



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

.....

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN, SALVADOR ZUBIRÁN
***“Serpina A3 como biomarcador para predecir recuperación de la función
renal en pacientes con lesión renal aguda grave y
COVID-19 crítico”***

TESIS

Para optar por el grado de: Maestro en Ciencias

PRESENTA

Noemí del Toro Cisneros

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Olynka Vega Vega

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval

Instituto de investigaciones biomédicas, Universidad Autónoma de México

Dra. Mara Medeiros Domingo

Hospital Infantil de México, Federico Gómez

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, febrero 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

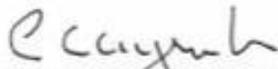


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas
Responsable de la entidad académica



Dra. Olynka Vega-Vega
Tutor programa de Maestría en Ciencias Médicas



Dra. Noemí del Toro Cisneros
Alumna del programa de Maestría en Ciencias Médicas

Índice

| | | |
|-----|---------------------------------|----|
| 1. | Resumen | 4 |
| 2. | Marco teórico | 5 |
| 3. | Planteamiento del problema..... | 14 |
| 4. | Justificación..... | 15 |
| 5. | Hipótesis | 15 |
| 6. | Objetivos | 15 |
| 7. | Material y métodos | 16 |
| 8. | Resultados | 20 |
| 9. | Discusión | 34 |
| 10. | Conclusiones | 37 |
| 11. | Referencias | 39 |

“Serpina A3 como biomarcador para predecir recuperación de la función renal en pacientes con lesión renal aguda grave y COVID-19 crítico”

Resumen

Antecedentes: Diversos estudios han sugerido un posible rol de los biomarcadores para predecir lesión renal aguda (LRA), requerimiento de terapia de reemplazo renal (TRR) y mortalidad en pacientes con COVID-19 y LRA. Sin embargo, los biomarcadores para predecir recuperación de la función renal en esta población han sido poco estudiados.

Objetivo: Evaluar la cinética de la Serpina A3, como biomarcador de recuperación renal a 90 días en pacientes críticos con COVID-19 y LRA grave con requerimiento de TRR en la unidad de terapia intensiva (UTI).

Material y métodos: Estudio prospectivo, observacional, en el que se incluyeron pacientes con COVID-19 bajo ventilación mecánica invasiva (VMI) y LRA con requerimiento TRR. admitidos en la UTI en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán del 01/03/2020 al 28/02/2022. Se obtuvieron datos clínicos y se colectaron muestras de sangre y orina al inicio de la TRR (tiempo cero, 24, 72 h, 1 semana, 2 semanas y 90 días). En las muestras de orina se analizaron Serpina A3, proteína de choque térmico-72 (HSP-72), Molécula de daño renal-1 (KIM-1), gelatinasa de neutrófilos asociada a lipocalina (NGAL) y en sangre interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).

Resultados: Se reclutaron 60 pacientes, de los cuales 29 (48%) sobrevivieron el internamiento y recuperaron función renal; de ellos, el 79% presentó recuperación renal completa (RRC) y el resto parcial (RRP) a los 90 días. De los biomarcadores estudiados, la excreción urinaria de KIM-1 (uKIM1) resultó ser un marcador temprano para predecir recuperación de la función renal, en el día cero (inicio de TRR) con un área bajo la curva (AUC) de 0.71. Mientras que, la excreción urinaria de Serpina A3 (uSerpina A3) al día 7 y 14 fue mejor para predecir este RRC (AUC 0.68 y 0.71 respectivamente). Al agregar variables clínicas a los biomarcadores no se obtuvo mayor rendimiento respecto al biomarcador solo. También se estudiaron las cinéticas de todos los biomarcadores sin encontrar resultados significativos para predecir recuperación de la función renal. Sin embargo, la cinética de uSerpina A3 resultó útil para predecir mortalidad.

Conclusiones: La uSerpina A3 resultó ser un biomarcador tardío para predecir recuperación de la función renal y la mortalidad en la población estudiada.

MARCO TEÓRICO:

-Introducción

Reconocer a los pacientes en las primeras fases de la enfermedad renal crónica (ERC) es difícil y es aún más difícil predecir la lesión renal aguda (LRA) y su transición a ERC. El estándar de oro para identificar oportunamente la fibrosis renal es la biopsia renal, un procedimiento invasivo, que no se suele realizar con este fin en la práctica clínica¹.

La ERC es una enfermedad silenciosa que a menudo no se reconoce clínicamente hasta que se deteriora la función renal o se detecta proteinuria en los análisis de orina. En las últimas dos décadas, la incidencia de ERC se ha triplicado y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo².

