamatorios y polimorfismos genéticos de los genes *ACE* /*ACE2*, pero la evidencia no ha sido concluyente. Las células T patógenas y los monocitos inflamatorios se consideran los impulsores centrales de la tormenta de citoquinas asociado con la gravedad del COVID-19. Algunos parámetros de laboratorio como la proporción de neutrófilos a linfocitos, proteína C reactiva (PCR), interleucina (IL) -6 y niveles de dímero D, son indicadores de la gravedad de COVID-19 cuando se asocian a características clínicas de la infección. Actualmente no existe ningún biomarcador que permita predecir los pacientes que desarrollarán una etapa agresiva en la que podríamos mejorar la gestión sanitaria y su calidad de vida. El principal objetivo de esta tesis es incluir nuevos marcadores mediante citometría de masas (CyTOF) que permitan la clasificación de pacientes con COVID-19 atendiendo a su agresividad.

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN POR CORONAVIRUS Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL HUÉSPED SUSCEPTIBLE

1.1.1 Características generales de los coronavirus

Tras la aparición de pacientes con neumonías de origen desconocido y evolución tórpida en Wuhan, China, en diciembre de 2019 se identifica como agente causal un nuevo coronavirus nombrado inicialmente como nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1,2). Este virus desencadenó una alerta de emergencia sanitaria mundial y se extendió a 46 países el 27 de febrero de 2020 creando una situación de pandemia mundial creando una emergencia sanitaria a nivel mundial dada su rápida propagación.

El 11 de febrero de 2020, la OMS renombra esta nueva neumonía como “enfermedad por coronavirus 2019” COVID-19 y Grupo de Estudio de Coronavirus del Comité Internacional de Taxonomía de Virus lo renombra como SARS-CoV-2 por la similitud filogenética con el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) dentro del género Betacoronavirus (3). Los CoV de la familia Coronaviridae son virus envueltos de ARN monocatenario de sentido positivo. Todos los CoV altamente patógenos, incluido el SARS-CoV-2, pertenecen al grupo 2 del género Betacoronavirus (4).

El SARS-CoV-2 como miembro de la familia de coronavirus es el séptimo que infecta a los seres humanos y al igual que el SARS-CoV y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), es responsable de la infección de las vías respiratorias inferiores y puede causar síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Otros coronavirus humanos conocidos (HCoV 229E, NL63, OC43 y HKU1) son responsables de infecciones de las vías respiratorias superiores y resfriado común (5).

Diferentes grupos de investigación obtuvieron, de personas infectadas que habían tenido relación epidemiológica con el mercado de animales salvajes en Wuhan considerado el epicentro del origen de la pandemia, secuencias genómicas completas del SARS-CoV-2 a través de la secuenciación de próxima generación (1,5,6). Todas las secuencias del genoma viral obtenidas de este coronavirus mostraron similitud en más del 99,98% de la secuencia, variando la longitud genómica total de 29.891 a 29.903 nucleótidos (nt). A nivel de genoma completo el SARS-CoV-2 es 96.2% similar, al genoma de coronavirus

de murciélago RaTG13 recolectado en la provincia de Yunnan, China, y 88% idéntico a dos coronavirus similares al SARS derivados de murciélagos, bat-SL-CoVZC45 y bat-SL-CoVZXC21, recolectados en 2018 en Zhoushan, al este de China (1,5,6).

Esta estrecha relación filogenética con RaTG13 sugiere que los murciélagos probablemente son huéspedes naturales del SARS-CoV-2. Se encontraron ocho mutaciones en la glicoproteína de la superficie del pico de las que especialmente tres (D³⁵⁴, Y³⁶⁴ y F³⁶⁷), ubicadas en el dominio de unión al receptor de glicoproteína de la superficie de la espiga (RBD), sugerían que el SARS-CoV-2 podría evolucionar rápidamente evadiendo la respuesta inmune para adaptarse a otros huéspedes futuros.

El SARS-CoV-2, comparte una identidad de secuencia del 79% nt con el SARS-CoV y alrededor del 50% con el MERS-CoV (1) (6) y el modelado de homología reveló que el SARS-CoV-2 tenía una estructura RBD similar a la del SARS-CoV (6). Su genoma comprende 14 marcos de lectura abiertos (ORF), de los que dos tercios codifican 16 proteínas no estructurales (nsp 1–16) que forman el complejo replicasa (7). Nueve proteínas accesorias (ORF) y cuatro proteínas estructurales: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N), están codificadas por el tercio restante, de las cuales (S) media la entrada del SARS-CoV en las células huésped (7).

1.1.2 Características del SARS-CoV-2

Los siete dominios de replicasa conservados en ORF1 (utilizado para la clasificación de especies de CoV) de SARS-CoV-2 son 94,6% idénticos a SARS-CoV, lo que implica que los dos pertenecen a la misma especie (1). El gen de la espícula (S) de la proteína de unión al receptor del SARS-CoV-2 es muy variable y diverge mucho con todos los SARS-CoV descritos anteriormente con menos del 75% de identidad de secuencia nt, excepto una identidad de 93,1% nt con RaTG13. La proteína (S) tiene un dominio de unión al receptor (RBD) que media el contacto directo con un receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y un sitio de escisión polibásica S1/S2 que se escinde proteolíticamente por la cathepsina L celular y la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) (8), ver detalles en la Figura 1.

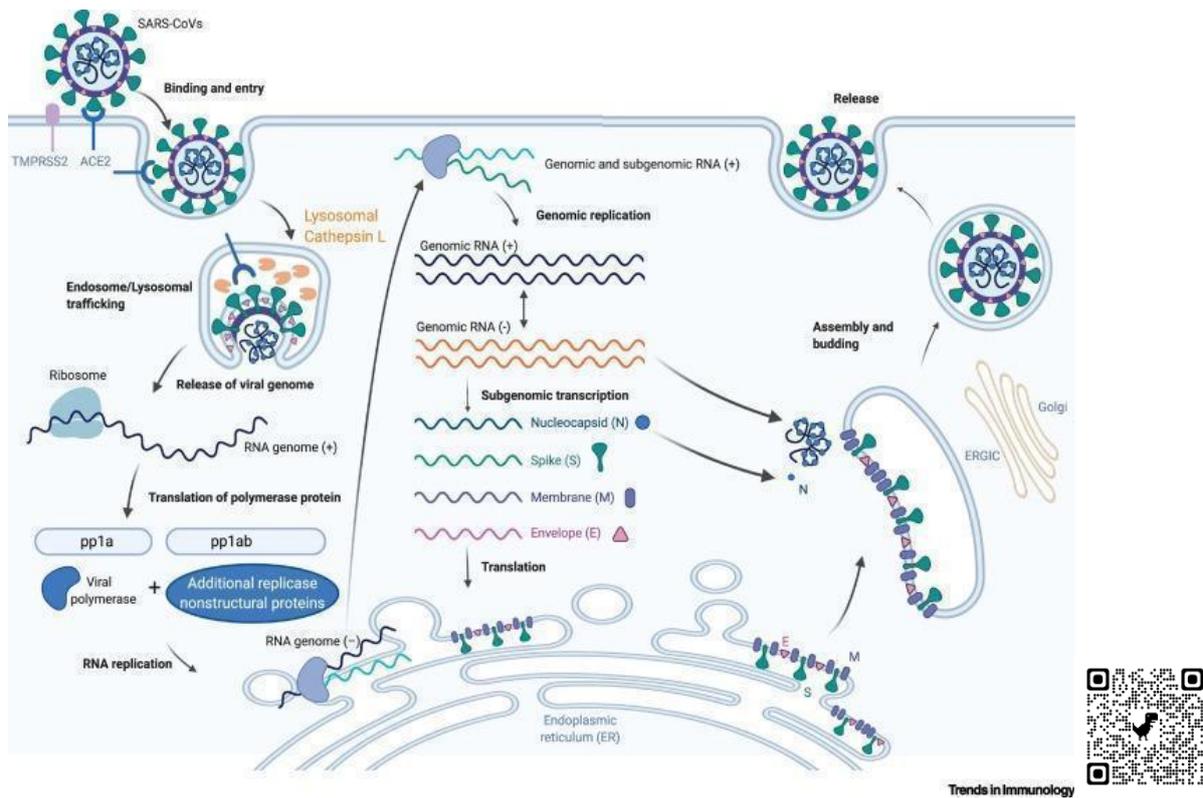


Figura 1: El ciclo de vida del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)

<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1471490620302337-gr1.jpg>



Trends in Immunology

1.1.2.1 Mecanismo de Entrada del SARS-CoV-2 en la célula

Conocer la vía de entrada del virus a las células huésped supuso un enorme desafío desde el inicio de la pandemia. Se ha puesto mucho énfasis en la serina proteasa transmembrana 2 (10). TMPRSS2 facilita la entrada viral en la superficie de la membrana plasmática, y la catepsina L activa el SARS-CoV-2 Spike en los endosomas y puede compensar la entrada en las células que carecen de TMPRSS2 (8) (Figura 1). El genoma se libera en el citosol del huésped, ORF1a y ORF1b y se generan proteínas replicasas virales, que se escinden en nsps individuales (a través de proteasas virales y del huésped: PLpro); estos forman la ARN polimerasa dependiente de ARN (nsp12 derivada de ORF1b (8)).

Los componentes de la replicasa reorganizan el retículo endoplásmico (RE) en vesículas de doble membrana (DMV) que facilitan la replicación viral de los ARN genómicos y subgenómicos (sgRNA); que se traducen en proteínas estructurales virales y accesorias que facilitan la formación de partículas virales (11) (Figura 1). Existen estudios que muestran que el SARS-CoV-2 usa el mismo receptor de entrada celular ACE2, que el SARS-CoV, a diferencia del CD26 que el MERS-CoV (5). El análisis estructural por microscopía crioelectrónica reveló que la proteína del SARS-CoV-2 se une a ACE2 con una afinidad de 10 a 20 veces mayor que el SARS-CoV (12), sugiriendo que el SARS-CoV-2 puede ser más infeccioso para los humanos que el SARS-1 (13).

Una proteasa codificada por virus en proteínas no estructurales complejas de replicasa individuales (nsps) (incluida la polimerasa de ARN dependiente de ARN: RdRp) escinde las poliproteínas (pp1a y pp1b) Ver figura 2 B. La replicación empieza en vesículas de doble membrana inducidas por virus (DMV) derivadas del retículo endoplásmico (ER), que finalmente se integran para formar redes elaboradas de membranas contorneadas. El genoma de cadena positiva entrante sirve como plantilla para ARN de cadena negativa de longitud completa y ARN subgenómico (sg). La traducción de sgRNA da como resultado proteínas estructurales y proteínas accesorias (denominadas N, S, M y E) que se insertan en el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) para el ensamblaje del virión (Figura 2 C). Los genomas de ARN de sentido positivo posteriores se incorporan a los viriones recién sintetizados, que se secretan de la membrana plasmática (6,7,11,14).

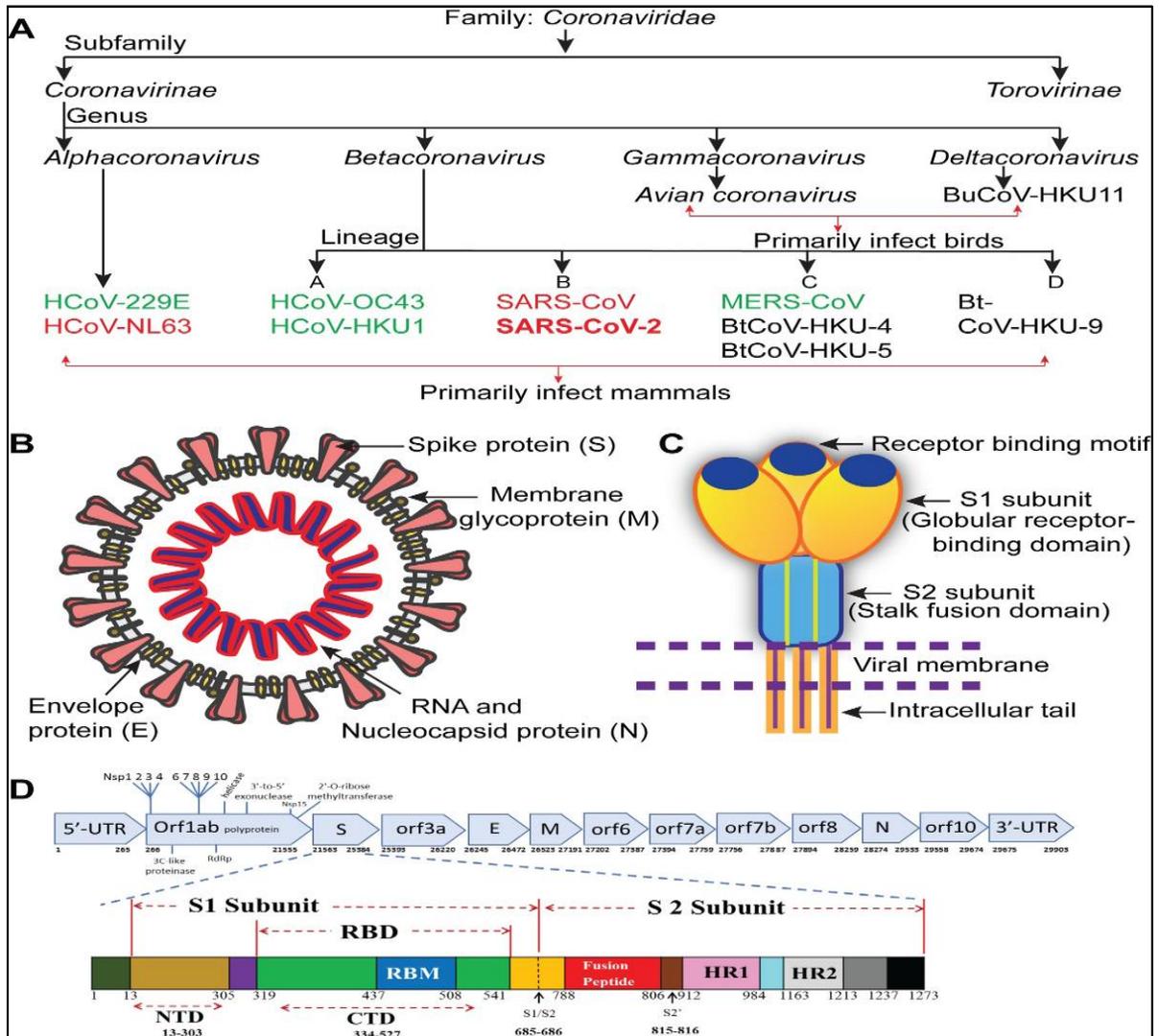


Figura 2 Clasificación de los coronavirus. Esquema de la estructura del SARS-CoV

Ilustración adaptada de "Desiree Ho, Innovative Genomics Institute Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V (2020) COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. PLoS Pathog 16(8)e1008762. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008762>. Los 7 HCoV conocidos se muestran en verde y rojo. Los HCoV en rojo se unen al receptor ACE2 del huésped (B)

1.1.2.2 Patogenia de la infección por SARS-CoV-2

En 2019, SARS-CoV-2 emerge como nuevo patógeno que origina la pandemia COVID-19 (15). El brote de del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) de hace más de una década, puso en alerta a la comunidad científica de una gran cantidad de coronavirus relacionados con el SARS (SARS-CoVs) que habían sido descubiertos en murciélagos como su reservorio natural (1).

Tradicionalmente los coronavirus humanos (HCoV) habían sido considerados como gérmenes patógenos intrascendentes que originaban cuadros clínicos de tipo catarral en el tracto aéreo superior en personas sanas. Los HCoV se pueden clasificar como de baja patogenicidad y altamente patógenos. Los HCoV de baja patogenicidad infectan al tracto respiratorio superior provocando enfermedades respiratorias leves y son responsables de aproximadamente el 30% de los cuadros respiratorios de nariz y garganta denominados resfriados comunes. De ellos cuatro coronavirus (HCoV 229E, NL63, OC43 y HKU1) permanecen endémicos en el mundo y representan entre el 10% y el 30% de las infecciones de vías aéreas respiratorias superiores en adultos (16). Por el contrario, los HCoV altamente patógenos como el SARS-CoV-1, el SARS-CoV-2 y el MERS-CoV infectan las vías respiratorias inferiores y pueden causar neumonías graves con resultado de fallecimiento. Desde el inicio de este siglo, los tres HCoV han originado patología clínica con alta morbimortalidad que se han traducido en epidemias como las originadas por el coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV), y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y la última pandemia originada por otro HCoV hoy conocido como SARS-Cov2. La gravedad tiene origen multifactorial y se debe a factores como una replicación viral rápida, infiltración masiva de células inflamatorias, y en algunos casos respuesta de citoquinas proinflamatorias que originan una lesión pulmonar aguda y SDRA (17). Tal y como se ha expuesto anteriormente, hasta ahora se sabe que los coronavirus tienen una amplia y diversa distribución ecológica y que la mayor variedad se encuentra en murciélagos. Los murciélagos son el reservorio de muchos de estos virus, pero también se han encontrado otros mamíferos domésticos y peridomésticos como huéspedes intermedios. Esta característica facilita la recombinación entre especies y con ello las mutaciones, la diversidad genética y la expansión de estos virus (18). La unión de estos virus a los receptores de las células del huésped se hace a través de la glicoproteína Spike de

superficie (S); siendo su papel fundamental y representando un determinante clave en restricción del rango del huésped (13).

Tanto el SARS-CoV-1 y el MERS-CoV son patógenos zoonóticos que pueden causar enfermedades respiratorias graves en los seres humanos y evolucionar a SDRA (19). El SARS-CoV-1 fue el origen de una epidemia de enfermedad respiratoria aguda grave en China entre los años 2001 y 2003 que se extendió a 29 países y regiones con más de 8000 casos y al menos 774 muertes contabilizadas, con un índice de mortalidad de cercano al 10% (20). El MERS-CoV fue aislado por primera vez en Oriente Medio en 2012 (20) originando durante los primeros tres años de la epidemia más de 1500 casos y al menos 568 fallecimientos (21). El dromedario está descrito como el reservorio del MERS-CoV (19) (Figura 3); la ubicuidad de estos animales infectados cerca de los seres humanos y la continua transmisión zoonótica podrían explicar por qué el MERS-CoV sigue causando infecciones en humanos, mientras que el SARS-CoV-1, no ha causado más infecciones en los seres humanos, al no producirse la presencia persistente de un huésped intermedio infectado y al ser relativamente infrecuentes las interacciones humano-murciélagos (22).

En relación con el huésped intermedio del SARS-CoV-2, continúa sin ser definido actualmente (23). El huésped intermedio, además de ser el puente que une la población susceptible y el origen natural, también supone el lugar donde el SARS-CoV-2 evoluciona gradualmente y se replica. Reconocer al huésped intermedio es importante para cortar la cadena de transmisión (24). Se ha demostrado que las cepas de SARS-CoV-2 tienen una similitud relativamente alta con pangolin-nCoV, solo secundaria a bat-nCoV, por lo que se consideró al pangolín como candidato altamente sospechoso de ser hospedador intermedio del SARS-CoV-2 (Figura 3). No se deben ignorar otros animales salvajes como serpientes, visones y tortugas porque también se encuentran en los mercados de vida silvestre y presentan un alto riesgo de infección (23,25,26).

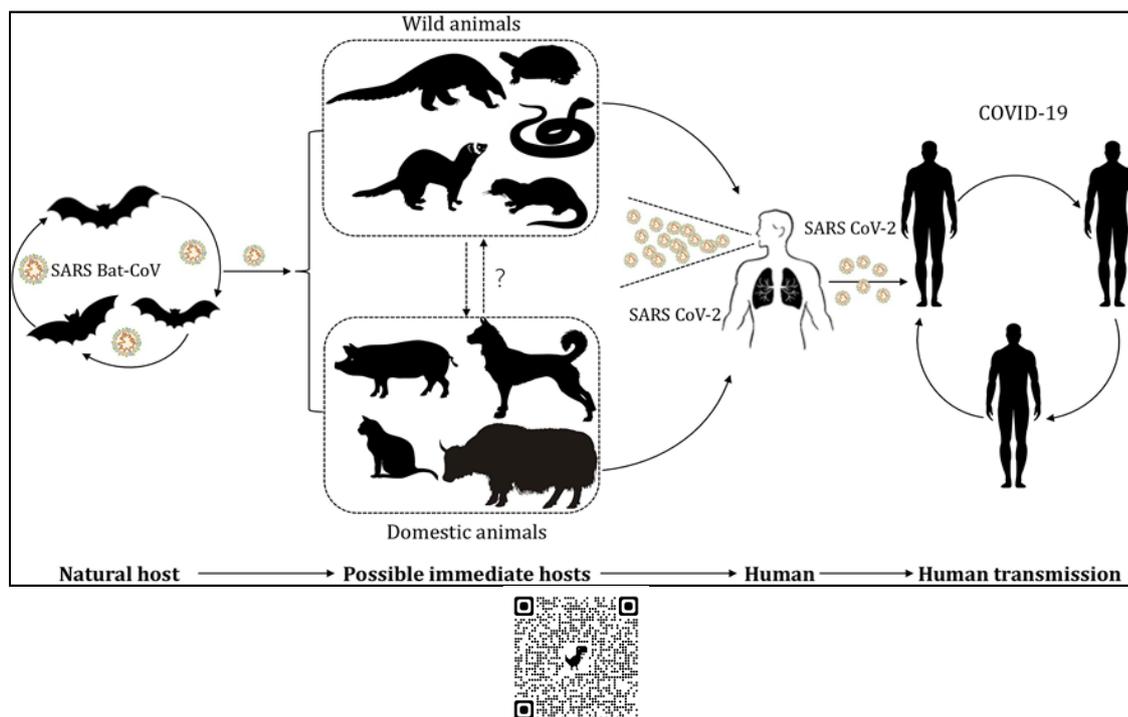


Figura 3 Huésped intermedio del Coronavirus.

En: Zhao J, Cui W and Tian B-p (2020) The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. *Front. Microbiol.* 11:580137. doi: 10.3389/fmicb.2020.580137

1.1.2.3 Tropismo tisular del SARS-CoV-2

Una vez que el SARS-CoV ingresa al huésped a través del tracto respiratorio, sus primeros objetivos de entrada viral son las vías respiratorias y las células epiteliales alveolares, las células endoteliales vasculares y los macrófagos alveolares (27,28). Estas células son probablemente el punto de partida para la infección temprana y la posterior replicación debido a su expresión de ACE2 (15). La susceptibilidad y permisividad de una célula huésped específica son determinantes para el tropismo viral. Desde el inicio se objetiva que la infección por SARS-Cov2 producía patología respiratoria que progresaban a neumonía grave, sugiriendo el pulmón como el tropismo primario del SARS-CoV-2 (29); posteriormente se encontró que SARS- CoV-1 y SARS- Cov-2 se unen al mismo receptor de entrada, el ACE2.

Las mutaciones clave en el RBD del SARS-CoV-2 Spike hacen contactos cercanos adicionales con ACE2, correlacionando con una mayor afinidad de unión y quizás una

mayor infectividad (30,31). Desde su aparición, se han detectado múltiples variantes del SARS-CoV-2; las que muestran una alta infectividad se clasifican como variantes de preocupación según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos. Varios estudios investigan la causa que hace que cada variante sea más contagiosa en términos de interacciones RBD y ACE2 (32).

El RBD de la variante Alpha (N501Y) requiere la mayor cantidad de fuerza inicialmente para separarse de ACE debido a la mutación N501Y además del papel de N90-glicano, seguido por Beta/Gamma (K417N/T, E484 K y N501Y) o variantes Delta (L452R y T478 K). Entre todas las variantes investigadas, el RBD de la variante Epsilon (L452R) se separa con relativa facilidad de ACE2 (32). El SARS-CoV-2 aislado inicialmente tenía una mutación D614G que no tenía de su presunto ancestro común, lo que lo convertía en más infeccioso, probablemente gracias a una mayor eficiencia de transmisión de persona a persona (4,33–35). La variante D614G no se relacionaba con la gravedad de la enfermedad, pese a que se asociaba con un aumento de la carga viral en el tracto respiratorio superior de pacientes con COVID-19, lo que sugiere que la patogénesis de COVID-19 grave está relacionada con otros mecanismos además de la infectividad del SARS-CoV-2 (36).

Aunque el ARNm de *ACE2* se ha detectado en biopsias pulmonares humanas y de muchos mamíferos (murciélagos, hurones, gatos, perros, etc.), su expresión es bastante baja en comparación con los tejidos extrapulmonares (37) lo que hace pensar que la permisividad de estas células al SARS-CoV pueda depender de otros factores intrínsecos celulares añadidos que condicionan una infección más eficiente como los que se describen a continuación:

- La expresión de *TMPRSS2* (38,39) de la que depende la entrada viral, debido a que cantidades casi indetectables de *ACE2* facilitan la entrada de SARS-CoV si está presente *TMPRSS2* (40,41).
- La expresión de ARNm es mayor en una pequeña población de células alveolares humanas tipo II con abundante *ACE2*, que en las células deficientes en *ACE2* (42). EL SARS-CoV-2 secuestra pequeñas poblaciones de células alveolares tipo II que expresan *ACE2* de manera alta y otros genes provirales para su replicación más productiva (42) (39).
- El pulmón, que como tropismo principal del SARS-CoVs, puede depender de la regulación de *ACE2* a nivel transcripcional y proteico (37,43).

En comparación con otros SARS-CoV, SARS-CoV-2 Spike contiene una inserción única de RRAR en el sitio de escisión S1/S2 (44). Este sitio puede ser pre-escindido por la furina, reduciendo así la dependencia del SARS-CoV-2 de las proteasas de células diana (TMPRSS2/catepsina L) para la entrada (45) y extendiendo su tropismo celular, ya que la furina proteolíticamente activa se expresa abundantemente en las células epiteliales bronquiales humanas (46). Una de las distinciones entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 es la capacidad de este último para infectar eficientemente el tracto respiratorio superior, como los tejidos nasofaríngeos y orofaríngeos, posiblemente debido a su mayor afinidad por ACE2, que se expresa en los tejidos nasales y orales humanos (47). Los títulos fácilmente detectables de SARS-CoV-2 en el moco de pacientes del tracto respiratorio superior con COVID-19 durante períodos prodrómicos podrían ayudar a explicar la transmisibilidad más rápida y efectiva del SARS-CoV-2 en relación con el SARS-CoV (48). Los CoV humanos también pueden cursar infecciones entéricas, con grados variables de patogenicidad (35,49). De hecho, *ACE2* y *TMPRSS2* se expresan abundantemente dentro del tracto intestinal humano y de muchos otros mamíferos, específicamente el borde en cepillo de los enterocitos intestinales (38,39,50,51).

1.1.2.4 Transmisión del SARS-CoV-2

Para explicar el mecanismo de transmisión del SARS-CoV-2, se propusieron varios modelos incluidos los aerosoles, la contaminación superficial y la ruta feco-oral, que representaron factores de confusión inicial en la pandemia de COVID-19. La aparición de los primeros pacientes con tos, opacidades pulmonares y progresión de los síntomas a neumonía grave sugirió desde el principio la transmisibilidad del SARS-CoV-2 por vía respiratoria, así el modo principal de transmisión del SARS-CoV-2 es de persona a persona a través de las gotitas respiratorias de Flügge producidas durante la exhalación (35). La transmisión directa por gotitas respiratorias se ve reforzada por la replicación productiva del SARS-CoV-2 tanto en tracto respiratorio superior como en el tracto respiratorio inferior y el creciente número de propagación de persona a persona entre contactos cercanos que exhiben tos activa. También hay evidencia que el virus se transmite a través de partículas virales en aerosol producidas por personas con la enfermedad COVID-19 (52,53).

La carga viral juega un papel importante en la transmisibilidad viral y en el momento del inicio de la enfermedad y tiene particular importancia en la transmisión secundaria; alcanzando su punto máximo alrededor de la semana y disminuyendo más tarde. En casos de COVID-19 grave, la carga viral alcanza su punto máximo mucho más tarde, generalmente durante la segunda semana, aumentando en estos casos el período de infecciosidad (54,55). Algunos estudios concluyen que el ARN viral del SARS-Cov-2, estaba presente en casi dos tercios de las muestras de aire de las habitaciones de pacientes con COVID-19 (56), pero hasta el momento no existen pruebas suficientes para afirmar que en estas partículas exista un virus viable que pueda ser transmisible (56). La contagiosidad del SARS-CoV-2 a través de fómites como manivelas de puertas, se sigue investigando, pero en general, la transmisibilidad del virus a través de superficies inanimadas es baja (57,58). Algunos estudios revelan que el SARS-CoV-2 es más estable en superficies de plástico y acero inoxidable, en las que puede detectarse durante varios días (56,59). Igual que con otros coronavirus respiratorios, se investiga como posibles rutas de transmisión fecal-oral, y por contacto con superficies contaminadas, pero hasta el momento no han sido suficientemente probadas (60,61).

La mayor parte de la literatura revisada acota el período de incubación del virus al inicio de la pandemia en una media de 7,8 días, con una mediana de 5,01 días. Estos datos están incluidos dentro de los rangos propuestos por OMS (0-14 días) y ECDC (2–12 días) (62–64). El 97,5 % de los pacientes sintomáticos infectados con la cepa original desarrollaron síntomas dentro de los 11,5 días. El motivo más frecuente de consulta hospitalaria de los pacientes con COVID-19 suele ser fiebre y tos seca (65), ver detalles en la Figura 4. En relación al número básico de reproducción (conocido como R_0), cuantifica el potencial epidémico de un patógeno y proporciona información sobre la velocidad con que una enfermedad puede propagarse en una población determinada. Se define como el número promedio de personas a las que una persona infectada puede propagar el virus (66). Según las epidemias estándar, un R_0 superior a 1 podría conducir a la propagación de enfermedades. Aproximadamente el cincuenta por ciento de las transmisiones ocurren como consecuencia de la exposición a personas asintomáticas. Numerosos estudios han investigado la transmisión en personas asintomáticas y en personas presintomáticas. El número básico de reproducción (R_0) ha ido variando en función de las cepas y variantes conocidas, en término medio se consideraba 2,2 basado en el seguimiento temprano de casos durante el comienzo de la pandemia, con un

tiempo de duplicación de 5 días. En este sentido, cada persona infectada en la fase inicial de la pandemia contagia a 2 o 3 personas más (2,20). La tasa básica de reproducción inicial del SARS-CoV-2 ha oscilado entre 2,4 y 3,3 en función de la movilidad, medidas de contención, susceptibilidad, población de riesgo, entre otros parámetros. Hay evidencia de propagación asintomática/ presintomática del SARS-CoV-2, que contrasta con la dinámica de transmisión del SARS-CoV (67). Además, el SARS-CoV-2 tiene capacidad para colonizar y replicarse en la garganta durante la infección temprana (9,50,68). La transmisión del SARS-CoV-2 en individuos presintomáticos se acerca al umbral para mantener un brote por sí solo ($R_0 > 1$); por el contrario, las estimaciones correspondientes para el SARS-CoV fueron aproximadamente cero (69).

Comprender la importancia de la transmisión de los gérmenes infecciosos durante la pandemia COVID-19 ha sido esencial para que las autoridades de salud pública implementaran medidas de control efectivas, incluyendo el uso de mascarillas, el rastreo de contactos y el aislamiento físico (70).

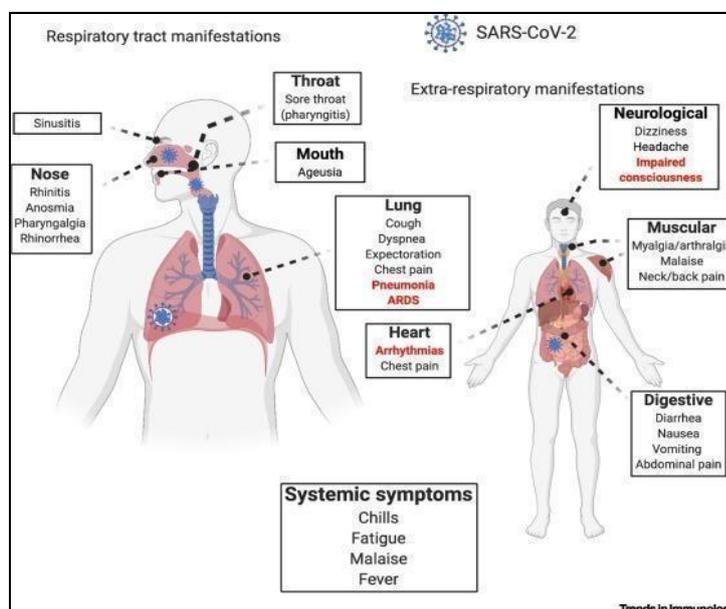


Figura 4 Síntomas clínicos de la Enfermedad Infecciosa por Coronavirus 2019.

Imagen tomada de: Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends Immunol. 2020 Dec; 41 (12):1100-1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33132005; PMCID: PMC7556779.

1.1.3 Epidemiología de la infección por SARS-CoV-2 y evolución de la pandemia por COVID-19

La dinámica epidemiológica de COVID-19 ha cambiado manifiestamente durante el transcurso de la evolución de la pandemia. Inicialmente el continente más afectado fue Asia, con China como país más impactado a nivel mundial, posteriormente hubo una mayor incidencia en América, en EE.UU. y Brasil (71). Es importante considerar que la gravedad y la mortalidad han experimentado una importante variabilidad según cada país y ha ido evolucionado con las distintas cepas y variantes del SARS-Cov-2. Cada cepa ha incorporado mutaciones novedosas en la proteína Spike que han influido en la epidemiología y clínica de la pandemia de COVID-19 (72). Estas variantes pueden aumentar las tasas de transmisión del virus, el riesgo de reinfección, la reducción de los anticuerpos neutralizantes y la vacunación. Las nuevas variantes aumentan su capacidad de replicación y permiten que el SARS-CoV-2 continúe propagándose pese al aumento de la inmunidad de la población. La identificación de linajes de virus en rápida expansión desde diciembre de 2020, llamadas variante de preocupación (VOC), ha abierto una nueva etapa de la pandemia y de la investigación de la misma (34). Estas variantes comparten varias mutaciones entre sí, así como con un número cada vez mayor de otras variantes identificadas del SARS-CoV-2. Las nuevas variantes del SARS-CoV-2 complican la investigación de la COVID-19 y requieren vías adicionales de investigación clínica, epidemiológica y de laboratorio. Entre los 17 países que informaron al menos 10 resultados de secuenciación o genotipado del SARS-CoV-2 durante las semanas 38 a 39 (del 18 de septiembre al 1 de octubre de 2023), la distribución estimada de VOC o variantes de interés (VOI) fue 66,2% (7,1–98,0% de 17 países) para XBB.1.5+F456L, 29,9% (2,0–92,9% de 17 países) para XBB.1.5, 2,6% (0,3–7,4% de 15 países) para BA.2.75 y 1,9% (0,5–7,3% de 5 países) para XBB (73).

Los primeros pacientes descritos desarrollaron los primeros síntomas a principios de diciembre de 2019; posteriormente se produjo una rápida propagación a través de los todos continentes por una rápida transmisión de persona a persona hasta ser declarada como pandemia por la OMS (74). Desde entonces el SARS-Cov-2 se ha extendido a más de 235 países, áreas o territorios (75), causando desde su aparición inicial en Wuhan en diciembre de 2019, más de 641 millones de casos de COVID-19 y más de 6,6 millones de muertes. A nivel mundial a las 6:59 pm CET, el 6 de Diciembre de 2023, se habían confirmado 772.138.818 casos de COVID-19, incluyendo 6.985.964 muertes confirmadas

a la OMS. Hasta el 26 noviembre de 2023, se habían administrado un total de 13.595.721.080 dosis de vacunas. Datos actualizados den tiempo real en Figura 5 (76). Durante este tiempo han ido apareciendo nuevas variantes genéticas, cuyo éxito depende de la selección natural; en particular, de la selección positiva asociada con mutaciones que son beneficiosas para el virus (77). Los primeros meses de la evolución del SARS-CoV-2 en humanos se caracterizaron por una adaptación limitada y un cambio fenotípico en relación con su evolución posterior (78). Inicialmente se pensó que la disminución de la inmunidad podía explicar que las personas volvieran a infectarse con los coronavirus endémicos del resfriado común pero nuevos estudios sugieren que la deriva antigénica también contribuye a la falta de protección duradera después de las infecciones por coronavirus (79). El SARS-CoV-2 ha demostrado ser un patógeno humano cualificado, estableciendo infecciones en varias especies de mamíferos, como visones de granja (80), venados de cola blanca (81) y en muchas otras especies animales (82). Su gran capacidad de tropismo frente al huésped pone en evidencia el potencial de propagación a huéspedes animales para acelerar la evolución de nuevos linajes virales. A partir de octubre de 2020, comenzaron a surgir nuevas variantes del SARS-CoV-2 con más mutaciones. Estas variantes se distinguen por un mayor número de mutaciones no sinónimas principalmente en la proteína espiga, sobre todo en el caso de Omicron, y propiedades fenotípicas distintas, con alteración de la transmisibilidad y antigenicidad. Han ido surgiendo variantes del SARS-CoV-2 declaradas variantes de preocupación (VOC) por la Organización Mundial de la Salud (y las agencias nacionales de salud pública) basándose en que presentan una transmisibilidad alterada o escape inmunitario que justifica una vigilancia estrecha. Cada VOC mostró ventajas de transmisión sobre las variantes anteriores y se volvió dominante, ya sea regionalmente en los casos de Alfa (linaje PANGO10 B.1.1.7), Beta (B.1.351) y Gamma (P.1), en Europa, África del Sur y Sur América, respectivamente, o globalmente, en los casos de Delta (sublinajes B.1.617.2/AY) y los muchos sublinajes Omicron (sublinajes B.1.1.529/BA, como BA.1, BA.2 y BA.5 XBB.1.5, para BA.2.75) (83–85). El SARS-CoV-2 carecía de niveles notables de adaptación al comienzo de la pandemia (86), en contraste con la expectativa de que los virus tienen una rápida adaptación al huésped después del contagio (19); posteriormente se demostró que el SARS-CoV-2 es un virus capaz de usar una variedad de proteínas de membrana de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) para ingresar a la célula (38,87) lo que permite la infección de una amplia gama de mamíferos.

Diferentes informes sobre el estado de la epidemia de COVID-19 publicados en España por el Ministerio de Sanidad indican que esta enfermedad es algo más prevalente en mujeres, en personas mayores de 50 años y en personas con dos o más enfermedades previas, especialmente hipertensión (47,4%), enfermedad cardiovascular (32,3%) y diabetes mellitus (16,1%) (88). Entre los casos confirmados de infección en los periodos anteriores al inicio de la vacunación que corresponde con el inicio de este trabajo de investigación, el 48,7% de pacientes requirió hospitalización, principalmente por neumonía y el SDRA. Entre pacientes con neumonía, se sobre-representaban hombres, personas mayores de 60 años y personas con Enfermedad Cardiovascular y/o Diabetes Mellitus (89,90). Los síntomas más frecuentes de pacientes seguidos en España durante el primer año de pandemia fueron fiebre (75,7%), tos (75,5%) y disnea (48,3%). De pacientes hospitalizados en la primera ola de la pandemia el 5% progresó a un estado crítico que requirió ingreso en la unidad de cuidados intensivos y el 2,3% falleció (91).



Figura 5. Datos COVID-19 en tiempo real <https://covid19.who.int/more-resources>

1.1.4 Presentación clínica de COVID-19

En general, los CoV del resfriado común tienden a causar síntomas leves de tracto respiratorio inferior y afectación gastrointestinal ocasional. Por el contrario, los CoV altamente patógenos, incluido el SARS-CoV pueden causar cuadros graves. La hipertensión es uno de los principales factores de riesgo predisponentes a la infección por COVID-19 (90). El riesgo de gravedad de la enfermedad de COVID-19 depende además de otras comorbilidades y factores como la edad, origen étnico, sexo, obesidad, tabaquismo, hipertensión, diabetes, enfermedad renal crónica, hiperlipidemia y enfermedad cardiovascular que han sido estudiados desde las fases iniciales de la pandemia (110) y otros factores como la genética, el estado de vacunación y otras condiciones. La comprensión de todos los mecanismos subyacentes de la enfermedad

es importante para la estratificación del riesgo y el triaje clínico (15). En el transcurso de los más de 3 años de pandemia se ha puesto en evidencia que la COVID-19 es un conjunto de enfermedades de predominio respiratorio y gastrointestinal agudo y que puede causar complicaciones a largo plazo (92). Las características clínicas han ido evolucionando con el transcurso de la pandemia. La neumonía es una de las manifestaciones más graves caracterizada por fiebre, tos, disnea y opacidades pulmonares bilaterales. En las primeras fases, un estudio descriptivo realizado en Nueva York con datos de más de 70.000 casos, la enfermedad fue leve en 81% (con neumonía leve o sin ella), moderada en 14% (neumonía con hipoxemia) o grave en 5% (insuficiencia respiratoria con ventilación mecánica, shock o fallo multiorgánico), con una letalidad total del 2,3%, y del 49% para los casos graves (92). Se han asociado numerosas características y factores de riesgo clínico, incluidos la edad, el género, la raza y padecer comorbilidades, con la mortalidad, la morbilidad y el ingreso hospitalario en pacientes con COVID-19 (93). Otro estudio realizado en la primera fase de la pandemia en hospitales de Wuhan concluyó que las comorbilidades estaban presentes en casi la mitad de los pacientes. La sintomatología más frecuente al ingreso fue fiebre y tos, seguida de expectoración y disnea. La mediana desde el inicio de la enfermedad hasta el alta fue de 22,0 días (IQR 18,0-25,0), mientras que la mediana de tiempo hasta la muerte fue de 18,5 días (15,0-22,0). De los pacientes que requirieron ventilación mecánica invasiva, el 97% falleció. La mediana de tiempo desde el inicio de la enfermedad hasta la ventilación mecánica invasiva fue de 14,5 días (12,0-19,0). La oxigenación por membrana extracorpórea se utilizó en tres pacientes, ninguno de los cuales sobrevivió. La sepsis es la complicación observada con mayor frecuencia, seguida de la insuficiencia respiratoria, el SDRA, la insuficiencia cardíaca y el shock séptico (94).

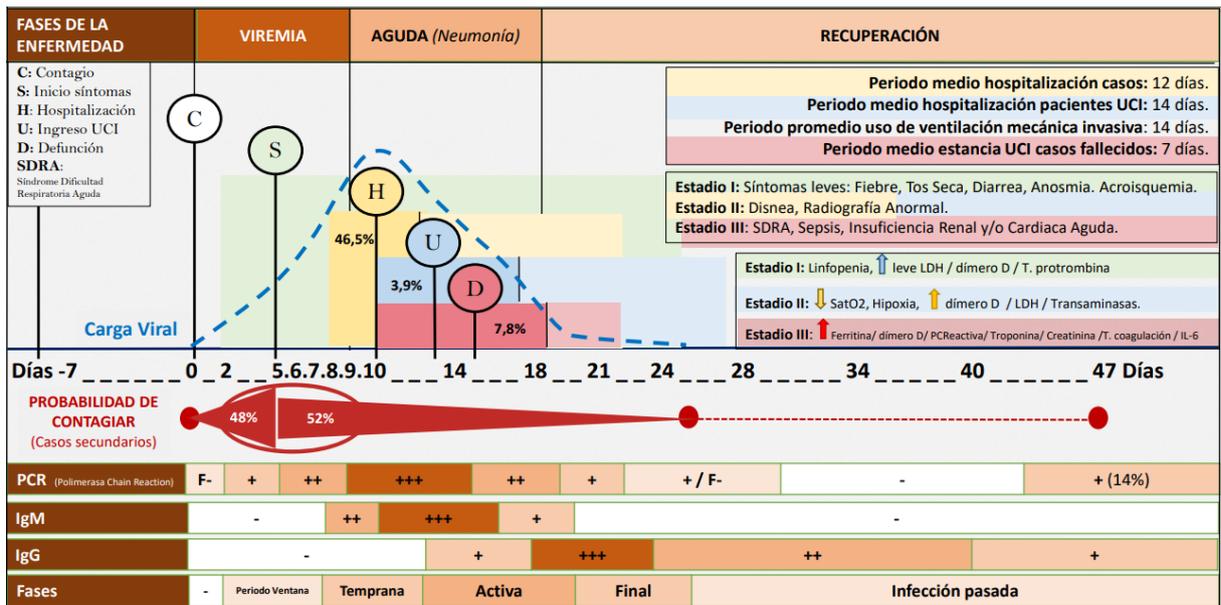


Figura 6. Factores asociados con la admisión en el hospital de pacientes críticos.

Evolución de la COVID-19 en el paciente: fases y características. Estrada, C. Sociedad Española de Farmacia Clínica, Familiar y Comunitaria. 2020. En: <https://www.sefac.org/para-profesionales-publicaciones-sefac-publicaciones-sefac-materiales-disponibles-para-el-socio-5>.

Estudios de corte poblacional realizados en EE.UU. y los primeros de estas características realizados fuera de China, concluyen que las personas con edad avanzada, sexo masculino y antecedentes de hipertensión y/o diabetes tuvieron una alta prevalencia de COVID-19, similar a los datos obtenidos de China, pero con tasas de mortalidad menores (92). La edad y las comorbilidades son predictores de la necesidad de ingreso hospitalario frente a la atención ambulatoria y el grado de eficiencia de oxígeno y los marcadores inflamatorios se asociaban con una mala evolución durante el ingreso hospitalario por lo que concluye en la necesidad de obtención rutinaria de marcadores inflamatorios durante el ingreso hospitalario para pacientes con COVID-19 (95).

Desde una perspectiva diagnóstica, la COVID-19 se presenta con índices de laboratorio y radiológicos propios, que pueden ser de utilidad para evaluar la progresión y gravedad de la enfermedad, la inflamación sistémica potencialmente mortal y la disfunción multiorgánica. La COVID-19 grave no se limita a la población de edad avanzada como se pensó inicialmente; también afecta a niños y adultos jóvenes, pero a diferencia de los adultos infectados, en la mayoría de niños y niñas las infecciones asintomáticas son frecuentes y suelen tener un curso clínico más leve con sintomatología respiratoria de vías altas. En la infancia se ha descrito el síndrome de inflamación multisistémica (MIS-

C), con compromiso del corazón, pulmones, riñones, cerebro, piel o tubo digestivo (96), no es común, pero se asocia con una alta morbilidad y mortalidad (97).

El SARS-CoV-2 se replica activamente en los tejidos de las vías respiratorias superiores (6,35) como lo demuestra el aislamiento desde hisopos faríngeos y la detección del ARNm subgenómico viral (sgRNA) en células del tracto respiratorio superior (98). El tropismo del tejido respiratorio superior puede explicar la excreción faríngea continua del virus y la transmisión más eficiente del SARS-CoV-2 frente al SARS-CoV con síntomas aún mínimos y restringidos al tracto respiratorio superior. La mayoría de las infecciones siguen siendo leves y hasta el 20 a 40% de los pacientes son asintomáticos. En el transcurso de la enfermedad el COVID-19 se parece al SARS en términos de replicación viral en el tracto respiratorio inferior al generar una viremia secundaria, seguida de un extenso ataque contra los órganos diana que expresan ACE2, tales como el corazón, los riñones, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular. Esta diseminación viral se correlaciona con el deterioro clínico, generalmente alrededor de la segunda semana tras el inicio de la enfermedad. La progresión de la enfermedad hasta la etapa tardía se puede atribuir tanto al daño viral directo como al daño inmunomediado inducido por el SARS-CoV-2. En pacientes graves y críticos con COVID-19, destaca un aumento progresivo de la inflamación sistémica, daño tisular y una tendencia inusual de hipercoagulación (99), con complicaciones tromboembólicas, lesión cardíaca y/o tormenta de citoquinas (100). La progresión de COVID-19 se asocia con una disminución continua en el recuento de linfocitos y una elevación significativa de neutrófilos, al mismo tiempo los marcadores inflamatorios se elevan notablemente, incluida la PCR, la ferritina, la interleucina IL-6, IP-10, MCP1, MIP1A y TNF α . Varios estudios concluyen que la reducción del recuento de linfocitos y los niveles elevados de ferritina, IL-6 y dímero D se asocian con una mayor mortalidad por COVID-19 (87-90). Los mecanismos subyacentes a la linfopenia progresiva en pacientes graves y críticos con COVID-19 siguen sin estar claros.