Para evaluar la función renal, actualmente se recomienda tamizaje con creatinina sérica (para el cálculo de la tasa de filtrado glomerular estimada, TFGe), el nitrógeno ureico y la presencia anormal de proteínas en la orina^{3,4,5}. Desafortunadamente, estos marcadores clásicos de daño renal solo son detectables cuando la enfermedad ya está avanzada y los tratamientos farmacológicos son posiblemente menos efectivos. Además, se ha demostrado que la fibrosis tubulointersticial ocurre antes que la disfunción renal y la proteinuria, estos dos últimos marcadores suelen aparecer cuando la enfermedad ya está establecida².

La LRA representa otra enfermedad renal importante en todo el mundo. Afecta al 21% de los pacientes hospitalizados en las salas generales y hasta al 60% de los pacientes en las UTIs^{6,7,8}. Inicialmente se consideraba que presentar un evento LRA y posterior recuperación completa de la función renal no representaba mayores repercusiones en la función y estructura del riñón; sin embargo, evidencia reciente basada en observaciones epidemiológicas y experimentales ha demostrado que, en muchos casos, la LRA conduce a ERC e incluso posterior a un episodio de LRA, las tasas de dependencia a diálisis son de hasta un 20%. Por lo tanto, la LRA se reconoce ahora como un factor de riesgo para el desarrollo de ERC y un factor acelerador de la transición de ERC a enfermedad renal crónica terminal (ERCT)⁹⁻¹¹.

Ambas patologías (ERC y LRA) son de importancia crucial a nivel mundial, por su gran impacto en la morbi-mortalidad, calidad de vida y gasto económico para los sistemas de salud¹²⁻¹⁴. En México la ERCT tiene un incremento anual del 11% de ingreso de pacientes a diálisis por

cualquier causa, y la sobrevida es variable según las comorbilidades, el acceso y modalidad de TRR otorgada¹⁵⁻¹⁷.

-Lesión renal aguda

La LRA es una complicación frecuente en pacientes en la UTI con una prevalencia aproximada de hasta el 60% de acuerdo con la clasificación KDIGO (**Tabla 1**). De estos pacientes hasta el 13% llegan a requerir terapia de TRR. Lo anterior se asocia con resultados adversos como mayor estancia en UTI y en hospital, mayores costos para el sistema de salud y mayor mortalidad a corto y largo plazo^{6,7,8}. Los factores relacionados a su desarrollo son diversos, sin embargo, se reconoce que una agresión hipotensiva (con TAM <60mmHg sostenida), séptica o tóxica puede iniciar una cascada de eventos, lo que da como resultado una microcirculación alterada, activación de vías inflamatorias y lesión de las células tubulares o muerte.

El porcentaje de pacientes que recuperan función renal después de un episodio de LRA varía según la literatura consultada, lo anterior es debido a varios factores, como las diferencias en las poblaciones estudiadas y en la definición de recuperación. De Corte et al., encontraron que el 50% de los pacientes con requerimiento de TRR posterior a un episodio de LRA tuvieron una recuperación completa de la función renal y una tasa de dependencia de diálisis de 9.0% en los sobrevivientes a 90 días^{10,18}. En un estudio finlandés de LRA, la dependencia a diálisis fue incluso más alta (18.9%)¹⁴. Algunos otros estudios que han utilizado TRR con modalidad lenta continua (CRRT) han encontrado dependencia de diálisis menor (1.8%) y mejor recuperación de la función renal, lo cual puede ser prometedor para estos pacientes^{10,19}, sin embargo, la modalidad elegida depende de las condiciones del paciente y la disponibilidad en el centro hospitalario.

| | Creatinina sérica (CrS) | Volumen urinario |
|---------|--|--|
| Grado 1 | ≥0.3mg/dl o ≥1.5-2 veces el valor basal | <0.5ml/kg/h por >6 horas |
| Grado 2 | >2-3 veces el valor basal | <0.5ml/kg/h por >12 horas |
| Grado 3 | >3 veces el valor basal o CrS ≥ 4mg/dl y TRR | <0.5ml/kg/h por 24 horas o anuria por 12 horas |

Tabla 1: grados de LRA según KDIGO, cada uno de estos puede ser clasificado por creatinina sérica respecto a su creatinina basal (ver definiciones operacionales) y/o volumen urinario.

-Factores que promueven la transición de LRA a ERC:

Los riñones tienen la capacidad de volver a la función normal después de una agresión, aunque hay evidencia de modelos experimentales y en humanos de que la recuperación funcional completa es menos probable con el envejecimiento y en riñones con daño renal previo²⁰. Muchas de estas agresiones convergen en una vía común de isquemia-reperfusión con hipoxia renal localizada o generalizada²¹.

La inflamación y los cambios isquémicos resultantes de cualquier insulto renal afectan la oxigenación tisular, la generación local de óxido nítrico y una serie de citocinas profibróticas y proinflamatorias y factores de crecimiento con la subsiguiente producción de especies de oxígeno reactivas nocivas. Cada uno de estos factores, potencian el daño y la disfunción tisular e inician un proceso de reparación que puede ser adaptativo que conlleve a la resolución del cuadro o desadaptativo que resulta en fibrosis^{22,23}.