1.1.5 Respuesta inmune e inflamación en la infección por SARS-Cov2

La infección por SARS-CoV-2 desencadena una respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa. La respuesta proinflamatoria excesiva del virus y la respuesta desregulada del huésped ocasionan el daño tisular (101). Posteriormente se produce una desregulación inmunitaria generalizada e incontrolada que libera cantidades masivas de citoquinas y quimiocinas, que se ha denominado "tormenta de citoquinas". Tanto las células T CD4+ como las CD8+ son antivirales; CD8+ representan el 80% del total de células inflamatorias infiltrantes y pueden eliminar a las células infectadas por virus. Los CD4+, activan las células B dependientes de T que producen anticuerpos específicos del virus. El equilibrio entre las células T *naive* y las de memoria es básico para una respuesta defensiva eficiente del huésped (101). Mientras que las células T naif son una defensa contra infecciones nuevas y no reconocidas previamente, las células T memoria son mediadoras de la respuesta inmune específica de antígeno. El desequilibrio favorece la actividad de las células T vírgenes frente a las células T reguladoras y contribuye a la hiperinflamación a través de una liberación masiva y coordinada de citoquinas.

La vía del complemento es otro de los factores importantes en el proceso de hiperinflamación; así los factores C3a y C5a tienen potentes propiedades proinflamatorias capaces de desencadenar el reclutamiento de células inflamatorias y la activación de neutrófilos. La tormenta de citoquinas, característica de la infección por SARS CoV2, progresa a través de vías, como NF- κ B, JAK/STAT y la vía de activación de macrófagos, lo que conduce a la liberación de IL-6 y TNF-alfa (101). En la tormenta de citoquinas, la IL-6 es un factor clave activando varios tipos de células y formando un ciclo de retroalimentación positiva. La producción no regulada a gran escala de interleucinas, principalmente IL-6, estimula varias vías más (68,102), y aumenta la producción de reactivos de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR) (68).

1.1.6 La cascada coagulativa y la inflamación creciente

En la cascada coagulativa creciente posterior se involucran células endoteliales, plaquetas, neutrófilos, monocitos y macrófagos. La barrera protectora formada por el endotelio vascular que en condiciones saludables actúa como antitrombótico y

antiinflamatorio se interrumpe en COVID-19, provocando trombosis e inflamación (103), principalmente por la trombina (104).

La hemostasia primaria comienza con la activación plaquetaria y una vez activadas, reclutan más plaquetas. Las plaquetas secretan citoquinas proinflamatorias y factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promoviendo la activación y extravasación de leucocitos. La tormenta de citoquinas origina trombocitosis y el estado inflamatorio, provocando trombocitopenia por el consumo de plaquetas y la formación de trombos y el consumo de plaquetas. Los neutrófilos reclutados para colaborar en el crecimiento de los trombos forman trampas extracelulares de neutrófilos (NET) y la extrusión organizada de la cromatina de los neutrófilos maduros. Los NET son antibacterianos y protrombóticos. Los macrófagos, reclutados para trombos de fibrina, generan plasmina, a través de la cual la fibrina se degrada a dímeros D. Por este mecanismo es posible que los macrófagos contribuyan a la elevación inusual del dímero D que se observa en la COVID-19. Los monocitos activados y los patrones moleculares asociados al daño de los tejidos lesionados producen citocinas y quimiocinas inflamatorias que estimulan a los neutrófilos, linfocitos, plaquetas, células endoteliales vasculares y monocitos para expresar el factor tisular y la fosfatidilserina y desencadenar la coagulación (91,105,106). Los análisis de autopsia realizados han revelado trombos ricos en fibrina que contienen neutrófilos en los capilares alveolares y un aumento de megacariocitos pulmonares que producen plaquetas jóvenes que son más trombogénicas (103). Debido a la alta capacidad fibrinolítica de los pulmones, existe una fuerte fibrinólisis que conduce a la producción de dímeros D que se derraman en la sangre (107).

1.1.7 Linfocitopenia

La linfocitopenia ocurre hasta en el 52% de los pacientes con sepsis y se asocia con una mayor mortalidad. En COVID-19, la presencia de linfopenia se correlaciona con el ingreso a la unidad de cuidados intensivos, el síndrome de dificultad respiratoria aguda y el fallecimiento. Los mecanismos que subyacen a la sepsis linfopénica siguen siendo desconocidos (108). La linfocitopenia, como factor indicativo de COVID-19, se atribuye a múltiples mecanismos que incluyen, la invasión viral directa y la lisis cuando los linfocitos

expresan el receptor ACE2 en su superficie, la apoptosis de los linfocitos inducida por las interleucinas, la reducción del recambio de linfocitos debido a la tormenta de citoquinas. Esto induce atrofia de los órganos linfoides, y reduce la proliferación de linfocitos debido a la acidosis láctica (104). Finger, *et al.* (2022) destacan que presencia de linfopenia se ha correlacionado con una mayor mortalidad y morbilidad; concluyen que una comprensión más profunda de la biología molecular y celular de la sepsis linfopénica puede ofrecer nuevas oportunidades para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento dirigidas a la respuesta inmune desregulada del huésped (108).

1.2. Biomarcadores en la infección por COVID-19

1.2.1 Definición

Un biomarcador puede definirse como una característica que puede medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos y patológicos normales, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (109). Se han indicado algunos parámetros bioquímicos como posibles biomarcadores de evolución como el aumento de ferritina, dímero D, PCR, troponina, LDH o IL-6, que evidencian que la cascada inmunológica, inflamatoria y coagulativa están estrechamente interrelacionadas (110). Existen diversos biomarcadores según el órgano o sistema de origen, lo que refleja la naturaleza multisistémica de la COVID-19, los cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Lista de biomarcadores en COVID-19 clasificados según órgano/sistema involucrado

En: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2020.607647/full>

Hematológico	Leucocitosis/leucopenia Linfopenia Neutrofilia Depleción célulasCD4+ CD8+ Elevación ratio neutrófilos/linfocitos
Inflamación	Citoquinas Quimioquinas Factores de crecimiento Proteína C reactiva Procalcitonina Lactato-Deshidrogenasa
Coagulación	Niveles dímero D Fibrinógeno Degradación productos de fibrina (FDP) Tiempo Protrombina (PT) Tromboplastina parcial activada
Cardíacos	Troponina cardiaca (ctn) Péptido (BNP)/NT-proBNP Péptido natriurético cerebral
Hepático	Aspartato aminotransferasa (AST) Alanina aminotransferasa (ALT) Bilirrubina Albúmina
Musculares	Creatín-quinasa muscular (CK) Mioglobina
Renal	Creatina Sérica Renal
Electrolitos	Hiponatremia Hipopotasemia Hipocalcemia

1.2.2 Uso de marcadores en la práctica clínica

Los marcadores de laboratorio, o biomarcadores, pueden proporcionar información objetiva con impacto significativo en la atención del paciente complementario a la evaluación clínica. COVID-19 es una enfermedad multisistémica originada por un proceso sistémico difuso originado por una compleja interacción de las cascadas inmunológicas, inflamatorias y de la coagulación (111).

1.2.3 Evolución temporal de biomarcadores en COVID-19

Existen numerosos estudios individuales y varios metaanálisis sobre potenciales biomarcadores en COVID-19. La mayoría muestran el cambio diferencial de los biomarcadores en la categorización de la enfermedad y la relación con la mortalidad, la necesidad de ventilación mecánica e ingreso en UCI y la duración de la estancia hospitalaria (109,111–113).

Es necesario considerar la variación temporal de los biomarcadores durante el transcurso de la COVID-19 para determinar la progresión de la enfermedad y la respuesta terapéutica (112).

Un estudio retrospectivo realizado en Wuhan, China, durante la fase inicial de la pandemia temprana mostró que los recuentos de leucocitos y neutrófilos eran normales en la primera semana y aumentaban posteriormente, y que la linfopenia que fue más evidente en personas que no sobrevivieron, se mantuvo en todos los pacientes. La trombocitopenia observada en la primera semana mejoró posteriormente en sobrevivientes y persistió en no sobrevivientes. El nivel de dímero D se elevó en los no sobrevivientes en fases más avanzadas de la enfermedad. Los no sobrevivientes en comparación con los sobrevivientes tenían niveles más altos de CK, CK-MB, LDH, AST y ALT en la primera parte de la enfermedad, y niveles de urea y creatinina en sangre progresivamente crecientes (106).

La tendencia del hemograma a lo largo del transcurso de la enfermedad ha sido otro de los biomarcadores revisados en un estudio retrospectivo. Los recuentos de glóbulos blancos, neutrófilos y plaquetas disminuyeron progresivamente en los casos

graves/críticos hasta alcanzar el límite más bajo entre los días octavo y noveno de la enfermedad con recuperación progresiva en los siguientes días. El recuento de linfocitos disminuyó gradualmente y, la proporción de linfocitos reactivos y sintetizadores de anticuerpos aumentó progresivamente hacia el décimo quinto día (114).

Los parámetros hematológicos e inmunológicos evaluados a lo largo del tiempo de la primera fase de la pandemia mostraron que los linfocitos, los subconjuntos de células T, los eosinófilos y las plaquetas estaban marcadamente bajos al ingreso, especialmente en pacientes con enfermedad grave/crítica y no sobrevivientes. Las personas que sobrevivieron y las que fallecieron podrían discriminarse por la tendencia creciente de eosinófilos, linfocitos y plaquetas en los pacientes que sobrevivían en comparación con una caída significativa en los no sobrevivientes. Los niveles restaurados de linfocitos, eosinófilos y plaquetas podrían servir como predictores de recuperación, mientras que los aumentos progresivos de neutrófilos, basófilos e IL-6 se asociaron con un desenlace fatal (115).

Otro estudio retrospectivo reveló que la ferritina es el último parámetro en volver a la normalidad, mientras que la PCR de alta sensibilidad se normalizaba unos 5 días antes que la ferritina. Esto parece sugerir que la ferritina podría ser útil para evaluar la gravedad (116). Un estudio, que clasificaba los pacientes en 3 categorías (leve, grave y fatal), analizó los niveles de 48 biomarcadores (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento–CCGF) en los días 1, 5, 10 y 14 tras el diagnóstico de COVID-19 (117). Tal y como se muestra en la tabla 2, los factores IFN- γ , IL-1R α , IL-2, IL-2R α , IL-6 junto con otros 7 aumentaron de manera similar entre los días 1 y 5 en los todos los pacientes, pero aumentaron notablemente en pacientes con evolución fatal 14 después del diagnóstico, al tiempo que permanecían en niveles constantes en los sobrevivientes.

1.2.4 Uso de marcadores moleculares en clínica

El uso de marcadores moleculares en clínica no es algo nuevo, y de hecho, es una práctica bastante extendida en algunos tumores como el cáncer de mama donde el uso de *BRCA1/2* se aplica de forma rutinaria como un marcador más que identifica con un mayor riesgo a las mujeres portadoras; o también el caso de los marcadores HER-positivos/HER-2 en estas pacientes. O en el caso del síndrome de Lynch donde se sabe

que aproximadamente el 90% de casos se deben a variantes patogénicas germinales en los genes *MLH1* y *MSH2*, seguido de *MSH6* en el 7%-10% de los casos y *PMS2* en menos de 5% de los casos; mientras que las deleciones en el gen *EPCAM* son la causa en ~1% de los casos (118). O bien como papel en aplicación de la farmacogenética en la clínica, que está muy extendido en el campo de las patologías cardiovasculares, neurológicas y psiquiátricas, en cambio en su aplicación no está actualmente estudiada en el tratamiento del COVID-19 (119–121).

Tabla 2. Lista de biomarcadores en COVID-19 clasificados según evolución temporal.

Periodo de tiempo	Biomarcadores
< 7 días	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento total de leucocitos y el recuento de linfocitos son normales o ligeramente bajos. • ↑ LDH, ↑ AST, ↑ ALT, ↑ CK, ↑ CK-MB – pueden ser marcadores tempranos de enfermedades graves y mortalidad.
7-14 días	<ul style="list-style-type: none"> • El recuento total de leucocitos y el recuento de linfocitos disminuyen progresivamente hasta alcanzar el nadir a los 8-9 días. • Puede aparecer trombocitopenia. • ↑ IL-6, IL-10, IL-1RA, MCP-1.
>14 días	<ul style="list-style-type: none"> • El aumento del recuento total de leucocitos, linfocitos y plaquetas predecir la recuperación mientras que la reducción de los recuentos predice la mortalidad.

Pie de Tabla 2. ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato transaminasa; CK, creatina quinasa; IL-6, interleucina-6; LDH, lactato deshidrogenasa; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos 1.

Elaboración propia adaptado de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2020.607647/full>

La aplicación de las nuevas técnicas de biología molecular, como la secuenciación masiva, ha proporcionado una nueva generación de biomarcadores moleculares, los cuales están adquiriendo cada vez una mayor importancia en el ámbito de la medicina personalizada, con aplicaciones que incluyen el diagnóstico, el pronóstico y selección de

terapias; y que están actualmente aplicándose de forma rutinaria en la práctica clínica; lo que sin duda facilita el éxito de esta propuesta (122).

Estudios recientes basados en la caracterización de las respuestas inmunes en una cohorte de pacientes hospitalizados han destacado que los cambios clave asociados a la enfermedad COVID-19 quedan reflejados en la frecuencia y el fenotipo de las células inmunitarias (123). Se ha comprobado que, la inmunidad adaptativa se encuentra deteriorada en pacientes con neoplasias hematológicas infectadas con COVID-19, lo que resulta en respuestas inmunes celulares deterioradas al SARS-CoV-2 (124). Sin embargo, la mayoría de los datos actuales conocidos a nivel molecular o genómico se basan en la caracterización del genoma o superficie celular del virus (125), siendo muy escasos los datos relativos a las subpoblaciones de pacientes que han evolucionado de forma diferente, y donde claramente nuestro genoma contendrá las bases esenciales para esa actuación (126). Existen datos preliminares sobre el posible papel de *FNAR2* y otros genes potenciales que podrían estar involucrados en la susceptibilidad o pronóstico de COVID-19 (127). Así como destacando el papel de TCR y BCR frente a la inmunidad a COVID-19, describiendo la existencia de poblaciones celulares similares entre TCR de pacientes con una trayectoria característica de clonotipos y trazabilidad durante el curso de la enfermedad (128); o bien destacando la caracterización en casos graves de COVID-19 de aparición de precursores de neutrófilos, neutrófilos maduros disfuncionales y monocitos HLA-DRlo (129).

Relo, *et al.* han descrito 5 fenotipos en COVID-19 donde la terapia personalizada puede ser útil, que van desde el más benigno (fenotipo 1) hasta el aumento de la dificultad respiratoria e hipoxemia (fenotipos 2 y 3) y SDRA (fenotipos 4 y 5) (130). Sugieren que IL-6 es una característica diferenciadora entre los fenotipos 2 y 3, y la PCT como una característica del fenotipo 5. La definición de fenotipos en función de los factores de riesgo subyacentes, las características clínicas y radiológicas y los biomarcadores puede ayudar a predecir la necesidad de UCI y optimizar la terapia (130).

1.3. Enfoque traslacional y Ultracaracterización de linfocitos

La medicina nos ha permitido hacer avances increíbles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Pero la complejidad de la biología humana hace que patologías nuevas como el COVID-19, sigan siendo actualmente un reto. Desde el inicio de la pandemia, la búsqueda de biomarcadores para clasificar correctamente a los pacientes ha sido uno de los grandes retos de la comunidad científica en esta enfermedad (131). Existen datos controvertidos sobre cuál es el mejor marcador inmunológico para el seguimiento de la COVID-19.

Como se ha expuesto previamente, se han estudiado varios biomarcadores como PCR, ferritina sérica, dímero D e interleucina-6 (IL-6), tanto para la evaluación pronóstica de pacientes con neumonía por COVID-19, como para el manejo de los mismos (111). Progresivamente se han incluido nuevos biomarcadores como la presepsina como subtipo soluble de CD14 en pacientes con sepsis (132).

La separación entre investigación biomédica básica y la aplicación clínica de la misma ha crecido progresiva y exponencialmente, pero a pesar de una explosión del conocimiento sobre mecanismos de procesos biológicos, no ha habido una traducción en un incremento paralelo de nuevos tratamientos. En este contexto surge el concepto de medicina traslacional con el objetivo de facilitar la transición de la investigación básica en aplicaciones clínicas en beneficio de la salud. En este sentido la medicina traslacional se puede enfocar desde dos puntos de vista centrados en la salud humana. El primero pretende encaminar el conocimiento de las ciencias básicas para producir nuevos medicamentos, dispositivos, marcadores diagnósticos con el objetivo de obtener tratamientos que puedan ser desarrollados y aplicados en la clínica con nuevos enfoques para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Aquí se pueden encontrar proyectos de biomarcadores, terapias génicas, farmacogenómica, entre otros. El otro enfoque, defendido especialmente por investigadores de salud pública y servicios de salud, considera la salud comunitaria como principal medida y trata de asegurar que el conocimiento científico y nuevos tratamientos sean implementados correctamente y lleguen a las poblaciones para las que se han sido diseñados (133).

El papel de las citoquinas y las quimiocinas se ha asociado con la gravedad de la enfermedad y los resultados clínicos de la COVID-19 durante toda la pandemia, lo que sugiere que estas moléculas son los biomarcadores más prometedores para el tratamiento de los pacientes. Al mismo tiempo se ha informado que algunos biomarcadores inflamatorios están significativamente asociados con un mayor riesgo de desarrollar COVID-19 grave, como la procalcitonina (PCT), la ferritina sérica, PCR, IL-6 o velocidad de sedimentación globular (VSG) (131).

Recientemente se ha informado que la enfermedad grave se puede distinguir de la enfermedad moderada por la pérdida sistémica y la disfunción de los monocitos proinflamatorios similares a M1, las CD convencionales y las células dendríticas plasmocitoides (CDp). Además, en pacientes pediátricos, se ha descrito que los niveles séricos de CD25 soluble y CD163 soluble están regulados positivamente en el suero de pacientes con SARS-CoV-2, así como niveles elevados de CD11c+. Se ha identificado una población de CD16hi durante la fase aguda de la infección y en la gravedad de la enfermedad en primates no humanos (10).

Además, las tecnologías que combinan citometría de flujo y de masa han mejorado el perfil inmunitario de múltiples células individuales en pacientes con COVID-19 al revelar cambios en las subpoblaciones de células inmunitarias tanto innatas como adaptativas y su correlación con la gravedad de la enfermedad. Hay informes de frecuencias reducidas en poblaciones celulares de pacientes graves con COVID-19 en monocitos [particularmente monocitos no clásicos CD14lo CD16hi (NCMo), células dendríticas (DC) y células asesinas naturales (NK) (134).

Debido al importante papel del sistema inmunitario y los mecanismos inmunológicos que se correlacionan con la progresión de la enfermedad, se propone en esta tesis el análisis mediante citometría por espectrometría de masas de tiempo de vuelo (CyTOF). Este es un método que permite el análisis simultáneo de más de 40 marcadores celulares sin superposición espectral (123,134).

Existen algunas publicaciones donde se realizan estudios multi-ómicos, enfocados en parámetros inflamatorios en las primeras semanas de la enfermedad en pacientes leves, pero no se han descrito marcadores aplicables a la práctica clínica (135). Gracias a la revolución genómica y a la aplicación de las nuevas tecnologías, se puede obtener gran

cantidad de información de marcadores genéticos asociados a patologías o bien alteraciones relacionadas con el perfil del metabolismo del fármaco, o bien con la agresividad de una patología, permitiendo información muy individualizada de cada paciente. La incorporación de estudios de NGS, permitirá explicar no sólo las variantes más comunes sino aquellas raras, que pueden dar respuesta a la elevada tasa de agresividad o variabilidad de respuesta de los pacientes de COVID-19, así como aquellos pacientes que evolucionan con un peor pronóstico de la misma (136).



2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Cada paciente es biológicamente único y la medicina personalizada abre una nueva puerta para abordar este tipo de patologías. Complementar los biomarcadores clínicos actuales, con los biomarcadores genómicos permitirá una mejor categorización de esta patología desde el diagnóstico inicial y mejorará la estratificación de los pacientes. Aportará beneficios ofreciendo una estrategia terapéutica y seguimiento clínico óptimos y acercará la medicina personalizada a la patología COVID-19. La OMS clasificó en 2020 a los pacientes afectados por COVID-19 en 4 grupos (afección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y enfermedad crítica); pero se tiene el convencimiento científico que las variantes polimórficas existentes en el receptor *ACE2* hacen que distintos pacientes englobados clínicamente dentro del mismo grupo (con los marcadores clínicos actuales) no respondan ni evolucionen de igual forma a la patología. Este aspecto se podrá reajustar con los análisis moleculares realizados en este trabajo. Con las tecnologías que combinan citometría de flujo y de masas se han mejorado los perfiles inmunológicos unicelulares múltiples en pacientes con COVID-19 al revelar cambios en las subpoblaciones de células inmunes tanto innatas como adaptativas y su correlación con la gravedad de la enfermedad.

Este trabajo de investigación propone un enfoque traslacional basado en selección celular para una ultra caracterización de los pacientes (grupos asintomáticos, leves y graves), analizando el papel de diversos biomarcadores no invasivos, especialmente biomarcadores citométricos y genéticos, que podrían predecir o anticipar los resultados más graves en estos pacientes. Debido al importante papel del sistema inmune y los mecanismos inmunológicos que se correlacionan con la progresión de la enfermedad, nos centramos en el análisis mediante citometría por espectrometría de masas de tiempo de vuelo (CyTOF). Este es un método que permite el análisis simultáneo de más de 40 marcadores celulares sin superposición espectral Este tipo celular básico de nuestro sistema inmune innato y adaptativo permite ofrecer más información por su capacidad para producir citoquinas y de actuar frente a distintos agentes infecciosos como el SARS-CoV-2.



3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Describir el papel de biomarcadores no invasivos, especialmente biomarcadores genéticos e incluir otros, gracias a la Citometría de flujo, que describan las características morfológicas de las células del sistema inmune, para predecir o anticipar los estadios más graves de pacientes de COVID-19. Ambos biomarcadores integrados permitirán conocer desde el inicio, aquellos pacientes con un riesgo de desarrollar una patología más agresiva.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- I. Definir las variantes genéticas y características celulares que se asocien con los grupos: (1) Asintomáticos; (2) Leves; (3) Graves; así como la interacción entre aquellas que mejor clasifiquen cada uno de estos grupos.
- II. Identificar los marcadores genéticos, tipo SNP, y celulares, mediante citometría de masas, que nos ayuden a describir características fenotípicas de esta patología.
- III. Proponer biomarcadores para poder desarrollar un algoritmo de decisión que contemple las variables clínicas, celulares y genéticas con la mala respuesta y agresividad del COVID-19.



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Estudio de cohortes retrospectivo con análisis por pares, como parte de un estudio multicéntrico. Dicha cohorte forma parte de un proyecto financiado por la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía en la modalidad de Proyectos Estratégicos (PE-COVID-0006-2020). El proyecto ha generado un grupo control de pacientes con COVID-19 seleccionados, y que han sido aportados por los hospitales referentes de la provincia y centros de Salud (atención primaria) participantes en el proyecto. Este proyecto fue específicamente diseñado para conocer las características genéticas predictoras de la enfermedad COVID-19 grave en pacientes atendidos en la zona. El tamaño de la muestra fue calculado considerando la proporción del número de casos, muertes e ingresos en UCI declaradas en la Red de Alerta de Andalucía. Para todos los casos COVID-19, se recogieron variables basales, clínicas, de exploraciones complementarias (analíticas, radiológicas) y de tratamiento. Las variables de laboratorio fueron seleccionadas atendiendo a la literatura disponible en el momento de recogida de los datos y de la fase evolutiva de la pandemia. Se analizó individualmente el ingreso en UCI y la necesidad de intubación orotraqueal/Ventilación mecánica invasiva (IOT/VMI). Todos los datos se obtuvieron mediante la revisión de las historias clínicas de hospitalización y atención primaria.

4.2 Población de estudio

Pacientes diagnosticados de COVID-19 en la provincia de Granada entre marzo de 2020 y diciembre de 2021. Se reclutó a un total de 329 pacientes, de los que se genotiparon un total de 329 muestras de sangre para los marcadores *ACE2*, *MX1* y *TMPRSS2*. Se realizaron análisis de ARN a partir de 258 muestras disponibles mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para los genes: *ERG*, *ETV5*, *AR*, *MX1*, *ACE2* y *TMPRSS2*. Se realizó un predictor de efectos de variantes de análisis *in silico*, bases de datos ClinVar, IPA, DAVID, GTeX, STRING y miRDB. Para la realización de la citometría y el análisis genético se seleccionaron un total de 66 ($n = 34$ leves y $n = 32$ graves)

pacientes con una edad media de 52 años entre 2020 y 2021. Todos los datos clínicos (ferritina, dímero D, PCR, troponina, LDH), síntomas (se incluyeron fiebre, anosmia, astenia, disnea, COVID prolongado, etc.), y el seguimiento clínico en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (necesidad de ventilación asistida, neumonía, etc.). Se describen más detalles en la Tabla 3 y Tabla 3 adicional.

Tabla 3 Características descriptivas de las muestras.

	Asintomáticos/ enfermedad leve n (%)	Enfermedad severa / crítica n (%)	OR (CI 95%)	Valor p*
Edad (n= 330)	45.3 +/- 15.3**	60.1 +/- 12.8**		< 0.001
< 55 años	126 (67.4%)	59 (41.3%)	Ref.	< 0.001
> 55 años	61 (32.6%)	84 (58.7%)	2.94 (187-4.62)	
Género (n = 330)				0.477
Masculino	85 (45.7%)	71 (49.7%)	Ref.	
Femenino	102 (54.3%)	72 (50.3%)	0.86 (0.55-1.33)	
Datos Clínicos				
Ferritina (ng/m L) (n = 216)				< 0.001
< 258	73 (62.4%)	32 (32.3%)	Ref.	
> 238	44 (37.6%)	67 (67.7%)	3.47 (1.97-6.10)	
Dímero D (ng/mL) (n= 108)				< 0.010
< 4.77	42 (39.9%)		Ref.	
> 4.77	65 (60.7%)		0.46 (0.26—0.82)	
PCR (mg/L) (n = 21 1)				< 0.001
< 19.8	74 (65.5%)	31 (31.6%)	Ref.	
> 19.8	39 (34.5%)	67 (68.4%)	4.10 (2.30—7.29)	
Troponina (ng/L) (n = 71)				0.440
< 9	11 (44%)	15 (32.6%)	Ref.	
> 9	14 (56%)	31 (67.4%)	1.62 (0.59—4.42)	
LDH {U/L} (n= 185)				< 0.001
< 262	61 (64.2%)	33 (36.7%)	Ref.	
> 262	34 (35.8%)	57 (63.3%)	3.09 (1.70—5.64)	
IL-6 (pg/mL) (n = 21)				0.670
< 51	4 (40%)	6 (54.5%)	Ref.	
> 51	6 (60%)	5 (45.5%)	0.56 (0.09—3.14)	
Vacuna de la gripe (n= 198)				< 0.001
No	90 (70.3%)	32 (45.7%)	Ref.	
Sí	38 (29.7%)	38 (54.3%)	2.82 (1.53—5.14)	
Seguimiento clínico en UCI				
Ventilación mecánica (n= 88)				0.991
No	8 (30.8%)	19 (30.6%)	Ref.	

Sí	18 (69.2%)	43 (69.4%)	1.00 (0.37–2.71)	
Neumonía (n = 330)				
No	155 (82.9%)	80 (55.9%)	Ref.	< 0.001
Sí	32 (17.1%)	63 (44.1%)	3.81 (2.30–6.31)	
Síndrome de inflamación sistémica (n = 43)				< 0.001
No	4 (33.3%)	11 (35.5%)	Ref.	
Sí	8 (66.6%)	20 (64.5%)	4.29 (1.33–13.82)	
Días de hospitalización (n= 81)				< 0.001
< 37 días	21 (87.5%)	47 (83.9%)	Ref.	
≥ 37 días	4 (12.5%)	9 (16.1%)	4.16 (2.34–7.41)	
Sintomatología				
Afectación cutánea (n = 131)				0.077
No	62 (96.9%)	59 (88.1%)	Ref.	
Sí	2 (3.1%)	8 (11.9%)	4.20 (0.85–20.61)	
Anosmia (n= 143)				0.800
No	59 (81.9%)	57 (80.3%)	Ref.	
Sí	13 (18.1%)	14 (19.7%)	1.11 (0.48–2.57)	
Ageusia (n = 144)				1.000
No	56 (77.8%)	56 (77.8%)	Ref.	
Sí	16 (22.2%)	16 (22.2%)	1 (0.45–2.19)	
Mialgia (n= 140)				0.270
No	44 (64.7%)	40 (55.6%)	Ref.	
Sí	24 (35.3%)	32 (44.4%)	1.46 (0.74–2.89)	
Cefalea (n = 140)				0.225
No	53 (74.6%)	45 (65.2%)	Ref.	
Sí	18 (25.4%)	24 (34.8%)	1.57 (0.75–3.25)	
Fiebre (n=172)				0.033
No	42 (49.4%)	29 (33.3%)	Ref.	
Sí	43 (50.6%)	58 (66.7%)	1.95 (1.05–3.62)	
Disnea (n = 143)				0.360
No	41 (56.9%)	35 (49.3%)	Ref.	
Sí	31 (43.1%)	36 (50.7%)	1.36 (0.70–2.62)	
Astenia (n= 130)				0.722
No	33 (50%)	30 (46.9%)	Ref.	
Sí	33 (50%)	34 (53.1%)	1.13 (0.56–2.26)	
COVID Prolongado (n = 69)				0.385

MAERIAL Y MÉTODOS

No	26 (61.9%)	14 (50%)	Ref.
Sí	15 (35.7%)	14(50%)	1.62 (0.62– 4.27)

Comorbilidad

Cáncer (n = 3)	1 (100%)	3 (10%)
Obesidad (n = 18)	0 (096)	18 (90%)

*Chi cuadrado (excepto t-Student para edad).

**Media ± Desviación estándar.

En negrita valores estadísticamente significativos.

Tabla 4 Características descriptivas de las muestras.

VARIABLES	PACIENTES
Edad	
<55	40 (60.6%)
≥55	26 (39.4%)
Sexo	
Varón	30 (45.5%)
Mujer	36 (55.5%)
Agresividad	
Media	34 (51.5%)
Severa	32 (48.5%)
Vacuna gripe	
No	44 (66.7%)
Sí	21 (31.8%)
Dato no disponible	1 (1.5%)
COVID persistente	
No	62 (93.9%)
Sí	1 (1.5%)
Dato no disponible	3 (4.5%)
Neumonía	
No	33 (50%)
Sí	31 (47%)
Dato no disponible	2 (3%)
Respuesta Inflamatoria Sistémica	
No	45(68.2%)
Sí	18 (27.3%)
Dato no disponible	3(4.5%)

4.2.1 Criterios de inclusión

Para el grupo grave se tuvieron en cuenta las siguientes variables de inclusión:

- (i) hipoxia con saturación periférica de oxígeno (SpO_2) $\leq 93\%$ o presión parcial de oxígeno/fracción de oxígeno inspirado (PaO_2/FiO_2) > 300 mmHg;
- (ii) frecuencia respiratoria (RR) ≥ 30 respiraciones/min;
- (iii) ingreso en la UCI.

Los criterios de inclusión para el grupo leve fueron:

- (i) $SpO_2 > 93\%$;
- (ii) la presencia de síntomas inespecíficos como fiebre, fatiga, tos o dolor muscular, sin hospitalización;
- (iii) síntomas imperceptibles durante la infección.

La recolección de los pacientes de este trabajo comenzó en el inicio de la declaración de pandemia, en un periodo de gran incertidumbre para la población y comunidad científica. Los criterios de inclusión fueron revisados periódicamente de acuerdo con la evidencia científica que iba surgiendo a nivel mundial (137–140).

4.2.2 Criterios de exclusión

1. Edad inferior a 18 años.
2. Negativa a participar en el estudio.
3. Pacientes ingresados directamente en UCI con IOT en el momento del estudio por la imposibilidad de otorgar directamente consentimiento informado.
4. Pacientes de etnia no caucásica.

4.2.3 Reclutamiento

Para los casos graves: pacientes atendidos de forma consecutiva en los Hospitales San Cecilio y Virgen de las Nieves de Granada entre marzo de 2020 y diciembre de 2021 diagnosticados de infección SARS-Cov2 y COVID-19 que cumplían criterios de inclusión y daban su consentimiento para participar en el estudio.

Para los casos leves: pacientes atendidos de forma consecutiva en los puntos de atención de urgencia y Centros de Atención Primaria de la provincia de Granada que cumplieran los criterios de inclusión y accedían a participar en el estudio.

4.3 Recolección de datos

Se obtuvieron y revisaron los registros diarios de pacientes graves ingresados a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE); mediante la revisión individual de cada uno de los casos a través la base de datos hospitalaria (DIRAYA) se recogieron las características demográficas (edad, sexo), comorbilidades (HTA, diabetes, obesidad (considerada como IMC > 30 Kg/m²), cardiopatía isquémica, insuficiencia renal insuficiencia cardíaca, EPOC, asma), índices de gravedad clínica al ingreso, toma de antiagregantes, anticoagulantes, antihipertensivos (IECAs/ARA2) y patrón de severidad radiológico.

Además, se recogieron características propias de la enfermedad (tiempo de evolución, grado de afectación radiológica, así como otras manifestaciones de la misma, parámetros analíticos (PCR, ferritina, IL-6, dímero D, subpoblaciones linfocitarias, procalcitonina), los tratamientos inmunosupresores empleados al ingreso, así como los parámetros clínicos y radiológicos indicativos de gravedad (141).

Con respecto al **consentimiento informado**:

El protocolo de estudio que da base a esta tesis fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de Granada (CEI-Granada) con código interno 1329N-21. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. En esta investigación se extremaron las garantías de confidencialidad en el uso de esta información y todos los datos fueron incluidos en una base de datos anonimizada donde cada paciente estaba identificado por un registro numérico. Todos los datos han sido usados de forma agregada y en ningún caso se publicó ninguna información con carácter individual. Se ha actuado conforme a lo establecido en la Ley Orgánica 3/2018 de 5 diciembre de Protección de Datos personales y garantía de los derechos digitales.

4.4 Análisis de datos

4.4.1 Pacientes

En todos los pacientes la infección por SARS-Cov2 se confirmó mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) positiva o mediante una prueba de anticuerpos IgM positiva; e IgG positiva tras la recuperación de COVID-19. Estos criterios de inclusión se revisaban periódicamente en función de la evidencia clínica que iba apareciendo a partir de la declaración de pandemia. Para la recolección de muestras, se recolectaron muestras graves en la UCI durante su hospitalización y los grupos restantes se recolectaron en atención primaria, tras la infección por COVID-19. De cada paciente se recogieron dos tubos de sangre periférica en EDTA (anticoagulante del ácido etilendiaminotetraacético).

4.4.2 Análisis de citometría

4.4.2.1 Procesamiento de muestras de sangre total

Para el análisis de citometría de flujo las muestras de sangre se procesaron tras un máximo de 3 horas posteriores a la recolección. Las células sanguíneas se fijaron extrayendo 700 μ l de sangre y agregando 1 ml de estabilizador proteómico PROT1 (Smart Tube Inc, San Carlos, CA, EE. UU.) para incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la sangre se congeló y se almacenó a -80 °C hasta su tinción.

Después de descongelarlas a 4°C , las muestras se diluyeron en 13 ml de Thaw-Lysis Buffer 1X (Smart Tube Inc, San Carlos, CA, EE. UU.), se filtraron a través de un pluriStrainer de 100 μm (pluriSelect Life Science, Leipzig, DE) y se lisaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se sedimentaron las células, se lavaron los leucocitos con tampón de tinción celular (CST) Maxpar® (Fluidigm, San Francisco, CA, EE. UU.) y se resuspendieron en 2 ml de CST. Se contaron las muestras de sangre, repartiendo alícuotas del mismo número de células para cada muestra, $2,2 \times 10^6$ células/muestra. Todas las muestras se agruparon en un solo tubo y se añadió 1 μ l de bloque Fc (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñen los antígenos de superficie con el cóctel de anticuerpos de superficie y se incuban a 4 °C durante 30 minutos. Se lava con CST y se fija con 1 ml de PFA al 2% (solución madre de formaldehído al 16% (ThermoScientific, Rockford, IL, EE. UU.)) y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñe el ADN con solución de iridio (Ir) y se incuba durante la noche a 4 °C con 1:2000 Ir (125 μM) en tampón Fix y Perm.

4.4.2.2 Adquisición de datos

Se descongelaron las células teñidas para citometría de masas. Cada muestra se fenotipó al inicio del estudio utilizando un panel CyTOF de monocitos y macrófagos de 15 parámetros (Tabla 5). Para la adquisición de CyTOF, las muestras se lavaron en tampón de adquisición de células (CAS) Maxpar®. Antes de la adquisición, se resuspendieron 1

millón de células/ml en CAS que contenía beads EQ (1:10) y se filtraron dos veces a través de tubos con tapa de filtro celular de 35 µm. Las muestras se adquirieron a una velocidad de 250 a 300 eventos por segundo en un citómetro de masa Helios® (Fluidigm, San Francisco, CA, EE. UU.).

Tabla 5 Información de Anticuerpos

Maxpar® Human Monocyte/Macrophage Phenotyping Panel Kit			
Diana	Clon	Casa Comercial	Isótopo
CD19	HIB19	Fluidigm	142Nd
CD11b	ICRF44	Fluidigm	144Nd
CD7	CD7-6B7	Fluidigm	147Sm
CD66	CD66a-B1.1	Fluidigm	149Sm
CD36	5-271	Fluidigm	152Sm
CD163	GHI/61	Fluidigm	154Sm
CD45	HI30	Fluidigm	156Gd
CD11c	Bu15	Fluidigm	159Tb
CD14	M5E2	Fluidigm	160Gd
CD16	3G8	Fluidigm	165Ho
CD38	HIT2	Fluidigm	167Er
CD206	15-2	Fluidigm	168Er
CD33	WM53	Fluidigm	169Tm
CD3	UCHT1	Fluidigm	170Er
HLA-DR	L243	Fluidigm	174Yb

4.4.3 Análisis de datos

Los datos sin procesar se normalizaron utilizando MATLAB R2021a (MathWorks, Natick, MA, EE. UU.). Se utilizó el software GemStone™ versión 2.0.45 (Verity Software House, Topsham, ME, EE. UU.) y FlowJo versión 10.8.1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.) para analizar y limpiar los datos de CyTOF. Los archivos FCS normalizados se transfirieron al software GemStone™, que realiza un control de calidad estandarizado, automatizado y no supervisado (eliminación de cuentas y selección de singletons de alta calidad). Posteriormente, el software analizó diferentes poblaciones de

leucocitos. La reducción de dimensionalidad, el algoritmo de agrupamiento y el *heatmap* se realizaron utilizando el software de análisis de datos OMIQ (OMIQ, INC., Santa Clara, CA, EE. UU.). Además, el algoritmo del Cen-se' identifica eventos relacionados con base en la medición; los seleccionamos y los trazamos en un gráfico bivariado. Cen-se' nos permite evaluar con qué precisión nuestro modelo identifica estas células en nuestros tipos de células. También podemos examinar células que aún no pertenecen a ningún tipo celular y descubrir qué medidas las identifican (142).

4.4.4 Análisis genético

Las muestras de sangre para el análisis genético se procesaron en las siguientes 4 a 6 horas después de su recolección. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 1400 g y 4 °C durante 10 minutos. Después de la separación, las muestras de plasma se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis.

El protocolo de extracción de ADN se realizó según el protocolo del fabricante del "Real Blood DNA Kit" (Real life-science solutions, Valencia, España). Todas las muestras se estandarizaron a 20 ng/μl utilizando Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher, Waltham, MA, EE. UU.) y tuvieron valores entre 1.8 y 2.0 A280/260. El genotipado se realizó utilizando la "TaqMan® Genotyping Master Mix" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), que contiene todos los componentes esenciales (excepto sondas, y agua) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ensayos de discriminación alélica se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real del equipo 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los resultados se analizaron utilizando el software SDS versión 2.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.).

La selección de SNPs se realizó según el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica en los datos más relevantes según COVID-19 y marcadores genéticos. Además, solo se seleccionaron de la base de datos Ensembl aquellos SNP con una frecuencia alélica superior al 20% en el alelo menor (MAF) en la población caucásica (143) Finalmente, se seleccionó *ACE2* (rs2285666), *MX1* (rs469390) y *TMPRSS2* (rs2070788) para el presente análisis.

4.4.5 Análisis estadístico

Las variables de citometría de flujo continuo se transformaron en variables categóricas mediante una estrategia de agrupación. Así, las variables de citometría de flujo se dividieron en dos grupos según su mayor o menor expresión en función del valor de la mediana del número total de pacientes. Posteriormente se analizaron las variables categóricas mediante la prueba de chi-cuadrado (χ^2). Se utilizó un análisis de regresión logística (ya sea binario o múltiple) para evaluar cuál de los factores genéticos y/o de citometría de flujo podría ser determinante del riesgo de COVID-19. Se calcularon los *odds ratios* (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) con un valor de $p < 0.05$ como criterio de significancia. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 22 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.) y Graph Pad Prism versión 8.2.1 (Graph Pad Software, EE. UU.). El heatmap se creó utilizando los paquetes *tidyr* versión 1.2.0, *ggplot2* versión 3.3.6 y *forcats* versión 0.5.1 de R versión 4.1.3. Antes de generar el *heatmap*, las muestras se normalizaron utilizando el método de normalización-min-max.



5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de citometría

5.1.1. Descripción general de la población

El análisis descriptivo de los parámetros de citometría en 66 pacientes (n=34 leves y n=32 graves) con una edad promedio de 52 años, se describe en la tabla adjunta (Tabla 6). El CD45- tiene un valor estadísticamente significativo ($p=0.014$) entre pacientes leves y graves. Se describen resultados comparables para CD45- al comparar el algoritmo de Cen-se' realizado con el software GemStone™ (Figura 7). El algoritmo de Cen-se' demostró también que existen diferencias entre pacientes graves (Fig. 7A) y leves (Fig. 7B) en la población de granulocitos (Fig. 7). Un resumen de las dos poblaciones se muestra en un *heatmap* (Fig. 7C).

Tabla 6 Análisis de variables de citometría en las principales poblaciones de células de sangre periférica.

Variantes	Leve	Severa	OR	95% CI	p-valor
CD3⁺					
<22.51	16	17	0.784	0.298-2.063	0.622
≥22.51	18	15			
Granulocitos					
<54.41	18	15	1.275	0.485-3.354	0.622
≥54.41	16	17			
Células B					
<2.78	15	17	0.697	0.264-1.837	0.464
≥2.78	19	15			
Células NK					
<3.15	15	17	0.697	0.264-1.837	0.464
≥3.15	19	15			
CD45⁺					
<2.46	12	21	0.286	0.104-0.787	0.014
≥2.46	22	11			
Mo_Clásicos					
<4.82	17	16	1	0.381-2.626	1
≥4.82	17	16			
Mo_Transicionales					
<0.07	14	17	0.618	0.233-1.636	0.331
≥0.07	20	15			
Mo_No Clásicos					
<0.18	15	17	0.697	0.264-1.837	0.464
≥0.18	19	15			
CD14^{dim}					
<1.23	16	16	0.889	0.338-2.336	0.811
≥1.23	18	16			

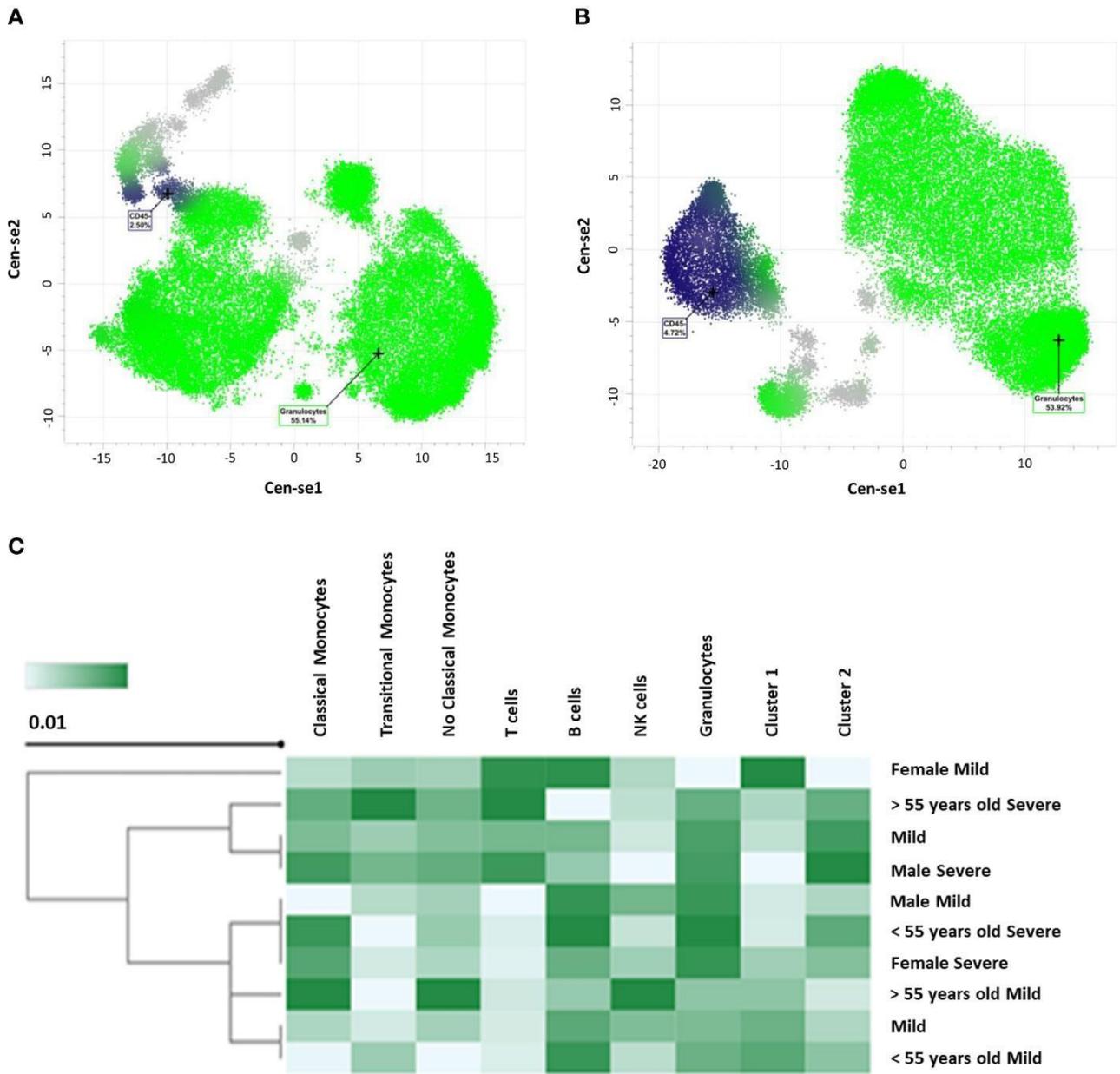


Figura 7 CD45 representado por el algoritmo de Cen-se´ con el software GemStone™.

(A) Población grave de pacientes.

(B) Población leve de muestras, (C) Representación del *heatmap* de ambas poblaciones.

5.1.2. Comparaciones de grupos de pacientes graves *versus* leves

Las frecuencias de la relación CD163+/CD206- disminuyeron en el grupo leve en comparación con el grupo grave en monocitos de transición (T-Mo), mientras que las frecuencias de CD163-/CD206- aumentaron en el grupo leve en comparación con el grupo grave (Figura 8). No se observaron diferencias entre las frecuencias de T-Mo en CD163+/CD206+ y CD163-/CD206+ Además, se encontraron diferencias en la expresión de CD11b en CD14dim-Mo en el grupo grave. Estas diferencias disminuyeron en el grupo de mujeres (F en la figura) ($p=0.0412$) cuando se realizó la agrupación en pacientes graves. CD14dim-Mo es una población de monocitos clasificada por el software GemStone™ como una comparación independiente con la población de monocitos clásica.