Por lo anterior, es imperativo buscar nuevas estrategias de diagnóstico temprano con la intención de incidir en estos procesos que pueden tornarse en la adaptación renal y progresión a ERC.

-Lesión renal aguda en COVID-19:

La prevalencia de la LRA en pacientes hospitalizados con COVID-19 es muy variada, en nuestro centro se reportó una prevalencia del 30%²⁴. La OMS ha definido a los pacientes críticos como aquellos que presentan distrés respiratorio agudo, choque séptico y/o trombosis aguda potencialmente mortal. En estos pacientes críticamente enfermos en UTI, la LRA se presenta más frecuentemente (hasta en el 90%) sobre todo los que se encuentran bajo VMI,^{25,26} y con tasas de requerimiento de diálisis de hasta el 35%.^{26,27} La LRA en este contexto es un marcador de disfunción orgánica múltiple y confiere mayor mortalidad.²⁸⁻³⁰

Se han propuesto múltiples mecanismos específicos y no específicos para LRA en COVID-19³¹⁻³⁹ (**Figura 1**), en los primeros se encuentran la citotoxicidad directa sobre células endoteliales, túbulo-epiteliales y podocitos, activación desequilibrada del sistema renina-angiotensina, citocinas pro-inflamatorias provocadas por la infección viral y estado pro-trombótico. Por otro lado, los mecanismos inespecíficos que se han observado en estos pacientes son: hipovolemia, infecciones nosocomiales, uso de nefrotóxicos y los cambios hemodinámicos ocasionados por la presión

positiva al final de la espiración (PEEP) elevada en pacientes con VMI. Además, se han reportado factores de “vulnerabilidad renal” que son inherentes al paciente como, la edad y comorbilidades (diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, enfermedad renal crónica, entre otras) que los hace más susceptibles a esta complicación. Definitivamente el daño renal ocasionado por COVID-19 no puede ser atribuido a uno solo de estos factores, ya que, al tratarse de pacientes críticamente enfermos suelen presentar diversas agresiones que contribuyen con el desenlace.