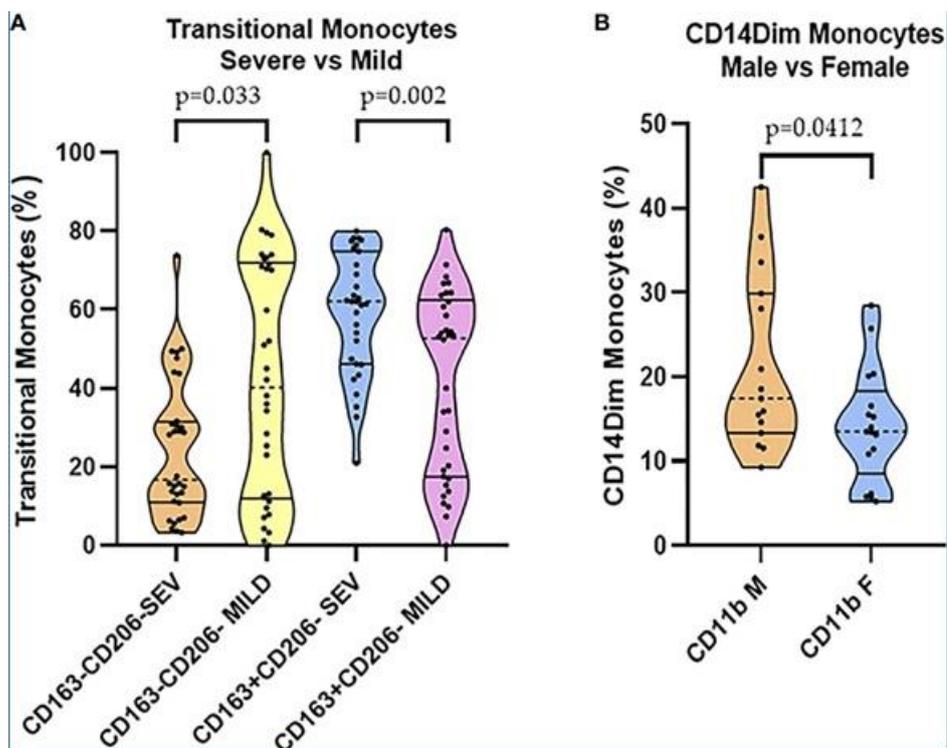


Figura 8 Comparaciones de monocitos de transición CD163+/CD206

5.1.3. Comparaciones de edad

Al comparar grupos severos, por edad, los pacientes ≥ 55 años tuvieron un aumento en algunos marcadores en el grupo de monocitos en comparación con < 55 . Por ejemplo, la expresión de CD33 fue mayor en los monocitos no clásicos (NC-Mo). Esta diferencia también se observó una cuando se analizó el CD14dim-Mo total en personas mayores de 55 años (Figura 9A-B). La expresión de HLA-DR en monocitos clásicos (C-Mo) también fue mayor en el grupo ≥ 55 (Fig. 9C). Sorprendentemente, las frecuencias T-Mo de CD163+/CD206- aumentaron en los más jóvenes, mientras que CD163-/CD206- aumentaron en los mayores (Fig. 9D). Al comparar grupos leves por edad, se encontró que T-Mo CD38 y CD11b eran buenos biomarcadores para estratificar a los pacientes, como se muestra en la Figura 9.

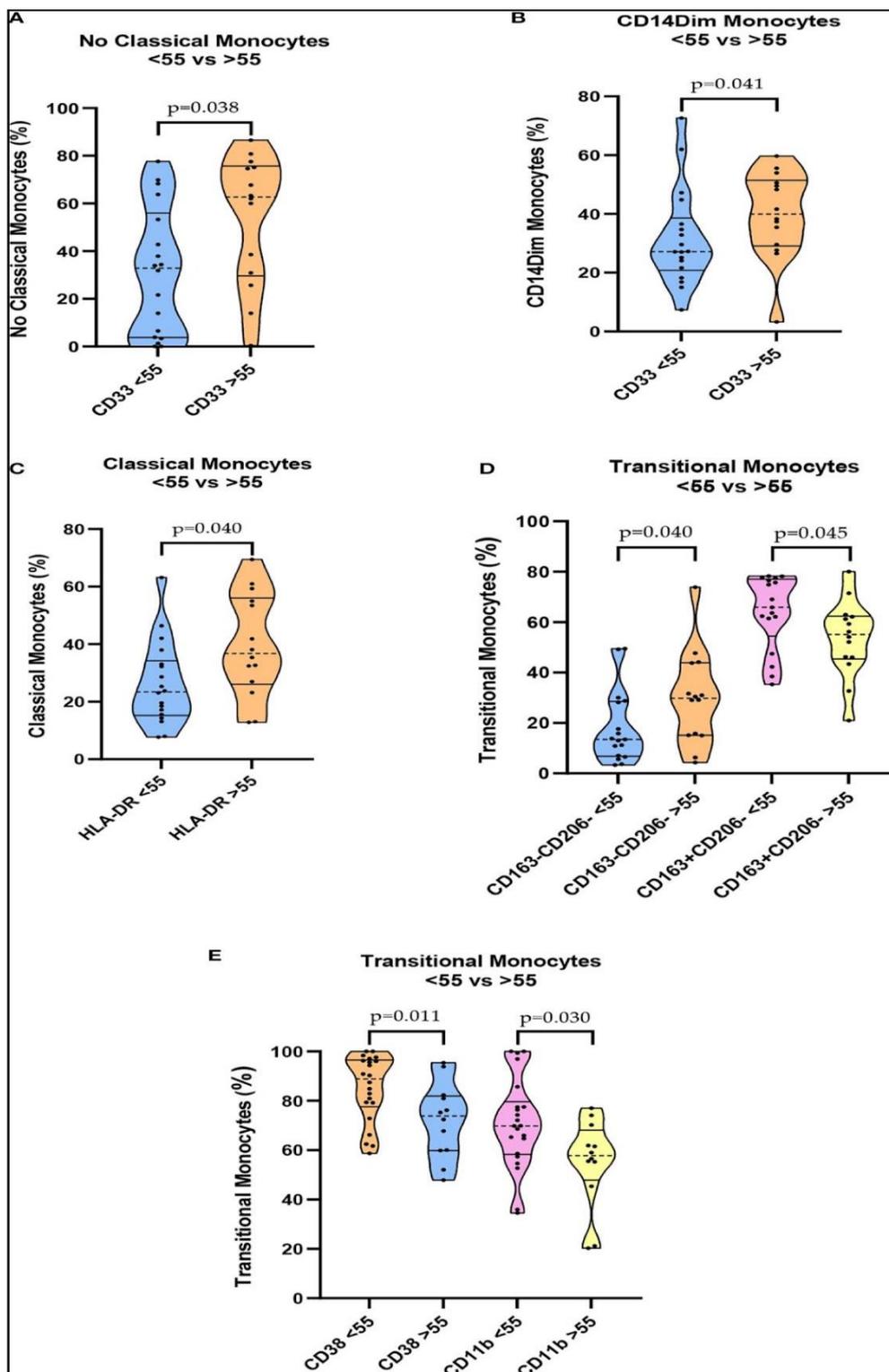


Figura 9. Análisis de citometría mediante comparaciones de edad

Entre el grupo grave: (A) Niveles de células CD33 NC-Mo. (B) Niveles de monocitos CD33 CD14dim. (C) Niveles de monocitos clásicos HLA-DR. (D) Niveles de células T-Mo CD163+/CD206-. Entre el grupo leve: (E) Niveles de CD38 T-Mo y CD11b T-Mo.

5.1.4. Comparaciones de género

En el grupo de COVID leve, se encontró diferencia en la expresión de las células NK. Las frecuencias disminuyeron en el grupo de mujeres en comparación con el grupo de hombres ($p = 0.030$) (Figura 10). La expresión de CD11b también fue mayor en C-Mo ($p = 0.043$) (Figura 10) y CD163+/CD206+ NC-Mo en hombres ($p = 0.004$) La expresión de HLA-DR en CD14dim-Mo fue menor ($p=0.009$) y las frecuencias en T-Mo de CD163+/CD206- disminuyeron en los varones ($p=0.033$).

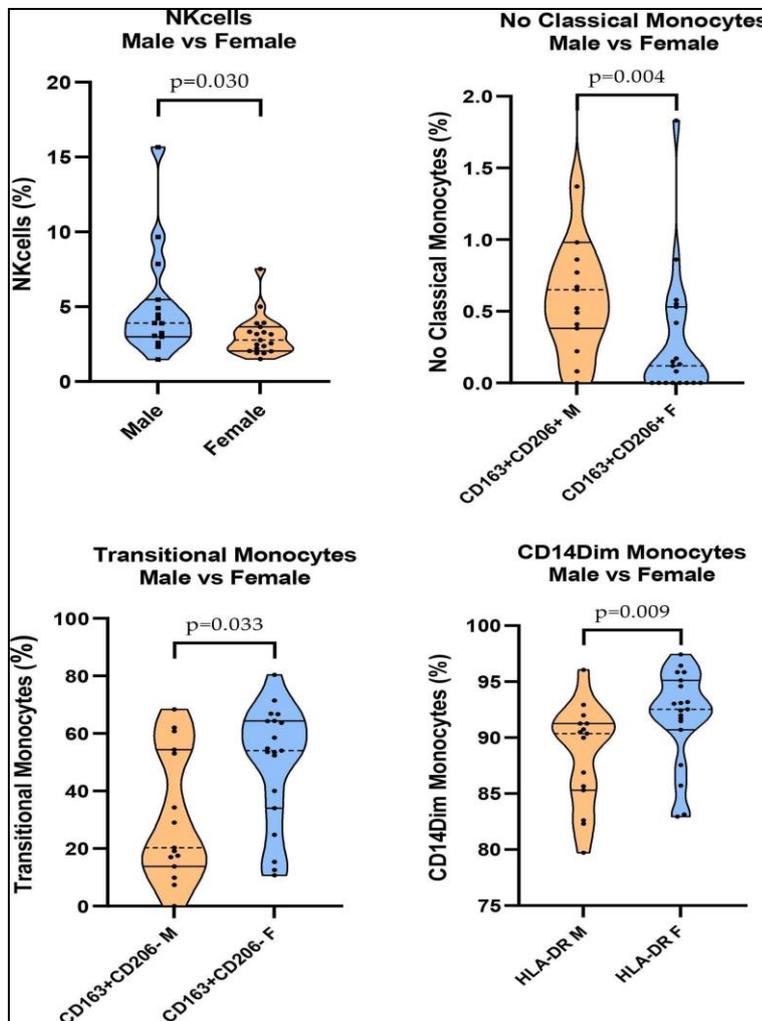


Figura 10 Comparaciones de grupos leves entre hombres y mujeres en análisis de citometría.

(A). Niveles de células NK y células NC-Mo CD163+/CD206+. (B) Niveles de monocitos de transición CD163+/CD206- y monocitos HLA-DR CD14dim.

En resumen, al comparar pacientes con COVID-19 leve *versus* grave, encontramos que el marcador CD45- ($p=0.014$; OR=0.286, IC 95% (0.104-0.787)); el T-Mo CD163+/CD206- ($p=0.049$; OR=2.692, IC 95% (0.995-7.284)) y la relación CD14dim/CD33+ ($p=0.014$; OR=0.286, IC 95% (0.104-0.787)) son las mejores opciones como biomarcadores para discriminar entre estas poblaciones. Se confirma el papel de CD38 y CD11b como buenos biomarcadores para la estratificación de pacientes mediante análisis con el software GemStone™ (Figura 11). En comparación con los monocitos clásicos, existe una clara diferencia. Esta diferencia se vuelve aún mayor cuando se incluye CD33, aunque no encontramos cambios significativos en las poblaciones de T-Mo CD33+ entre pacientes graves y leves mayores o menores de 55 años. FlowSOM admite datos de citometría de flujo en un mapa autoorganizado (SOM) como una técnica de agrupación no supervisada y reducción de dimensionalidad, entrenando una representación discretizada del espacio de entrada. FlowSOM se puede utilizar como punto de partida para el análisis o después de la activación manual para una fácil visualización de los resultados. Por lo tanto, también proporciona información sobre subpoblaciones que pueden haberse pasado por alto durante la selección manual original (144).

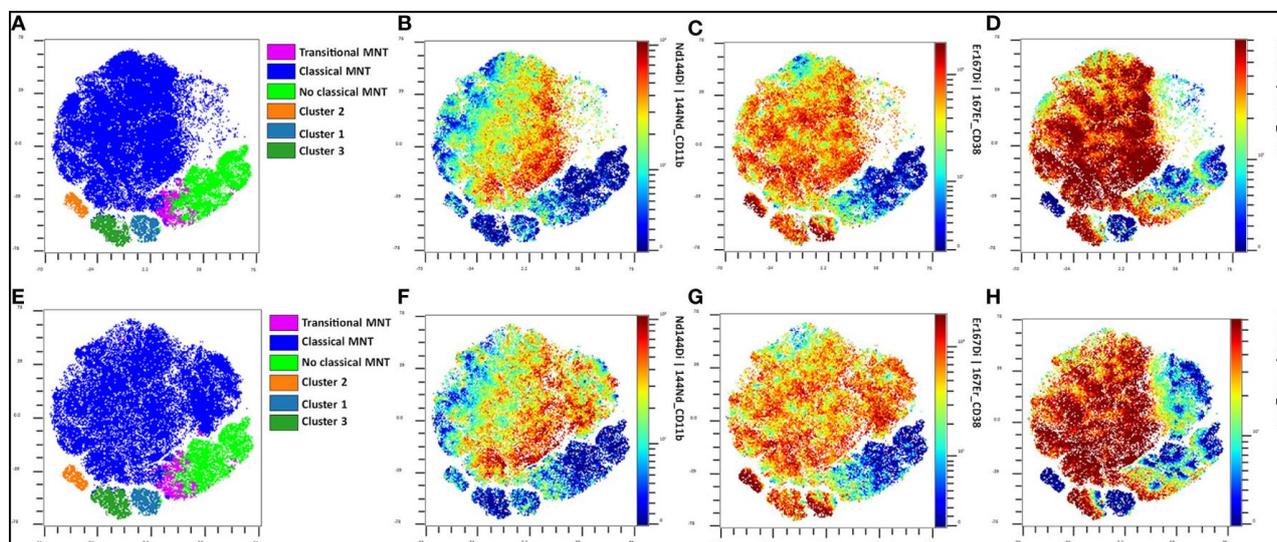


Figura 11 Gráficos de FlowSOM a partir del análisis de monocitos en pacientes leves.

(A) Gráfico FlowSOM de pacientes leves menores de 55 años. (B) Gráfico FlowSOM de pacientes leves menores de 55 años. (C) Gráfico de CD11b de pacientes leves mayores de 55 años. (D) Gráfico de CD11b de pacientes leves menores de 55 años. (E) Gráfico CD38 de pacientes leves mayores de 55 años. (F) Gráfico CD38 de pacientes leves menores de 55 años. (G) Gráfico de CD33 de pacientes leves mayores de 55 años. (H) Gráfico de CD33 de pacientes leves menores de 55 años.

5.2 Análisis genético

Se encontró que los portadores de G (*TMPRSS2* en rs2070788) tienen un mayor riesgo ($p=0.02$; OR=3.37, IC del 95% (1.18-9.60)) de tener COVID-19 grave en comparación con aquellos con AA. Además, se debe considerar que no se pudieron observar otros significados debido al tamaño limitado de la muestra para el presente análisis genético.

Curiosamente, al combinar el análisis genético con la citometría encontramos tres combinaciones con valores significativos, todas en el gen *TMPRSS2*. Solo en el modelo dominante muestra valores significativos comparando pacientes leves *versus* graves (Tabla 6); ahora esta fortaleza se refuerza al combinarse con CD45-, monocitos de transición CD163+/CD206- y CD14dim/CD33+, tal y como se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7 Comparaciones de agresividad genética y COVID-19.

Variantes	Leve	Severa	p-valor	OR	95% IC
<i>MX1_rs469390_Dom</i>					
AA	11	9	0.70	1.22	0.42-
AG + GG	23	23			3.50
<i>MX1_rs469390_Rec</i>					
GG	9	5	0.28	1.94	0.57-
AG + AA	25	27			6.59
<i>ACE2_rs2285666_Dom</i>					
CC	26	27	0.42	0.62	0.17-
CT + TT	8	5			2.08
<i>ACE2_rs2285666_Rec</i>					
CT + CC	31	30	0.69	1.45	0.22-
TT	2	3			9.30
<i>TMPRSS2_rs2070788_Dom</i>					
AG + GG	16	24	0.02	3.37	1.18-
AA	18	8			9.60
<i>TMPRSS2_rs2070788_Rec</i>					
AG + AA	30	25	0.27	0.47	0.12-
GG	4	7			1.81

Nota pie Tabla 7. Dom: modelo dominante; Rec: Modelo recesivo. O: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza.

Tabla 8. *TMPRSS2* y comparaciones de citometría en la agresividad de COVID-19.

Leve vs Severa					
Variantes	OR	95% IC	p-valor	Omnibus Test (Step/Block/Model) *	R² Nagelkerke
<i>TMPRSS2_rs2070788_Dom</i>	3.20	1.07-9.51	0.036	0.005	0.201
CD45⁻	0.30	0.10-0.85	0.025		
<i>TMPRSS2_rs2070788_Dom</i>	5.28	1.57-17.68	0.007	0.002	0.228
MT_163⁺_206⁻	4.34	1.34-13.96	0.014		
<i>TMPRSS2_rs2070788_Dom</i>	4.42	1.38-14.10	0.012	0.001	0.242
CD14^{dim}_33⁺	0.22	0.07-0.679	0.008		

Nota pie de tabla 8: * Todas las variables explicativas se agregaron en un bloque y por lo tanto tienen un solo paso. Esto significa que los valores p son los mismos para paso, bloque y modelo. Dom: modelo dominante.



6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Variantes genéticas y características celulares que se asocian con grupos riesgo de COVID-19 e identificación de marcadores genéticos, tipo SNP y celulares mediante citometría de masas que ayudan a la descripción fenotípica de COVID-19.

Actualmente no existen marcadores moleculares que claramente aporten utilidad práctica en el manejo y estratificación de los pacientes con COVID-19, al igual que ocurre en otras enfermedades víricas como las originadas por SARS y MERS. Los biomarcadores en COVID-19 pueden ser útiles en diversas áreas como la detección temprana de enfermedad, confirmación y clasificación de la gravedad, definición de los criterios de ingreso hospitalario, identificación de cohortes de alto riesgo, definición de criterios de admisión a la UCI, racionalización y evaluación de la respuesta a las terapias y definición de criterios para alta de la UCI o del hospital (145).

Describir los perfiles genéticos más sensibles a los efectos causados por el virus SARS-CoV-2 puede contribuir al manejo clínico de este y sucesores virus causantes de síndromes respiratorios agudos. Los esfuerzos preclínicos y clínicos actuales se centran en los mecanismos y manifestaciones del COVID-19, y en sus períodos presintomático y prodrómico. Los posibles efectos a largo plazo del COVID asumen una importancia cada vez mayor a medida que un número creciente de personas atendidas son dadas de alta de los centros hospitalarios, con una importa

nte carga asistencial hacia los sistemas primarios de salud pública, las familias de pacientes y la sociedad en general (146).

Todavía se desconocen todos los factores asociados a gravedad de COVID-19, que hacen que algunas personas sean más susceptibles a la infección. En los datos clínicos de nuestra cohorte analizada en las comparaciones de enfermedad asintomática frente a enfermedad grave, la edad tiene valores significativos ($p < 0.001$), oscilando pacientes graves alrededor de los 60.1 años y leves alrededor de los 45.3 años. Nuestras cifras difieren de los datos de estudios realizados en China y pueden atribuirse en parte al envejecimiento de la población en España, y a contar con datos de las fases iniciales de la pandemia y de pacientes supervivientes (1,64,76,89). Encontramos que la edad es una variable significativa y ser mayor de 55 años se asocia con un incremento de riesgo de

casos graves de COVID-19. Otros estudios publican datos en la misma línea de nuestros resultados, indicando que, si se ajustan los análisis por la gravedad de la enfermedad, las variables significativas fueron la edad mayor de 65 años, el sexo masculino, la disnea, la PCR y el dímero D elevados (10, 89, 90).

En lo que respecta a la comorbilidad, estudios previos publicados en población asiática y de Estados Unidos asocian la edad y la presencia de enfermedades cardiovasculares/respiratorias con un peor pronóstico y una mortalidad superior en varones mayores de 60 años. Estudios que analizaron cohortes de características similares a la nuestra mencionan la obesidad como comorbilidad asociada; en nuestro trabajo aparece en el 90% de los casos seleccionados con enfermedad crítica frente a ningún caso con enfermedad leve (90, 92,93).

En nuestra serie, la presencia de ageusia y anosmia aparece en proporción similar en pacientes leves y graves: ageusia (22.2% en graves y 22.2% en leves) y anosmia (19.7% en graves y 18% en leves), y a pesar de no presentar valores significativos, difiere de los datos de otras publicaciones donde se ha presentado más frecuentemente en pacientes jóvenes y en mujeres. (89)

En la comparación por grupos, parámetros clínicos como el aumento de ferritina ($p < 0.001$), dímero D ($p < 0.010$), proteína C reactiva (PCR) ($p < 0.001$) y lactato deshidrogenasa (LDH) ($p < 0.001$) presentan valores significativos. Para el dímero D hemos encontrado en 60.7% de los pacientes con enfermedad leve valores más altos (> 4.77 ng/mL) que en pacientes graves, lo cual puede sugerir poca especificidad de este marcador como biomarcador de gravedad en COVID-19 (10).

Describimos también cómo varios parámetros clínicos como la ferritina, la LDH o la PCR son buenos marcadores para discernir entre pacientes leves y graves. Informes anteriores también han apuntado valores elevados de estos biomarcadores en combinación con el recuento absoluto de neutrófilos, la proporción de neutrófilos y linfocitos (NLR) y la proporción de plaquetas y linfocitos (PLR) como biomarcadores asociados con la gravedad de la enfermedad (111-115).

Se ha constatado, como reflejan numerosos estudios, la asociación entre los factores sociodemográficos (edad y género) con los niveles de expresión genética de agresividad de COVID-19 (10). En relación con el género, desde el inicio de la pandemia se observó que los pacientes masculinos con COVID-19 y aquellos que tenían comorbilidades tenían más probabilidades de ser hospitalizados. En estudios recientes, se ha observado que

una edad más joven y niveles de expresión más elevados del gen *ERG* (asociado también a un riesgo de cáncer de próstata), aumentaron el riesgo de COVID-19 grave. En el caso de RA (receptor de andrógenos), mayores niveles de expresión se relacionan con un menor riesgo de enfermedad grave por COVID-19 en los casos femeninos (10)

La recopilación de datos para este trabajo se inició cuando no existía vacunación frente a COVID-19 y se trataba de buscar datos relacionados con la protección de la vacunación previa frente a influenza. Aunque existen datos controvertidos sobre la protección de la vacuna contra la influenza frente a COVID-19, aquí no encontramos ningún papel de protección representativo. Otros estudios realizados sobre coadministración de vacunas contra la influenza y COVID-19 difirieron en sus apreciaciones y cuestionan la inmunogenicidad y la respuesta serológica de la coadministración (145, 146, 147). Así, Stefanizzi *et al.*, evalúan la administración simultánea de la tercera dosis anti-SARS-CoV-2 y la vacuna contra la gripe e informan de una diferencia estadísticamente significativa de la variación de anticuerpos IgG antiproteína pico (S) entre la evaluación serológica un mes después de la coadministración de la tercera dosis y la evaluación serológica un mes después de la administración independiente de la vacuna frente a SARS-Cov-2 (145). Yiwen *et al.*, sugieren que la eficacia de la vacuna podría ser modulada por la inmunidad inducida por la vacuna y concluyen que las investigaciones deberían centrarse en la inducción de respuestas de células T con reacción cruzada y respuestas de células B *naïf* para superar los efectos del propio sistema inmunológico (147).

La COVID-19 es una patología reciente, que ha centrado gran parte de la investigación en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico eficiente o la estratificación de pacientes. La edad (148), la SpO₂(149), la albúmina (150) y el dímero D (151,152) se demostraron como predictores independientes de mortalidad en pacientes con COVID-19 en diferentes estudios. Existen datos sobre la capacidad predictiva de la mortalidad en pacientes hospitalizados utilizando una clasificación de puntuación que combina la saturación de oxígeno capilar periférico, la albúmina, el dímero D y la edad (153). Algunos parámetros de laboratorio como la proporción de neutrófilos y linfocitos (154), PCR, IL-6 y niveles de dímero D (155) se muestran como indicadores de gravedad de la COVID-19 cuando se asocian a ciertas características clínicas de la infección. Los pacientes con COVID-19 hospitalizados en la UCI muestran niveles aumentados de citocinas inflamatorias y biomarcadores de infección, como interleucina (IL)-1B, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, interferón (IFN)- γ , proteína inducible por interferón gamma (IP-10), proteína

quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)1A, MIP1B, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Además, IL-2, IL-7, IL-10, IP-10, MCP1, MIP1A y TNF aumentan en pacientes de UCI en comparación con pacientes que no están en UCI (156). Debemos destacar que existen informes sobre la presencia de linfopenia y niveles reducidos de células T supresoras, reguladoras y de memoria en aquellos pacientes con infección grave por COVID-19(157). Otro estudio que se centra en biomarcadores neuroendocrinos como la coceptina describe un aumento de este marcador en los casos graves (158).

Conocer la vía de entrada del virus a las células huésped supuso un desafío desde el inicio de la pandemia. Se ha puesto mucho interés en estudiar la serín-proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2), involucrada en el cebado de la proteína S viral, mediando así la escisión de esta espícula viral (10). Matsuyama *et al.*, demostraron que *TMPRSS2* favorece la infección por SARS-CoV-2 mediante el uso de células que expresan este receptor (159). Una de las principales estrategias para combatir el virus es evitar la fusión del virus en los receptores celulares, motivo por el cual hemos centrado este trabajo en genes relacionados con el dominio de unión al receptor objetivo de la proteína Spike. Este trabajo de investigación ha encontrado el papel de los portadores del alelo G *TMPRSS2* (rs2070788) como una forma interesante y poco compleja para clasificar a los pacientes graves con COVID-19. Este marcador ya fue mencionado previamente por Akin *et al.*, (160) quienes identificaron altos niveles de ACE2 soluble, así como el genotipo AA *TMPRSS2* rs2070788 y la baja relación aldosterona/renina como factores independientes de la gravedad de la enfermedad. La ACE2 es el receptor responsable de la unión del coronavirus, mientras que la entrada celular posterior depende del cebado por la serina proteasa. *TMPRSS2*, por tanto, es la principal proteasa del huésped que permite la entrada celular de varios coronavirus y se expresa en gran medida en tejidos pulmonares y bronquiales. Existen estudios que sugieren que el genotipo *TMPRSS2* rs75603675 combinado con la dislipidemia y el género son los principales predictores de la gravedad de la enfermedad (161). Este gen actúa conjuntamente con *ACE2* y ambos se han incluido como los dos principales factores del huésped que contribuyen a la virulencia y patogénesis del SARS-CoV-2. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *TMPRSS2* se han asociado con la susceptibilidad y la gravedad de las

infecciones por el virus de la influenza A H1N1 o H1N9. Las variantes funcionales también pueden influir en el riesgo de infección por SARS-CoV-2 y la gravedad de la COVID-19. Se sabe que el SARS-CoV-2 utiliza ACE2 como un sitio de escisión para la proteína S-pico con la ayuda de TMPRSS2 (162). En el presente estudio no se han encontrado diferencias entre la gravedad de la COVID-19 y los genes *MX1* o *ACE2*.

Los humanos codifican dos proteínas MX diferentes, *MX1* y *MX2*, que difieren considerablemente en las especificidades y mecanismos virales de acción. *MX1* codifica una proteína con actividad antiviral frente a virus de ARN y ADN. Específicamente, *MX1* tiene un efecto directo sobre el complejo de ribonucleoproteína viral y su actividad GTPasa es esencial para su función antiviral. Una mayor expresión de *MX1* se correlacionó con una mejor respuesta a la pandemia de influenza A H1N1 en 2009. Existen estudios que refieren alta expresión de *MX1* en pacientes con COVID-19 y destacan al *MX1* como una respuesta sólida al SARS-CoV-2, señalando la relevancia de aumentar estudios que evalúen medicamentos aprobados capaces de aumentar la expresión de *MX1* para detener la infección (163), pero en este estudio no encontramos una correlación. También existen proteínas como la enzima convertidora de angiotensina 2 (*ACE2*) cuyo patrón de alta expresión se asocia con un mayor riesgo de infección grave y complicaciones en COVID-19 (10).

Se ha sugerido que polimorfismos funcionales de los genes *ACE1/ACE2* pueden conducir al desequilibrio entre la relación *ACE/ACE2* y generar así un desequilibrio RAS que se asocia con mayores grados de daño pulmonar en el SDRA que puede contribuir al resultado de la infección por COVID-19. *ACE2* y especialmente varios SNP, como rs4646994 y rs2285666, se correlacionan con la susceptibilidad al COVID-19 y/o la gravedad de la enfermedad, pero se han informado datos controvertidos sobre estos dos SNP. Así, un estudio el estudio indicó el papel de la edad, la PCR, el NLR y el SARS-CoV-2 en la susceptibilidad a la gravedad de la COVID-19, sin embargo, el análisis de las variantes de los genes *ACE* y *ACE2* (rs4646994 y rs2285666, respectivamente) mostró que las dos variantes no estaban asociadas con el riesgo de desarrollar COVID-19 (164). Los estudios de Alimoradi *et al.*, (165), junto con los datos actuales sugieren que no existe una asociación entre rs2285666 y la gravedad de COVID-19. Además, el análisis presentado en este trabajo aprovechó el poder de la tecnología CyTOF, que actualmente es una de las herramientas más poderosas para el fenotipado inmunológico, que permite

la cuantificación simultánea y de alto rendimiento de más de 40 parámetros a nivel de una sola célula (123,134). Actualmente existen pocos estudios que utilicen esta tecnología para caracterizar las respuestas de las células inmunes contra el SARSCoV-2, como se hace en el presente trabajo. Wen *et al.*, revelan el agotamiento de las células T CD4+, la diferenciación de las células T, la expansión de las células plasmáticas y la capacidad reducida de presentación de antígenos de la inmunidad innata, por lo que COVID-19 induce una desregulación en el equilibrio de las poblaciones de monocitos mediante la expansión de los subconjuntos de monocitos (166). Este trabajo también se ha centrado en el papel de los monocitos, en particular de las poblaciones CD163-/CD206- y CD163+/CD206, como principales marcadores de discriminación entre pacientes graves y leves. Un estudio realizado por Trombetta *et al.*, (167) también sugiere patrones de expresión aumentados de CD163 y CD206 como marcadores inmunorreguladores en COVID-19. Los niveles elevados de CD163 se correlacionaron positivamente con la expresión de ACE2, y CD163 contribuye indirectamente a la respuesta antiinflamatoria. Además, se encontró una mayor expresión de la proteína ACE2 en la enfermedad grave por COVID-19, lo que se correlaciona con mayor infiltración de macrófagos y microtrombos, lo que sugiere mayor gravedad de la enfermedad (168). CD163, debido a su alta expresión en macrófagos formados en respuesta al daño tisular, es un biomarcador de inflamación potencial y una diana terapéutica (169). En este estudio se confirma su posición en pacientes graves con COVID-19.

También se informa del papel de CD33 C- Mo asociado con pacientes graves en comparación con la edad. Los datos previos han demostrado que las pDC (CD33- HLA-DMA- CD14+) y C-Mo (CLEC10A- S100A9lo) están involucradas en la persistencia viral y en la respuesta inmune innata contra la infección por SARS-CoV-2. Wang, *et al.* (170) sugirieron que el enriquecimiento de (CD33- HLA-DMA- CD14+) C-Mo se asocia con la persistencia viral y puede atenuar la presentación de antígenos y la respuesta inmune antiviral, lo que también puede explicar los datos actuales en pacientes graves. Estos hallazgos pueden mejorar nuestra comprensión de la inmunopatogénesis de la COVID-19 y ayudar a desarrollar nuevas estrategias contra la infección por SARS-CoV-2.

Durante la inflamación y la infección muchas células diferentes se expanden, incluidas las células supresoras monocíticas derivadas de mieloides (M-MDSC), caracterizadas

por los marcadores de superficie CD33+CD11b+HLA-DR-CD14+ y las MDSC polimorfonucleares de baja densidad (PMN-MDSC), caracterizado por los marcadores de superficie CD33+CD11b+HLA-DR-CD66b+. Estas células mieloides poseen efectos supresores sobre las respuestas inmunes innatas y adaptativas, modulando citoquinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Alberca *et al.*, (171) propusieron una combinación de los marcadores celulares CD11b+ CD33+ HLA-DR-CD14+ y CD11b+ CD33+ HLA-DR-CD66b+ como nuevos biomarcadores de gravedad para COVID-19.

En el presente estudio encontramos la presencia de marcadores celulares CD33+, CD11b+ en la sangre de pacientes con enfermedad grave. Otros autores también han descrito el CD11b+ (macrófagos y neutrófilos) con altos niveles de infiltración celular en los pulmones (169), de un modo frecuente en pacientes graves.

6.2 Biomarcadores para desarrollar un algoritmo de decisión que contemple las variables clínicas, celulares y genéticas con la mala respuesta y agresividad de COVID-19.

Las oportunidades para realizar enfoques de medicina de precisión dirigidos, medidos y basados en biomarcadores están limitadas actualmente por una comprensión incompleta de la patogénesis y la heterogeneidad entre pacientes con enfermedades graves. Si nos centramos en el tratamiento de la COVID-19 grave, actualmente está limitado por la heterogeneidad clínica y la descripción incompleta de biomarcadores inmunitarios específicos. Los factores predisponentes incluyen edad, sexo, origen étnico, obesidad y comorbilidades.

En este trabajo encontramos que la relación CD14dim/CD33+ son buenas opciones como biomarcadores para la estratificación de COVID-19 leve/grave. De manera similar, estudios previos describen que la regulación positiva de C-Mo y, en particular, un mayor número de células CD14+ CD33+ HLA-DR y S100A8/9/12 que expresan C- Mo están presentes en COVID-19 grave/crítico y sepsis (172).

En la fase aguda, Fahlberg *et al.* (169) mostraron una fuerte migración de monocitos que expresan CD16 al pulmón y describieron dos subconjuntos de macrófagos intersticiales (HLA-DR+CD206-) directamente asociados con los niveles plasmáticos de IL-6. Además, los macrófagos alveolares en lesión pulmonar aguda con hiperplasia de células alveolares tipo II mostraron un fenotipo característico (CD68, CD11c, CD14, CD205, CD206, CD123/IL3AR y PD-L1) (173).

Al igual que en nuestro análisis en la población grave, los estudios consultados describen además de los mencionados anteriormente, marcadores de células CD206, en combinación con CD80, que se han clasificado como un subconjunto de monocitos inflamatorios que normalmente no se observa en controles sanos (174). CD45 es una glicoproteína transmembrana y una proteína tirosina fosfatasa expresada en la superficie de todas las células hematopoyéticas nucleadas. Además, el CD45- parece ser un buen marcador entre pacientes leves y graves. Si bien cada vez hay más pruebas que demuestran la participación de CD45 en la regulación del sistema inmunológico. Se han informado resultados similares previamente por Jin *et al.* (175) quienes sugirieron el

CD45 como una herramienta útil para discriminar entre casos graves y no graves. Además, publicaciones recientes realizadas en pacientes sanos frente a pacientes con COVID-19 informaron que la expresión de CD45 en leucocitos está alterada en pacientes con COVID-19. Los resultados confirmaron que la disfunción del sistema inmunológico es una causa potencial de mortalidad después de la infección por COVID-19, especialmente en ancianos. La deficiencia de CD45 altera los linfocitos T vírgenes y de memoria, lo que puede afectar la eficacia a largo plazo de las vacunas COVID-19. Los valores de CD45 podrían ser útiles para distinguir entre casos graves y no graves en las primeras etapas de la infección. Quizás CD45 podría aumentar la sensibilidad diagnóstica. Este evento se explica por los cambios en la transducción de señales de la unión al receptor tipo Toll 4, los cambios en los subtipos de leucocitos o la maduración de las células durante el proceso de infección (176). Se ve reforzado por el importante papel que juega CD45 en eventos autoinmunes y oncológicos, pero también en infecciones virales (175). Según el sexo, encontramos diferencias en las poblaciones de NK y monocitos (C-Mo, T-Mo y NC-Mo). En varios estudios, características de pacientes como el sexo masculino, la edad avanzada y la presencia de comorbilidades se han asociado con un mayor riesgo de COVID-19 grave e ingreso en la UCI y fallecimiento (177). Sin embargo, esta es la primera vez que se informan diferencias en los marcadores inmunológicos entre hombres y mujeres. La morbilidad se podría reducir añadiendo a la identificación temprana y completa de los factores de riesgo y los sistemas de alerta, los marcadores inmunológicos detectados.

Fortalezas y debilidades de este trabajo de investigación

Una de las mayores fortalezas de esta tesis de investigación reside en el hecho de que el tiempo de seguimiento de las cohortes ha sido paralelo al curso de la pandemia mundial de COVID-19, y al análisis genético innovador realizado con tecnología CyTOF. Los análisis se han realizado a partir de datos clínicos en vivo recopilados directamente por personal sanitario y han sido almacenados *in situ*. La técnica de análisis del estudio permite una mayor precisión (en exposiciones raras y en factores múltiples) y una detección de señales importantes. Uno de los desafíos del presente proyecto se debe al tamaño limitado del análisis poblacional, sin embargo, el uso de análisis de alto

rendimiento, como la citometría de masas CyTOF proporciona información novedosa a los datos actuales.

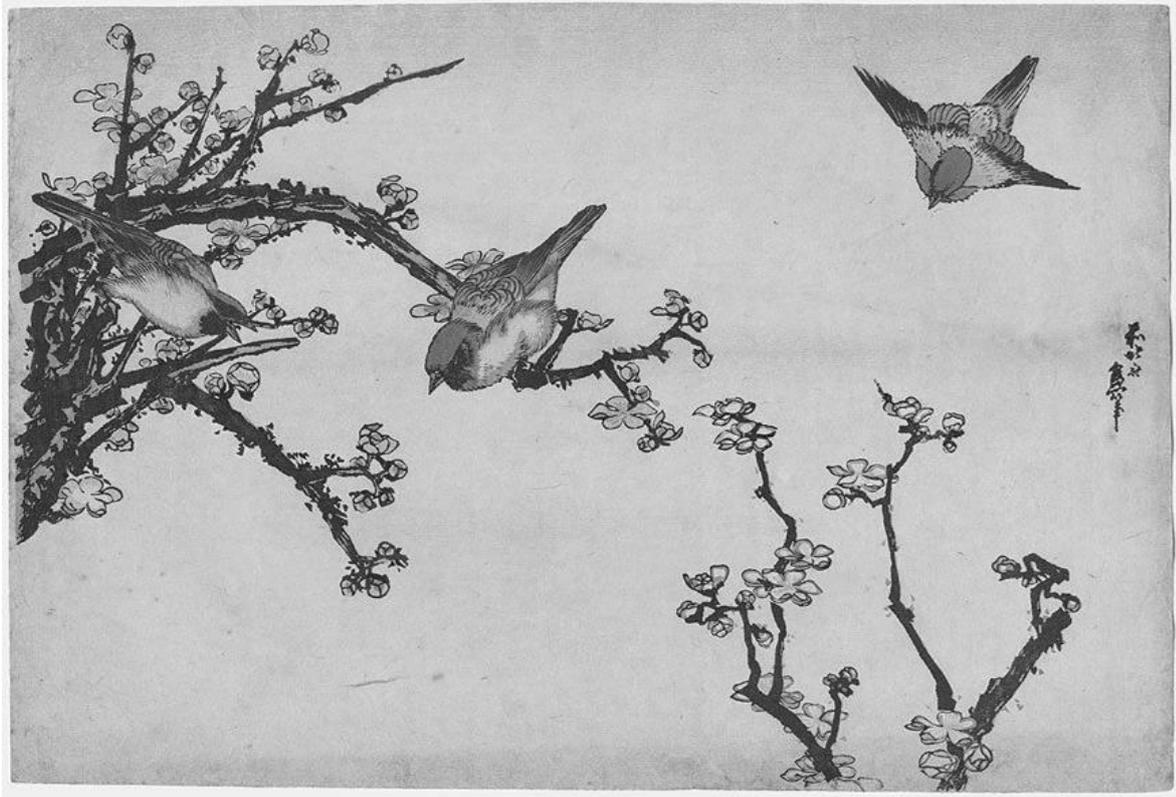
Una de las limitaciones principales ha sido la selección de las muestras, condicionada por las restricciones y limitaciones de movilidad para las personas durante las diversas fases de la pandemia; este aspecto puede haber condicionado que un elevado porcentaje de pacientes asintomáticos o paucisintomáticos no haya contactado con los servicios sanitarios. En la definición se incluyeron casos asintomáticos y clínicamente sospechosos, confirmados a posteriori por laboratorio mediante serología positiva SARS-Cov2, debido a que no se le había asignado el diagnóstico de COVID-19 al inicio de la pandemia y no se habían realizado pruebas de detección en fase preclínica. Su inclusión puede haber dado lugar a un sesgo de selección no sistemático y que algún grupo de pacientes esté infra o sobreestimado, pero contribuye a trazar un perfil más real de los infectados durante la fase inicial de la pandemia en 2020, durante el confinamiento, con limitaciones de accesibilidad a los servicios sanitarios. Creemos que nuestra cohorte representa el perfil de pacientes con un estado final moderado-grave entre todos los afectados por COVID-19. Dado que las muestras clínicas se empezaron a tomar desde el inicio de la pandemia y especialmente en las etapas iniciales de la misma, es posible que muchos casos graves no se hayan incluido en la muestra. No se han incluido pacientes que en el momento del estudio no podían dar el consentimiento informado ni muertes relacionadas con la COVID-19 por el mismo motivo; sin embargo, es probable que esta inexactitud se haya reducido con el avance de la pandemia, la disminución del número de muertes y la inclusión de datos de supervivientes. El grado de infravaloración de estos resultados, siempre que no esté relacionado con las características genéticas de los pacientes, no debería haber sesgado nuestros índices de riesgo. Debido a la rareza del resultado, las asociaciones observadas estarán impulsadas principalmente por el perfil de las características analizadas de los casos incluidos. Nuestros hallazgos suponen una aproximación de la determinación de la agresividad de la infección por SARS-Cov-2 a partir de la detección de biomarcadores en muestras de sangre.



7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Este trabajo demuestra la existencia de un papel relevante de los marcadores *TMPRSS2*, CD45-, CD163/CD206 y CD33 en la gravedad de pacientes con COVID-19.
2. Las combinaciones de los biomarcadores de agresividad *TMPRSS2* y CD45-, *TMPRSS2* y CD163/CD206; *TMPRSS2* y CD14dim/CD33+ mejoran la capacidad para clasificar de forma óptima a los pacientes con COVID-19 grave y podría ayudar al personal clínico a ofrecer estrategias de estratificación y seguimiento.
3. Por primera vez se informa de una combinación de marcadores detectables en sangre y que pueden ayudar a la clasificación por gravedad de pacientes COVID-19.
4. En tanto que la infección por SARS-Cov-2 persista, existe una necesidad urgente de ampliar la investigación sobre coronavirus potencialmente emergentes. Se requieren más estudios que establezcan la correlación de biomarcadores con las características clínicas, radiológicas, la carga viral, y el efecto de tratamientos disponibles.
5. Comprender las interacciones inmunes entre el SARS-Cov-2 y el huésped puede proporcionar información útil para desarrollar terapias dirigidas inmunomoduladoras y antivirales que puedan mitigar la gravedad de la infección y limitar la propagación del virus. Este conocimiento contribuye a identificar posibles objetivos terapéuticos y diseñar intervenciones preventivas eficaces.
6. Los temas tratados en este trabajo de investigación requieren una reevaluación constante a medida que se publica más evidencia en todo el mundo. La evaluación continua de la interacción del virus con el huésped permite la gestión más eficaz del SARS-CoV-2, de COVID-19 y de futuras pandemias.



8. COMENTARIOS FINALES

8. COMENTARIOS FINALES

8.1 Publicaciones asociadas a la Tesis

A continuación se presenta la publicación científica derivada del trabajo realizado en esta tesis, en revista internacional de investigación de alto impacto (JCR1)

Nos gustaría destacar otras publicaciones que se han realizado durante el desarrollo de la misma con otros investigadores de diversas áreas de conocimiento, lo que ha propiciado publicación de 2 de publicaciones en revista internacionales de impacto y la presentación en congresos nacionales de diversas áreas de conocimiento

Se ha presentado en reuniones científicas del Ibs y en Meet up Covid: 3º MeetUp ‘¿Qué fue de la investigación en Covid 19?’ y en la 3ª Jornada Científica del Ibs ‘In-depth characterization of the white series of patients with COVID-19 pathology for screening for aggressiveness PECOVID-0006-2020 / research project y en el debate de redacción médica Debate del ciclo 'Dos años del coronavirus', en la semana de Innovación científica del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Es motivo de satisfacción comprobar como el impacto de esta tesis y su difusión por diversos canales de difusión académica han podido contribuir al avance de la investigación objeto de este estudio.

Publicaciones que soportan la tesis:

- Martínez-Diz, Silvia *et al.* “Relevance of *TMPRSS2*, *CD163/CD206*, and *CD33* in clinical severity stratification of COVID-19.” *Frontiers in immunology* vol. 13 1094644. 8 Mar. 2023, doi:10.3389/fimmu.2022.1094644

Colaboración en temáticas relacionadas con la tesis

- Martínez-Diz, Silvia *et al.* “Analyzing the role of *ACE2*, *AR*, *MX1* and *TMPRSS2* genetic markers for COVID-19 severity.” *Human genomics* vol. 17, 1 50. 7 Jun. 2023, doi:10.1186/s40246-023-00496-2

- Rivera-Izquierdo, Mario *et al.* "Therapeutic agents tested in 238 COVID-19 hospitalized patients and their relationship with mortality." *Medicina clínica (English ed.)* vol. 155,9 (2020): 375-381. doi:10.1016/j.medcle.2020.06.024
- Ortega Páez, Eduardo, y Callejas Pozo, José Emilio, y Almazán Fernández de Bobadilla, M^a Vega, y Garach Gómez, Ana, y Santos Pérez, Juan Luis, y Jordano Moreno, Belén, y Sevilla Pérez, Belén, y Martínez Diz Silvia. "¿Es posible ofrecer un algoritmo de decisión clínica en la enfermedad COVID-19 en Atención Primaria?" *Pediatría Atención Primaria*, vol. XXII, no. 88, 2020, pp.423-433. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=366669842022>
- Aomar-Millán, Ismael Francisco *et al.* "Characteristics and clinical outcome in 312 patients with moderate to severe pneumonia due to SARS-COV-2 and hyperinflammation treated with anakinra and corticosteroids: A retrospective cohort study." *PloS one* vol. 18,3 e0283529. 24 Mar. 2023, doi:10.1371/journal.pone.0283529
- Aomar-Millán, Ismael F *et al.* "Dexamethasone versus weight-adjusted methylprednisolone in patients with moderate-severe SARS-CoV-2 pneumonia." "Dexametasona frente a metilprednisolona ajustada al peso en pacientes con neumonía moderada-grave por SARS-CoV-2." *Medicina clínica* vol. 160,4 (2023): 156-159. doi: 10.1016/j.medcli.2022.06.015

8.2 Líneas futuras de investigación

- Desarrollo de una herramienta de ayuda a la decisión que permita guiar la toma de decisiones por parte de profesionales sanitarios. El objetivo final es generar una herramienta asistencial para su aplicación en la clínica diaria. En primer lugar, y utilizando técnicas de aprendizaje automatizado (*machine learning*) su buscará desarrollar un clasificador que pueda aprender cuál es el mejor itinerario para el tratamiento y clasificación de pacientes que sufran o sean sospechosos de sufrir COVID-19 grave. En este punto serán fundamentales, entre otros, los datos genotípicos y fenotípicos recogidos mediante nuestra aplicación web y los datos existentes en bases de datos públicas de enfermos de COVID-19. Una vez

desarrollado el clasificador, se implementará una herramienta amigable para los profesionales para proponer el itinerario de tratamiento y clasificación más óptimo para cada paciente

- Definir la correlación con características clínicas patológicas de pacientes y su la progresión de la enfermedad a síndrome covid post-agudo o COVID-19 persistente.

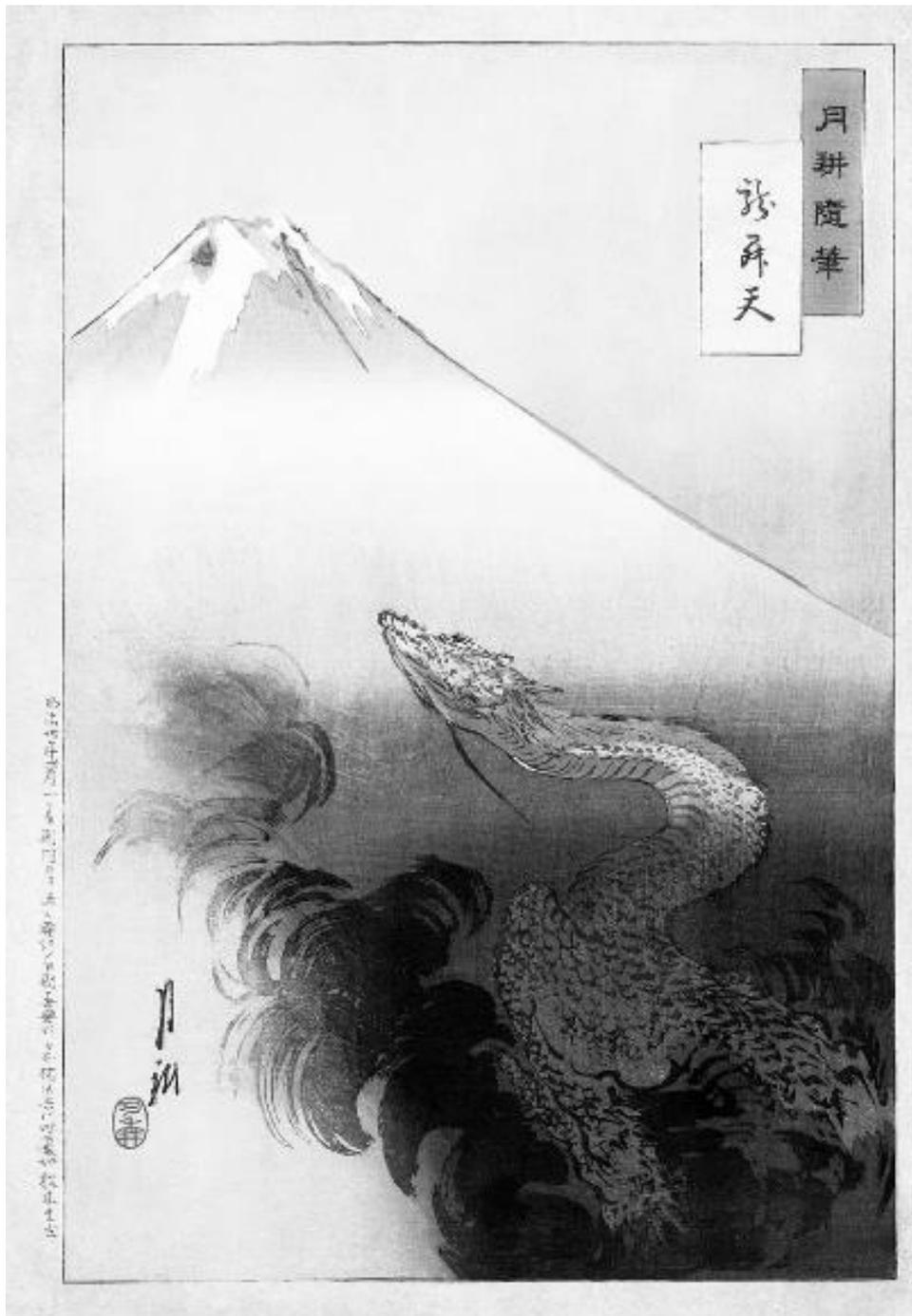
Agradecimientos

Para el desarrollo de esta tesis ha sido fundamental disponer de los datos de pacientes tratados por el Servicio Andaluz de Salud, por ello queremos agradecer la colaboración de todos los pacientes que han donado sus muestras y del personal sanitario de los centros de la Junta de Andalucía: Hospital Universitario San Cecilio, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, y Distrito Sanitario Granada-Metropolitano que han contribuido con su trabajo en la obtención de muestras, así como al Centro Pfizer Universidad de Granada Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO), unidad de Genómica y unidad de Citometría y flujo de masas, por su inestimable colaboración a esta investigación.

El desarrollo de esta tesis ha sido financiado por:

- La Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía, en base a las Subvenciones para la financiación de las Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) en Biomedicina y en Ciencias de la Salud en Andalucía (Código procedimiento: 22389).
- Línea de subvención: Línea de proyectos de investigación, desarrollo e innovación en Biomedicina y Ciencias de la Salud, con cargo a la ayuda titulada: *PECOVID-0006-2020*. Caracterización profunda de la serie blanca de pacientes con patología COVID-19 para su cribado por agresividad.





REFERENCIAS Y ANEXOS

9. REFERENCIAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 20 de febrero de 2020;382(8):727-33.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. marzo de 2020;579(7798):270-3.
3. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. abril de 2020;92(4):418-23.
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. abril de 2020;5(4):536-44.
5. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. marzo de 2020;579(7798):265-9.
6. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet Lond Engl*. 22 de febrero de 2020;395(10224):565-74.
7. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. junio de 2009;7(6):439-50.
8. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 16 de abril de 2020;181(2):271-280.e8.
9. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*. 1 de diciembre de 2020;41(12):1100-15.
10. Martínez-Diz, S., Morales-Álvarez, C.M., García-Iglesias, Y. *et al.* Analyzing the role of *ACE2*, *AR*, *MX1* and *TMPRSS2* genetic markers for COVID-19 severity. *Hum Genomics* **17**, 50 (2023). <https://doi.org/10.1186/s40246-023-00496-2>
11. Wu HY, Brian DA. Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci*. 6 de julio de 2010;107(27):12257-62.
12. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 13 de marzo de 2020;367(6483):1260-3.
13. Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLOS Pathog*. 21 de agosto de 2020;16(8):e1008762.

14. Snijder EJ, Van der Meer V, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JM, Van der Meulen K, Mieke A. Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex. *Journal of Virology* 2006; 80 (12) <https://doi.org/10.1128/jvi.02501-05>
15. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* febrero de 2022;23(2):165-76.
16. Gray GC, Robie ER, Studstill CJ, Nunn CL. Mitigating Future Respiratory Virus Pandemics: New Threats and Approaches to Consider. *Viruses.* abril de 2021;13(4):637.
17. Girija ASS, Shankar EM, Larsson M. Could SARS-CoV-2-Induced Hyperinflammation Magnify the Severity of Coronavirus Disease (CoViD-19) Leading to Acute Respiratory Distress Syndrome? *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado 20 de abril de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01206>
18. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J.* marzo de 2016;10(3):609-20.
19. Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* 15 de marzo de 2020;16(10):1686-97.
20. Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet.* 25 de octubre de 2003;362(9393):1353-8.
21. Updated Information on the Epidemiology of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection and Guidance for the Public, Clinicians, and Public Health Authorities, 2012–2013 [Internet]. [citado 22 de abril de 2023]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/54730>
22. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 1 de marzo de 2020;55(3):105924.
23. Zhao J, Cui W, Tian B ping. The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [citado 22 de abril de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.580137>
24. Dos Santos Bezerra R, Valença IN, de Cassia Ruy P, Ximenez JPB, da Silva Junior WA, Covas DT, et al. The novel coronavirus SARS-CoV-2: From a zoonotic infection to coronavirus disease 2019. *J Med Virol.* 2020;92(11):2607-15.
25. Liu P, Jiang JZ, Wan XF, Hua Y, Li L, Zhou J, et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLOS Pathog.* 14 de mayo de 2020;16(5):e1008421.
26. Liu Z, Xiao X, Wei X, Li J, Yang J, Tan H, et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. *J Med Virol.* 2020;92(6):595-601.

27. Alon R, Sportiello M, Kozlovski S, Kumar A, Reilly EC, Zarbock A, et al. Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. *Nat Rev Immunol.* enero de 2021;21(1):49-64.
28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* junio de 2020;20(6):363-74.
29. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *The Lancet.* 24 de mayo de 2003;361(9371):1767-72.
30. Rodriguez JA, Gonzalez J, Arboleda-Bustos CE, Mendoza N, Martinez C, Pinzon A. Computational modeling of the effect of five mutations on the structure of the ACE2 receptor and their correlation with infectivity and virulence of some emerged variants of SARS-CoV-2 suggests mechanisms of binding affinity dysregulation. *Chem Biol Interact.* 1 de diciembre de 2022; 368:110244.
31. Zahradník J, Marciano S, Shemesh M, Zoler E, Harari D, Chiaravalli J, et al. SARS-CoV-2 variant prediction and antiviral drug design are enabled by RBD in vitro evolution. *Nat Microbiol.* septiembre de 2021;6(9):1188-98.
32. Kim S, Liu Y, Lei Z, Dicker J, Cao Y, Zhang XF, et al. Differential Interactions between Human ACE2 and Spike RBD of SARS-CoV-2 Variants of Concern. *J Chem Theory Comput.* 14 de diciembre de 2021;17(12):7972-9.
33. Isabel S, Graña-Miraglia L, Gutierrez JM, Bundalovic-Torma C, Groves HE, Isabel MR, et al. Evolutionary and structural analyses of SARS-CoV-2 D614G spike protein mutation now documented worldwide. *Sci Rep.* 20 de agosto de 2020;10(1):14031.
34. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet.* diciembre de 2021;22(12):757-73.
35. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* diciembre de 2020;41(12):1100-15.
36. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, Wang Y, et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell.* 29 de octubre de 2020;183(3):739-751.e8.
37. Sun K, Gu L, Ma L, Duan Y. Atlas of ACE2 gene expression reveals novel insights into transmission of SARS-CoV-2. *Heliyon.* enero de 2021;7(1):e05850.
38. Dong M, Zhang J, Ma X, Tan J, Chen L, Liu S, et al. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomed Pharmacother.* 1 de noviembre de 2020; 131:110678.
39. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response | *Journal of Virology* [Internet]. [citado 27 de abril de 2023]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.02232-10>

40. Datta PK, Liu F, Fischer T, Rappaport J, Qin X. SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy. *Theranostics*. 12 de junio de 2020;10(16):7448-64.
41. Zheng M. Cellular Tropism of SARS-CoV-2 across Human Tissues and Age-related Expression of ACE2 and TMPRSS2 in Immune-inflammatory Stromal Cells. *Aging Dis*. 1 de junio de 2021;12(3):718-25.
42. Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, Waghray A, Heimberg G, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med*. marzo de 2021;27(3):546-59.
43. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*. mayo de 2020;181(5):1016-1035.e19.
44. Sasaki M, Uemura K, Sato A, Toba S, Sanaki T, Maenaka K, et al. SARS-CoV-2 variants with mutations at the S1/S2 cleavage site are generated in vitro during propagation in TMPRSS2-deficient cells. *PLOS Pathog*. 21 de enero de 2021;17(1):e1009233.
45. Papa G, Mallery DL, Albecka A, Welch LG, Cattin-Ortolá J, Luptak J, et al. Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion. *PLOS Pathog*. 25 de enero de 2021;17(1): e1009246.
46. O'Sullivan MJ, Mitchel JA, Mwase C, McGill M, Kanki P, Park JA. In well-differentiated primary human bronchial epithelial cells, TGF- β 1 and TGF- β 2 induce expression of furin. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 1 de febrero de 2021;320(2):L246-53.
47. Ryu G, Shin HW. SARS-CoV-2 Infection of Airway Epithelial Cells. *Immune Netw*. 2 de marzo de 2021;21(1): e3.
48. Fayyad D, Kelts JL, Nielson TH, Epelle IL, Monear NC, Strawn MTG, et al. COVID-19: A Systematic Review of the Transmissibility, Pathogenesis, Entry Factors, and Signature Immune Response. *BioChem*. junio de 2022;2(2):115-44.
49. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshnev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci*. enero de 2022;23(3):1716.
50. Khreefa Z, Barbier MT, Koksai AR, Love G, Del Valle L. Pathogenesis and Mechanisms of SARS-CoV-2 Infection in the Intestine, Liver, and Pancreas. *Cells*. enero de 2023;12(2):262.
51. Human ACE2 expression, a major tropism determinant for SARS-CoV-2, is regulated by upstream and intragenic elements | *PLOS Pathogens* [Internet]. [citado 7 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1011168>

52. Lewis D. Is the coronavirus airborne? Experts can't agree. *Nature*. 2 de abril de 2020;580(7802):175-175.
53. Lui G, Ling L, Lai CK, Tso EY, Fung KS, Chan V, et al. Viral dynamics of SARS-CoV-2 across a spectrum of disease severity in COVID-19. *J Infect*. 1 de agosto de 2020;81(2):318-56.
54. Puhach O, Adea K, Hulo N, Sattonnet P, Genecand C, Iten A, et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated individuals infected with ancestral, Delta or Omicron SARS-CoV-2. *Nat Med*. julio de 2022;28(7):1491-500.
55. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2023;21(3):147-61.
56. Santarpia JL, Rivera DN, Herrera VL, Morwitzer MJ, Creager HM, Santarpia GW, et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Sci Rep*. 29 de julio de 2020;10(1):12732.
57. Goldman E. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites. *Lancet Infect Dis*. 1 de agosto de 2020;20(8):892-3.
58. Mondelli MU, Colaneri M, Seminari EM, Baldanti F, Bruno R. Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites in real-life conditions. *Lancet Infect Dis*. 2021 May;21(5):e112. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30678-2. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33007224; PMCID: PMC7524520.
59. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1 | NEJM [Internet]. [citado 28 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmc2004973>
60. Chu DT, Singh V, Vu Ngoc SM, Nguyen TL, Barceló D. Transmission of SARS-CoV-2 infections and exposure in surfaces, points and wastewaters: A global one health perspective. *Case Stud Chem Environ Eng*. 1 de mayo de 2022; 5:100184.
61. Khan S, Liu J, Xue M. Transmission of SARS-CoV-2, Required Developments in Research and Associated Public Health Concerns. *Front Med* [Internet]. 2020 [citado 7 de mayo de 2023];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.00310>
62. Zaki N, Mohamed EA. The estimations of the COVID-19 incubation period: A scoping reviews of the literature. *J Infect Public Health*. 1 de mayo de 2021;14(5):638-46.
63. Huff HV, Singh A. Asymptomatic Transmission During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Implications for Public Health Strategies. *Clin Infect Dis*. 15 de noviembre de 2020;71(10):2752-6.
64. Xie Y, Wang Z, Liao H, Marley G, Wu D, Tang W. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of the COVID-19 in the current pandemic: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 31 de agosto de 2020;20(1):640.
65. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez- Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the

SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 de septiembre de 2020;98(1):115094.

66. Ridenhour B, Kowalik JM, Shay DK. El número reproductivo básico (R0): consideraciones para su aplicación en la salud pública. *Am J Public Health*. diciembre de 2018;108(Suppl 6):S455-65.

67. Paul BP, Kubik AB, Ramos ÁM. La utilidad de las matemáticas en tiempos de pandemia.

68. Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpirt W, et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics*. 1 de enero de 2021;11(1):316-29.

69. Barber A, Griffin J, Casey M, Collins ÁB, Lane EA, Bosch QT, et al. The basic reproduction number of SARS-CoV-2: a scoping review of available evidence [Internet]. medRxiv; 2020 [citado 24 de mayo de 2023]. p. 2020.07.28. 20163535. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.28.20163535v1>

70. Ingram C, Downey V, Roe M, Chen Y, Archibald M, Kallas KA, et al. COVID-19 Prevention and Control Measures in Workplace Settings: A Rapid Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. enero de 2021;18(15):7847.

71. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Barreno LG, Diaz AM, Barreto A, Moyano C, et al. Epidemiological, socio-demographic and clinical features of the early phase of the COVID-19 epidemic in Ecuador. Brookes VJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 4 de enero de 2021;15(1):e0008958.

72. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez- Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 de septiembre de 2020;98(1):115094.

73. Weekly COVID-19 country overview [Internet]. 2021 [citado 20 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/country-overviews>

74. The Lancet. Emerging understandings of 2019-nCoV. *The Lancet*. 1 de febrero de 2020;395(10221):311.

75. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.

76. Urashima M, Tanaka E, Ishihara H, Akutsu T. Association Between Life Expectancy at Age 60 Years Before the COVID-19 Pandemic and Excess Mortality During the Pandemic in Aging Countries. *JAMA Netw Open*. 2022;5(10):e2237528. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.37528

77. Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, de Silva TI, et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2023;21(3):162-77.

78. Oude Munnink BB, Worp N, Nieuwenhuijse DF, Sikkema RS, Haagmans B, Fouchier RAM, et al. The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: real-time molecular epidemiology. *Nat Med.* septiembre de 2021;27(9):1518-24.
79. Eguia RT, Crawford KHD, Stevens-Ayers T, Kelnhofer-Millevolte L, Greninger AL, Englund JA, et al. A human coronavirus evolves antigenically to escape antibody immunity. *PLoS Pathog.* 2021 Apr 8;17(4):e1009453. doi: 10.1371/journal.ppat.1009453. PMID: 33831132; PMCID: PMC8031418. [Internet]. [citado 26 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009453>
80. Lu L, Sikkema RS, Velkers FC, Nieuwenhuijse DF, Fischer EAJ, Meijer PA, et al. Adaptation, spread and transmission of SARS-CoV-2 in farmed minks and associated humans in the Netherlands. *Nat Commun.* 23 de noviembre de 2021;12(1):6802.
81. Hale VL, Dennis PM, McBride DS, Nolting JM, Madden C, Huey D, et al. SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *Nature.* febrero de 2022;602(7897):481-6.
82. Bashor L, Gagne RB, Bosco-Lauth AM, Bowen RA, Stenglein M, VandeWoude S. SARS-CoV-2 evolution in animals suggests mechanisms for rapid variant selection. *Proc Natl Acad Sci.* 2 de noviembre de 2021;118(44):e2105253118.
83. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* julio de 2021;19(7):409-24.
84. O'Toole Á, Pybus OG, Abram ME, Kelly EJ, Rambaut A. Pango lineage designation and assignment using SARS-CoV-2 spike gene nucleotide sequences. *BMC Genomics.* 2022;23(1):121. Published 2022 Feb 11. doi:10.1186/s12864-022-08358-2 .
85. Malkova A, Kudlay D, Kudryavtsev I, Starshinova A, Yablonskiy P, Shoenfeld Y. Immunogenetic Predictors of Severe COVID-19. *Vaccines.* marzo de 2021;9(3):211.
86. Peacock TP, Penrice-Randal R, Hiscox JA, Barclay WS. SARS-CoV-2 one year on: evidence for ongoing viral adaptation. *J Gen Virol.* 15 de abril de 2021;102(4):001584.
87. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care.* 13 de julio de 2020;24(1):422.
88. Díez-Manglano J, Solís-Marquínez MN, Álvarez García A, et al. Healthcare workers hospitalized due to COVID-19 have no higher risk of death than general population. Data from the Spanish SEMI-COVID-19 Registry. *PLoS One.* 2021;16(2):e0247422. Published 2021 Feb 19. doi: 10.1371/journal.pone.0247422
89. Rivera-Izquierdo M, Valero-Ubierna M del C, R-del Amo JL, Fernández-García MÁ, Martínez-Diz S, Tahery-Mahmoud A, et al. Sociodemographic, clinical and laboratory factors on admission associated with COVID-19 mortality in hospitalized patients: A retrospective observational study. *PLOS ONE.* 25 de junio de 2020;15(6):e0235107.

90. Xiang G, Xie L, Chen Z, Hao S, Fu C, Wu Q, et al. Clinical risk factors for mortality of hospitalized patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Ann Palliat Med*. 2021;2723-35.
91. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2021;19(3):141-54.
92. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area | Critical Care Medicine | JAMA | JAMA Network [Internet]. [citado 26 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765184/>
93. Akbari A, Fathabadi A, Razmi M, Zarifian A, Amiri M, Ghodsi A, et al. Characteristics, risk factors, and outcomes associated with readmission in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med*. 1 de febrero de 2022; 52:166-73.
94. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 28 de marzo de 2020;395(10229):1054-62.
95. Petrilli CM, Jones SA, Yang J, Rajagopalan H, O'Donnell L, Chernyak Y, et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ*. 22 de mayo de 2020;369:m1966.
96. Molloy EJ, Nakra N, Gale C, Dimitriades VR, Lakshminrusimha S. Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and neonates (MIS-N) associated with COVID-19: optimizing definition and management. *Pediatr Res*. mayo de 2023;93(6):1499-508.
97. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med*. 23 de abril de 2020;382(17):1663-5.
98. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. mayo de 2020;581(7809):465-9.
99. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 28 de marzo de 2020;395(10229):1054-62.
100. Jiang Y, Rubin L, Peng T, Liu L, Xing X, Lazarovici P, et al. Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. *Int J Biol Sci*. 1 de enero de 2022;18(2):459-72.
101. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther*. 29 de mayo de 2020;5(1):84.
102. Kuppalli K, Rasmussen AL. A glimpse into the eye of the COVID-19 cytokine storm. *eBioMedicine* [Internet]. 1 de mayo de 2020 [citado 20 de mayo de 2023];55.

- Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(20\)30164-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(20)30164-X/fulltext)
103. Mitchell WB. Thromboinflammation in COVID-19 acute lung injury. *Paediatr Respir Rev.* septiembre de 2020; 35:20-4.
 104. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol.* julio de 2020;95(7):834-47.
 105. Cao W, Li T. COVID-19: towards understanding of pathogenesis. *Cell Res.* mayo de 2020;30(5):367-9.
 106. Wang D, Yin Y, Hu C, Liu X, Zhang X, Zhou S, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Crit Care Lond Engl.* 30 de abril de 2020;24(1):188.
 107. Ghosh K, Ghosh K. D-Dimer: an analyte with increasing application in Covid-19 infection. *Expert Rev Hematol.* 2022;15(3):243-251. doi:10.1080/17474086.2022.2052040
 108. Finfer S, Venkatesh B, Hotchkiss RS, Sasson SC. Lymphopenia in sepsis an acquired immunodeficiency? *Immunol Cell Biol.* 2023;101(6):535-44.
 109. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* marzo de 2001;69(3):89-95.
 110. Xie Y, Xu E, Bowe B, Al-Aly Z. Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nat Med.* marzo de 2022;28(3):583-90.
 111. Samprathi M, Jayashree M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. *Front Pediatr [Internet].* 2021 [citado 18 de mayo de 2023];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2020.607647>
 112. Griffith LE, Ali MU, Andreacchi A, Loeb M, Kenny M, Joshi D, et al. The complexity of examining laboratory-based biological markers associated with mortality in hospitalized patients during early phase of the COVID-19 pandemic: A systematic review and evidence map. *PLOS ONE.* 9 de septiembre de 2022;17(9):e0273578.
 113. Chaudhary R, Garg J, Houghton DE, Murad MH, Kondur A, Chaudhary R, et al. Thromboinflammatory Biomarkers in COVID-19: Systematic Review and Meta-analysis of 17,052 Patients. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes.* 1 de abril de 2021;5(2):388-402.
 114. Yip CYC, Yap ES, De Mel S, Teo WZY, Lee C, Kan S, et al. Temporal changes in immune blood cell parameters in COVID-19 infection and recovery from severe infection. *Br J Haematol.* julio de 2020;190(1):33-6.
 115. Chen R, Sang L, Jiang M, Yang Z, Jia N, Fu W, et al. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol.* 1 de julio de 2020;146(1):89-100.

116. Li Y, Hu Y, Yu J, Ma T. Retrospective analysis of laboratory testing in 54 patients with severe- or critical-type 2019 novel coronavirus pneumonia. *Lab Invest.* junio de 2020;100(6):794-800.
117. Xu ZS, Shu T, Kang L, Wu D, Zhou X, Liao BW, et al. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther.* 19 de junio de 2020; 5(1):1-3.
118. Castro-Mujica M del C, Barletta-Carrillo C. Síndrome de Lynch: aspectos genéticos, clínicos y diagnósticos. *Rev Gastroenterol Perú.* Julio de 2018; 38(3):265-79.
119. Baldeo C, Vishnu P, Mody K, Kasi PM. Uridine triacetate for severe 5-fluorouracil toxicity in a patient with thymidylate synthase gene variation: Potential pharmacogenomic implications. *SAGE Open Med Case Rep.* 2018; 6:2050313X18786405.
120. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy - Goetz - 2018 - Clinical Pharmacology & Therapeutics - Wiley Online Library [Internet]. [Citado 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://ascpt.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpt.1007>
121. Kahma H, Filppula AM, Neuvonen M, et al. Clopidogrel Carboxylic Acid Glucuronidation is Mediated Mainly by UGT2B7, UGT2B4, and UGT2B17: Implications for Pharmacogenetics and Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Dispos.* 2018; 46(2):141-150. doi:10.1124/dmd.117.078162.
122. Giménez Mascarell P, Peel C. Biomarcadores en la práctica clínica. Validación y verificación. 2014 [citado 28 de agosto de 2023]; Disponible en: <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/50777>
123. Geanon D, Lee B, Kelly G, et al. A Streamlined CyTOF Workflow To Facilitate Standardized Multi-Site Immune Profiling of COVID-19 Patients. Preprint. *medRxiv.* 2020;2020.06.26.20141341. Published 2020 Jun 29. doi:10.1101/2020.06.26.20141341.
124. Kalicińska E, Szymczak D, Andrasiak I, Bogucka-Fedorczuk A, Zińczuk A, Szymański W, et al. Lymphocyte subsets in haematological patients with COVID-19: Multicentre prospective study. *Transl Oncol.* 1 de enero de 2021;14(1):100943.
125. Ziv O, Price J, Shalamova L, Kamenova T, Goodfellow I, Weber F, et al. The Short- and Long-Range RNA-RNA Interactome of SARS-CoV-2. *Mol Cell.* diciembre de 2020;80(6):1067-1077.e5.
126. Greaney AJ, Starr TN, Gilchuk P, Zost SJ, Binshtein E, Loes AN, et al. Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition. *Cell Host Microbe.* enero de 2021;29(1):44-57.e9.
127. Liu D, Yang J, Feng B, Lu W, Zhao C, Li L. Mendelian randomization analysis identified genes pleiotropically associated with the risk and prognosis of COVID-19. *J Infect.* 1 de enero de 2021; 82(1):126-32.
128. Schultheiß C, Paschold L, Simnica D, Mohme M, Willscher E, Von Wenserski L, et al. Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19

Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity*. agosto de 2020;53(2):442-455.e4.

129. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell*. septiembre de 2020;182(6):1419-1440.e23.

130. Rello J, Storti E, Belliato M, Serrano R. Clinical phenotypes of SARS-CoV-2: implications for clinicians and researchers. *Eur Respir J* [Internet]. 1 de mayo de 2020 [citado 20 de mayo de 2023];55(5). Disponible en: <https://erj.ersjournals.com/content/55/5/2001028>

131. Malik P, Patel U, Mehta D, Patel N, Kelkar R, Akrmah M, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid-Based Med*. 1 de junio de 2021;26(3):107-8.

132. Assal HH, Abdelrahman SM, Abdelbasset MA, Abdelaziz M, Sabry IM, Shaban MM. Presepsin as a Novel Biomarker in predicting In-hospital Mortality in Patients With COVID-19 Pneumonia. *Int J Infect Dis*. 1 de mayo de 2022; 118:155-63.

133. Becú-Villalobos D. Medicina traslacional, ¿moda o necesidad? *Med B Aires*. abril de 2014;74(2):170-2.

134. Tian Y, Carpp LN, Miller HER, Zager M, Newell EW, Gottardo R. Single-cell immunology of SARS-CoV-2 infection. *Nat Biotechnol*. Enero de 2022; 40(1):30-41.

135. Su Y, Chen D, Yuan D, Lausted C, Choi J, Dai CL, et al. Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell*. diciembre de 2020;183(6):1479-1495.e20.

136. Sridhar SS, Freedland SJ, Gleave ME, Higano C, Mulders P, Parker C, et al. Castration-Resistant Prostate Cancer: From New Pathophysiology to New Treatment. *Eur Urol*. 1 de febrero de 2014;65(2):289-99.

137. Buchta C, Zeichhardt H, Aberle SW, et al. Design of external quality assessment schemes and definition of the roles of their providers in future epidemics. *Lancet Microbe*. 2023; 4(7):e552-e562. doi:10.1016/S2666-5247(23)00072-1

138. Espinosa Brito AD. A propósito de la definición clínica oficial de la enfermedad pos-COVID-19 por la OMS. *MediSur*. febrero de 2022;20(1):10-7.

139. WHO-EURO-2022-2148-41903-65545-eng.pdf [Internet]. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants- second update [citado 28 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/360875/WHO-EURO-2022-2148-41903-65545-eng.pdf?sequence=1>

140. WHO-EURO-2023-7637-47404-69640-eng.pdf [Internet The transition from the acute phase of COVID-19: Working towards a paradigm shift for pandemic preparedness and response in the WHO European Region]. [Citado 28 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/369063/WHO-EURO-2023-7637-47404-69640-eng.pdf?sequence=1>

141. Schalekamp S, Huisman M, van Dijk RA, et al. Model-based Prediction of Critical Illness in Hospitalized Patients with COVID-19. *Radiology*. 2021; 298(1):E46-E54. doi:10.1148/radiol.2020202723

142. Bagwell CB. Improving the t-SNE Algorithms for Cytometry and other Technologies: Cen-Se' Mapping. 2019;10(2).
143. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D988-95.
144. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A.* 2015; 87(7):636-45.
145. Stefanizzi P, Tafuri S, Bianchi FP. Immunogenicity of third dose of anti-SARS-CoV-2 vaccine co-administered with influenza vaccine: An open question. *Hum Vaccin Immunother.* 2022 Nov 30; 18(6):2094653. doi: 10.1080/21645515.2022.2094653. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35820047; PMCID: PMC9746376.
146. Martín Sánchez FJ, Martínez-Sellés M, Molero García JM, et al. Insights for COVID-19 in 2023. *Rev Esp Quimioter.* 2023; 36(2):114-124. doi:10.37201/req/122.2022
147. Xie Y, Tian X, Zhang X, Yao H, Wu N. Immune interference in effectiveness of influenza and COVID-19 vaccination. *Front Immunol.* 2023; 14:1167214. Published 2023 Apr 19. doi:10.3389/fimmu.2023.1167214
148. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* agosto de 2020;584(7821):430-6.
149. Surme S, Buyukyazgan A, Bayramlar OF, Cinar AK, Copur B, Zerdali E, et al. Predictors of Intensive Care Unit Admission or Mortality in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Istanbul, Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 22 de septiembre de 2021;74(5):458-64.
150. Tuncer G, Surme S, Bayramlar OF, Karanalbant HK, Copur B, Yazla M, et al. National Early Warning Score 2 and laboratory predictors correlate with clinical deterioration in hospitalized patients with COVID-19. *Biomark Med.* agosto de 2021;15(11):807-20.
151. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost JTH.* junio de 2020;18(6):1324-9.
152. Acar HC, Can G, Karaali R, Börekçi Ş, Balkan İİ, Gemicioğlu B, et al. An easy-to-use nomogram for predicting in-hospital mortality risk in COVID-19: a retrospective cohort study in a university hospital. *BMC Infect Dis.* 5 de febrero de 2021; 21(1):148.
153. Surme S, Tuncer G, Bayramlar OF, Copur B, Zerdali E, Nakir IY, et al. Novel biomarker-based score (SAD-60) for predicting mortality in patients with COVID-19 pneumonia: a multicenter retrospective cohort of 1013 patients. *Biomark Med.* junio de 2022; 16(8):577-88.
154. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19 - ScienceDirect [Internet]. [Citado 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445320302085>
155. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol.* 1 de julio de 2020;146(1):128-136.e4.

156. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 15 de febrero de 2020;395(10223):497-506.
157. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 28 de julio de 2020; 71(15):762-8.
158. Hammad R, Elshafei A, Khidr EG, El-Husseiny AA, Gomaa MH, Kotb HG, et al. Copeptin: a neuroendocrine biomarker of COVID-19 severity. *Biomark Med*. junio de 2022;16(8):589-97.
159. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci*. 31 de marzo de 2020;117(13):7001-3.
160. Akin S, Schriek P, van Nieuwkoop C, Neuman RI, Meynaar I, van Helden EJ, et al. A low aldosterone/renin ratio and high soluble ACE2 associate with COVID-19 severity. *J Hypertens*. marzo de 2022;40(3):606-14.
161. Senapati S, Banerjee P, Bhagavatula S, Kushwaha PP, Kumar S. Contributions of human ACE2 and TMPRSS2 in determining host-pathogen interaction of COVID-19. *J Genet*. 2021;100(1):12. doi: 10.1007/s12041-021-01262-w. PMID: 33707363; PMCID: PMC7904510
162. Schönfelder K, Breuckmann K, Elsner C, Dittmer U, Fistera D, Herbstreit F, et al. Transmembrane serine protease 2 Polymorphisms and Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 Infection: A German Case-Control Study. *Front Genet* [Internet]. 2021 [citado 18 de octubre de 2023];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.667231>
163. Bizzotto J, Sanchis P, Abbate M, Lage-Vickers S, Lavignolle R, Toro A, et al. SARS-CoV-2 Infection Boosts MX1 Antiviral Effector in COVID-19 Patients. *iScience*. octubre de 2020;23(10):101585.
164. Mahmood ZS, Fadhil HY, Abdul Hussein TA, Ad'hiah AH. Severity of coronavirus disease 19: Profile of inflammatory markers and ACE (rs4646994) and ACE2 (rs2285666) gene polymorphisms in Iraqi patients. *Meta Gene*. 1 de febrero de 2022; 31:101014.
165. Alimoradi N, Sharqi M, Firouzabadi D, Sadeghi MM, Moezzi MI, Firouzabadi N. SNPs of ACE1 (rs4343) and ACE2 (rs2285666) genes are linked to SARS-CoV-2 infection but not with the severity of disease. *Virol J*. 19 de marzo de 2022;19(1):48.
166. Shi W, Liu X, Cao Q, Ma P, Le W, Xie L, et al. High-dimensional single-cell analysis reveals the immune characteristics of COVID-19. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. enero de 2021;320(1):L84-98.
167. Trombetta AC, Farias GB, Gomes AMC, Godinho-Santos A, Rosmaninho P, Conceição CM, et al. Severe COVID-19 Recovery Is Associated with Timely Acquisition of a Myeloid Cell Immune-Regulatory Phenotype. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [citado 18 de octubre de 2023];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.691725>

168. Gheware A, Ray A, Rana D, Bajpai P, Nambirajan A, Arulselvi S, et al. ACE2 protein expression in lung tissues of severe COVID-19 infection. *Sci Rep*. 8 de marzo de 2022;12(1):4058.
169. Fahlberg MD, Blair RV, Doyle-Meyers LA, Midkiff CC, Zenere G, Russell-Lodrigue KE, et al. Cellular events of acute, resolving or progressive COVID-19 in SARS-CoV-2 infected non-human primates. *Nat Commun*. 27 de noviembre de 2020;11(1):6078.
170. Wang X, Bai H, Ma J, Qin H, Zeng Q, Hu F, et al. Identification of Distinct Immune Cell Subsets Associated with Asymptomatic Infection, Disease Severity, and Viral Persistence in COVID-19 Patients. *Front Immunol* [Internet]. 2022 [citado 18 de octubre de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.812514>
171. Alberca RW, Andrade MM de S, Branco ACCC, Pietrobon AJ, Pereira NZ, Fernandes IG, et al. Frequencies of CD33+CD11b+HLA-DR-CD14-CD66b+ and CD33+CD11b+HLA-DR-CD14+CD66b- Cells in Peripheral Blood as Severity Immune Biomarkers in COVID-19. *Front Med* [Internet]. 2020 [citado 18 de octubre de 2023];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.580677>
172. Ahern DJ, Ai Z, Ainsworth M, Allan C, Allcock A, Angus B, et al. A blood atlas of COVID-19 defines hallmarks of disease severity and specificity. *Cell*. 3 de marzo de 2022;185(5):916-938.e58.
173. Doglioni C, Ravaglia C, Chilosi M, Rossi G, Dubini A, Pedica F, et al. Covid-19 Interstitial Pneumonia: Histological and Immunohistochemical Features on Cryobiopsies. *Respiration*. 16 de marzo de 2021;100(6):488-98.
174. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol*. 1 de enero de 2021;109(1):13-22.
175. Jin M, Shi N, Wang M, Shi C, Lu S, Chang Q, et al. CD45: a critical regulator in immune cells to predict severe and non-severe COVID-19 patients. *Aging*. 16 de octubre de 2020;12(20):19867-79.
176. Ahmed MGT, Limmer A, Sucker C, Fares KM, Mohamed SAB, Othman AH, et al. Differential Regulation of CD45 Expression on Granulocytes, Lymphocytes, and Monocytes in COVID-19. *J Clin Med*. enero de 2022;11(14):4219.
177. Çekmen N, Ersoy Z, Günay Y, İltiş, Ghavam AA, Tufan MYS, Şahin İM. Evaluation of coronavirus diseases (COVID-19) in terms of epidemiological and clinical features, comorbidities, diagnostic methods, treatment, and mortality. *J Educ Health Promot*. 29 de julio de 2022; 11:236.

10. ANEXOS

ANEXO I. DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÉ DE ÉTICA PROVINCIAL

 Junta de Andalucía Consejería de Salud y Familias <small>SERVICIO ANDALUZ DE SALUD</small>																	
DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA																	
D. ANTONIO SALMERÓN GARCÍA, EN CALIDAD DE SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA PROVINCIA DE GRANADA (CEIM/CEI GRANADA)																	
CERTIFICA:																	
Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador: _____, para realizar el estudio titulado:																	
TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>Caracterización profunda de la serie blanca de pacientes con patología COVID-19 para su cribado por agresividad.</i>																	
Código protocolo: COVID-CYTOF																	
Código Portal de Ética: 1329-N-21																	
Investigador Principal: <i>María Jesús Álvarez Cubero</i>																	
Centro: <i>Centro de Genómica e Investigación Oncológica . GENyo</i>																	
Versión de los documentos:																	
Protocolo	Versión 1 de fecha 01/06/2021																
HIP	Versión 1 de fecha 01/06/2021																
CI	Versión 1 de fecha 01/06/2021																
Y considera que:																	
<ul style="list-style-type: none"> • Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios. • La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto. • El protocolo del estudio contempla de forma adecuada toda la legislación aplicable • Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos. 																	
Por lo que este Comité ha acordado emitir DICTAMEN FAVORABLE para la realización del dicho estudio, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro/os correspondiente/s determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevarlo a cabo.																	
Lo que firmo en Granada																	
<table border="1"> <tr> <td>Código Seguro De Verificación:</td> <td>a8c23f1ddb2f4e43efdc7d7e69d1b1156e338b93</td> <td>Fecha</td> <td>08/06/2021</td> </tr> <tr> <td>Normativa</td> <td colspan="3">Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.</td> </tr> <tr> <td>Firmado Por</td> <td colspan="3">Antonio Salmeron Garcia</td> </tr> <tr> <td>Url De Verificación</td> <td>https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaletica/xhtml/ayuda/verificaFPirmaDocumento.iface/code/a8c23f1ddb2f4e43efdc7d7e69d1b1156e338b93</td> <td>Página</td> <td>1/4</td> </tr> </table>	Código Seguro De Verificación:	a8c23f1ddb2f4e43efdc7d7e69d1b1156e338b93	Fecha	08/06/2021	Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia			Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaletica/xhtml/ayuda/verificaFPirmaDocumento.iface/code/a8c23f1ddb2f4e43efdc7d7e69d1b1156e338b93	Página	1/4	
Código Seguro De Verificación:	a8c23f1ddb2f4e43efdc7d7e69d1b1156e338b93	Fecha	08/06/2021														
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.																
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia																
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaletica/xhtml/ayuda/verificaFPirmaDocumento.iface/code/a8c23f1ddb2f4e43efdc7d7e69d1b1156e338b93	Página	1/4														

ANEXO II. DOCUMENTO DE AUTORIZACIÓN DE ACCESO A DATOS

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	 CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA- JUNTA DE ANDALUCÍA DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA
<p>Mediante este documento consiento al personal sanitario adscrito al proyecto titulado "Uso de NGS y tecnología CYTOFF para caracterización de pacientes con COVID-19" que acceda a los datos clínicos necesarios para el correcto desarrollo del proyecto. De la misma forma, indico que he recibido y firmado la hoja de información al paciente así como el consentimiento informado del presente proyecto.</p> <p>Para que así conste firmo este documento:</p>	
DNI:	
Nombre completo:	
AN o NHC:	
Teléfono de contacto:	
<p>NOTA: Podrá facilitar el teléfono de contacto que se podrá usar simplemente en el caso en que se necesite posteriormente contactar con el donante para recabar alguna información relevante para este proyecto.</p>	

ANEXO III. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PACIENTES

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

DOCUMENTO DE HOJA INFORMACIÓN AL PACIENTE

SERVICIO: Urología, Farmacia Hospitalaria y Centros de Salud (Atención Primaria)**INVESTIGADOR RESPONSABLE:** María Jesús Álvarez Cubero**TELÉFONO DE CONTACTO:** 958 248945 **EMAIL:** mjesusac@ugr.es**NOMBRE DE LA LÍNEA DE TRABAJO:** Uso de NGS y tecnología CYTOFF para caracterización de pacientes con COVID-19.**I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta:**

Nuestro proyecto se enmarca en la caracterización molecular de los pacientes y de su respuesta a la patología incluyendo biomarcadores moleculares que se sumen a los actuales (aumento de ferritina, dímero D, CRP, troponina, LDH o IL-6) implementando la información de partida de cada paciente y mejorando la estratificación del paciente desde su contacto con los profesionales de atención primaria o urgencias, en dos puntos principales: **1)** riesgo de desarrollar una patología más agresiva y **2)** mejorar la estratificación por su pronóstico y por la respuesta a su tratamiento, minimizando las recaídas debidas a tratamientos ineficaces, mediante la caracterización del genoma de los pacientes y de dos tipos celulares: linfocitos T y macrófagos.

Las células seleccionadas para una ultracaracterización de los pacientes son los linfocitos T, tipo celular básico en el sistema inmune innato y adaptativo; por su capacidad para producir citoquinas y por la capacidad de actuar frente a distintos agentes infecciosos (como el virus). Y los monocitos, efectores innatos de la respuesta inmune. Para entender el desarrollo de estos linfocitos se estudiará el TCR, ya que dependiendo de su señal será la capacidad para producir IFN-gamma o IL-17. Por otro lado, estudiar el fenotipo de las subpoblaciones de células dendríticas originadas de los monocitos nos ayudará a clasificar los macrófagos, elementos claves en la respuesta inmune.

El **impacto esperado** de esta propuesta será directo e inmediato: **i)** en el paciente: ya que una mejor caracterización y estratificación de la patología no solo en diagnóstico; sino en el tratamiento hace que desde el inicio se pueda tratar de una mejor forma la patología minimizando los riesgos y mejorando el estado de salud y anímico del paciente. **ii)** En el sistema sanitario: se minimizarían los costes derivados de los efectos adversos de un mal o ineficiente tratamiento, así como una caracterización del paciente permitiría poder estandarizar los tiempos de seguimiento de la enfermedad de una forma más eficiente.

Metodología: Se recogerán dos tubos de 3ml de sangre, uno con anticoagulante EDTA y un segundo tubo TEMPUS, para conservar el ARN. Las muestras se procesarán dentro de las 48h desde su recogida de tal forma que se eviten riesgos de ruptura celular periodo en el que las muestras se almacenarán a temperatura ambiente. El procedimiento estandarizado para las muestras de sangre seguirá las siguientes pautas: **1)** Tubo EDTA: separar 200µl de sangre para el GWAs y el resto se pasará por el contador celular para su posterior análisis en el citómetro de masas (CyTOF). **2)** El tubo TEMPUS se almacenará a -20°C hasta su análisis.

Los beneficios destacan por el valor del propósito principal de estos estudios genéticos es aportar la información necesaria para tener un diagnóstico anticipado de su patología, conocer la posible evolución para tomar decisiones sobre cuál es el mejor tratamiento de la misma. Teniendo en cuenta la complejidad de su patología los beneficios podrán aplicarse a futuros pacientes de esta patología. Si su participación ha sido como control sano para el

Se entrega copia de este documento al paciente

1



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA
ÁREA DE ANDALUCÍA DE GENÓMICA E
INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

proyecto, de igual modo la comunidad se beneficiará de su participación al permitir estudiar procesos esta enfermedad.

Los riesgos para el donante/paciente del presente estudio son bajos, la extracción de sangre apenas tiene efectos secundarios; en todo caso podría ocasionar dolor leve o aparición de pequeños cardenales en la zona del pinchazo que desaparecerían en 1 o 2 días. En muy raras ocasiones, podría infectarse o sangrar un poco la zona del pinchazo, o provocar un poco de debilidad. La toma de orina e hisopos bucales no supondrá ningún riesgo adicional para su salud.

Al tratarse de un estudio donde se estudia su ADN y ARN, es posible que se obtengan hallazgos fortuitos que pudieran tener consecuencias importantes para su salud o la de sus familiares (por ejemplo, identificación de mutaciones en genes causantes de enfermedades).

II) Algunas consideraciones sobre su participación:

Es importante que Vd., como participante en este proyecto, conozca varios aspectos importantes:

- A) Su participación es totalmente voluntaria.
- B) Puede plantear todas las dudas que considere oportunas sobre su participación en este estudio.
- C) No percibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio. No obstante, la información generada en el mismo podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población.
- D) La información obtenida se almacenará en una base de datos, según lo indicado en la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 3/2018), a la que solo tendrán acceso algunos miembros del equipo. Además:

Los datos personales que se le requieren son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a dicha información quedará restringido al personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

Los datos serán utilizados para los fines específicos de este estudio y/o esta línea, en todo caso si fuese necesario podrán ser también utilizados con otros fines de tipo docente o carácter científico. Si desea conocerlos deberá solicitarlo al investigador principal o al médico que le atiende en este estudio.

El Servicio Andaluz de Salud, la Universidad de Granada y GENYO. Centro de Genómica e Investigación Oncológica: Pfizer / Universidad de Granada / Junta de Andalucía son responsables respectivamente del buen tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar con el investigador principal mjesusac@ugr.es.

E) Las muestras recolectadas sólo se usarán para el presente estudio. Y si hubiese excedentes de la muestra o se destruirán o se destinarán a otros proyectos de nuestra línea de investigación, siempre que usted lo haya autorizado.

F) Es posible que los estudios realizados aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Vd. tiene derecho a conocerla y/o transmitirla a sus familiares si así lo desea y/o a solicitar que miembros del equipo investigador contacten con ellos, siempre que ellos deseen conocerlos.

G) Sólo si Vd. lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

Se entrega copia de este documento al paciente

2

ANEXO IV. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: Uso de NGS y tecnología CYTOFF para caracterización de pacientes con COVID-19.

Yo, _____ con
DNI _____ natural de _____
(nombre, apellidos, DNI y lugar de nacimiento del paciente o su representante legal)

- He leído la información que me ha sido entregada.
 He recibido la hoja de información que me ha sido entregada.
 He podido hacer preguntas sobre el estudio.
 He recibido suficiente información sobre el estudio.
 He hablado del estudio con _____
 (nombre y apellidos del investigador)

- Comprendo que mi participación es voluntaria.
 Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 1.- Cuando quiera.
 2.- Sin tener que dar explicaciones.
 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para participar en esta investigación.

Accedo a que los médicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y Hospital San Cecilio (PTS); así como a Centros de Salud Gran Capitán, Salvador Caballero, Casería de Montijo y UCCU Chana y Zaidín contacten conmigo en el futuro en caso de que se necesite obtener nuevos datos.

SI / NO (marcar con una X lo que proceda)

Accedo a que los médicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y Hospital San Cecilio (PTS); así como a Centros de Salud Gran Capitán, Salvador Caballero, Casería de Montijo y UCCU Chana y Zaidín contacten conmigo en caso de que los estudios realizados sobre mis datos aporten información relevante para mi salud o la de mis familiares.

SI / NO (marcar con una X lo que proceda)

Autorizo a que, una vez finalizado el proyecto de investigación, los excedentes de mi muestra, así como de los procesados de ella serán conservados en una colección que se inscribirá en el registro de colecciones del ISCIII (<https://biobancos.isciii.es/ListadoColecciones.aspx>) para poder ser usado en otros proyectos de la siguiente línea de investigación: "Uso de NGS y tecnología CYTOFF para caracterización de pacientes con COVID-19" y sus datos personales correspondientes al tratamiento de datos en investigación de acuerdo al Registro de Tratamientos de Datos del Servicio Andaluz de Salud.

Autorizo al grupo de investigación a volver a llamarme para recabar nuevos datos que fuesen necesarios para nuevos proyectos de investigación.

O por el contrario deseo que al finalizar el proyecto se destruyan los excedentes de mi muestra, así como de los procesados de la misma, se eliminan mis datos personales de todos los registros existentes.

(marcar solo uno de los dos casilleros)

Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL NOMBRE Y APELLIDOS FECHA

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

FIRMA DEL INVESTIGADOR NOMBRE Y APELLIDOS FECHA

Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL NOMBRE Y APELLIDOS FECHA

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

FIRMA DEL INVESTIGADOR NOMBRE Y APELLIDOS FECHA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: Uso de NGS y tecnología CYTOFF para caracterización de pacientes con COVID-19.

REVOCACIÓN:

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL):

María Jesús Álvarez Cubero | Teléfono: 958 248945| email: mjesusac@ugr.es

Yo, _____ con
DNI _____ revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado
con fecha _____

Firma:

Información sobre los datos personales:

- *Tiene derecho a acceder, modificar, cancelar, limitar su uso, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad), a los datos que usted ha facilitado. Para ejercitar sus derechos, dirijase al investigador principal mjesusac@ugr.es. Le recordamos que los datos no serán eliminados. El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos; tras finalizar el estudio, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el promotor para otros fines de investigación.*
- *Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).*



As you wish