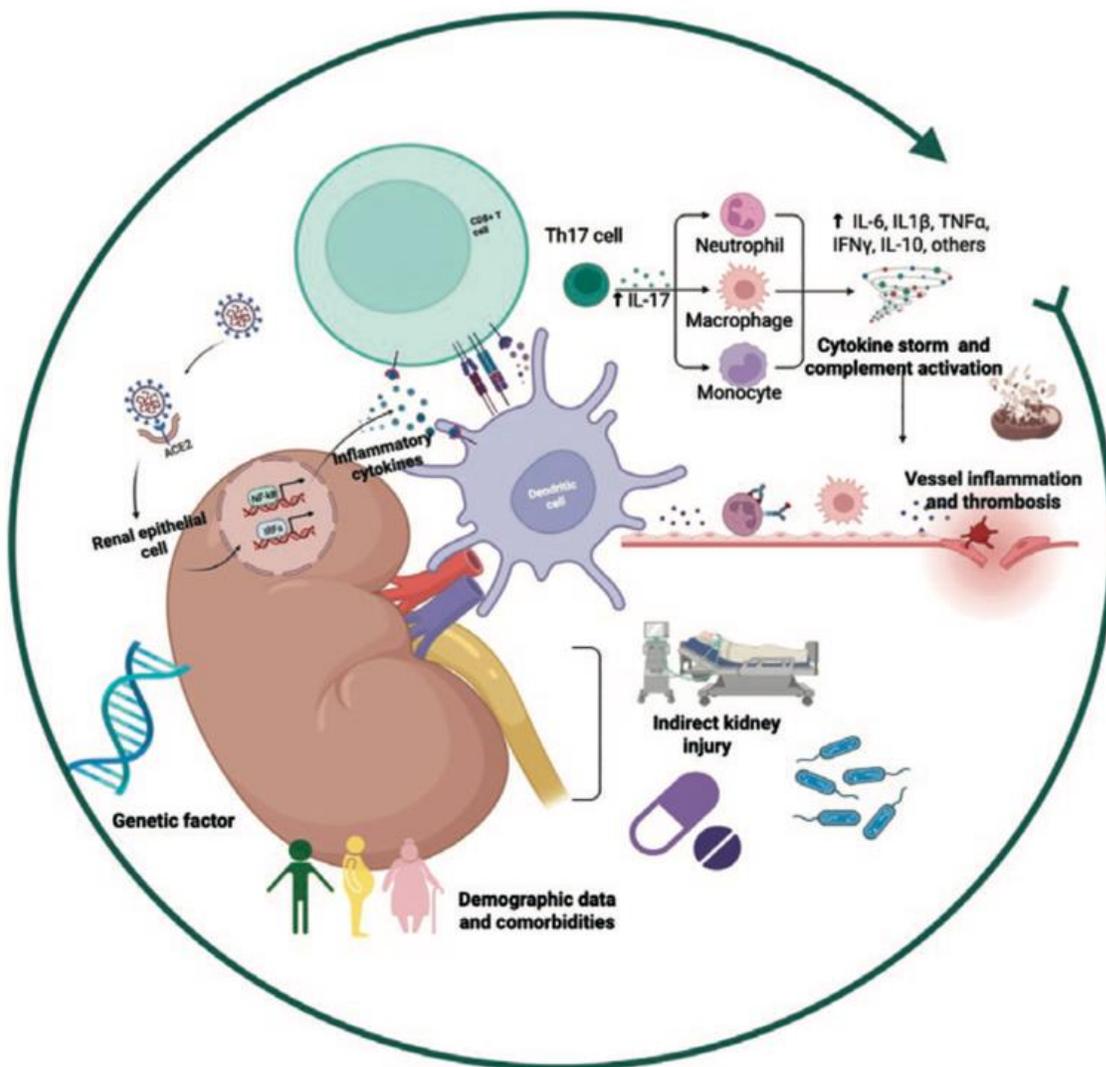


Figura 1: Mecanismos de LRA asociada a COVID-19 (imagen tomada de: Del Toro-Cisneros N., et al³¹).

Los desenlaces renales después de un episodio de LRA son variables según las poblaciones estudiadas y las definiciones de recuperación renal utilizadas. En el estudio

multicéntrico STOP-COVID se incluyeron más de 600 pacientes ingresados en la UTI con requerimiento de TRR, de los pacientes que sobrevivieron al alta (216 pacientes), el 34% seguía siendo dependiente de diálisis al alta y el 18% a los 60 días del ingreso en la UTI⁴⁰. Otra cohorte que incluyó exclusivamente a pacientes críticos y LRA mostró una recuperación de la función renal al alta del 74% en los casos con LRA sin necesidad de TRR, y del 67% en aquellos con LRA y TRR⁴¹. A largo plazo, se ha documentado que aún después de recuperar función renal hay una disminución acelerada de la función renal, en un estudio de cohorte de los Estados Unidos se comparó la tasa de disminución en la tasa de filtrado glomerular entre aquellos con LRA sin COVID-19, comparado con aquellos con LRA y COVID-19 con una diferencia de 11 ml/min/1.73m² siendo mayor el deterioro en los pacientes con COVID-19⁴². ***Lo anteriormente descrito demuestra que estos pacientes tienen peor pronóstico renal, por lo que contar con biomarcadores para predecir recuperación de la función renal en esta población es de suma importancia.***

Biomarcadores en lesión renal aguda

En las últimas décadas se han estudiado diversos biomarcadores urinarios y plasmáticos para predecir el desarrollo y la gravedad del episodio de LRA, pero solo unos pocos estudios han explorado la utilidad de los biomarcadores para predecir la recuperación de la función renal. Probablemente el biomarcador urinario/plasmático más estudiado en este contexto es la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) con pobre rendimiento diagnóstico en este contexto (área bajo la curva 0.54 para recuperación de función renal a 60 días), seguido de KIM 1 (AUC 0.49), uNGAL/albuminuria más un modelo de variables clínicas tuvo una AUC de 0.83 para predecir dependencia de diálisis a 30 días⁴³. Por lo que se siguen buscando biomarcadores que ayuden a predecir qué pacientes recuperarán función renal a largo plazo después de un evento de LRA grave con requerimiento de TRR⁴⁴⁻⁴⁶.

Particularmente en pacientes con COVID-19 se ha utilizado múltiples biomarcadores séricos y urinarios para predecir los desenlaces renales como: predicción de LRA y requerimiento de TRR. Los más reportados son nGAL, KIM-1 y TIMP-2/IGFBP7 (inhibidor tisular de metaloproteinasa-2 proteína ligadora del factor de crecimiento insulínico-7) con AUC entre 0.6 y 0.8 para predecir los desenlaces antes mencionados⁴⁶.

La uSerpina A3, es un biomarcador que nuestro grupo recientemente identificó para predecir la transición de LRA a ERC en un modelo murino¹, con resultados prometedores. También analizamos la presencia de esta proteína en orinas de pacientes con diversas patologías. Recientemente, reportamos que la uSerpina A3 identifica la actividad y la respuesta al tratamiento en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG)⁴⁷. Sin embargo, en LRA asociado a COVID-19 y en el seguimiento para predecir recuperación de la función renal no ha sido estudiada.

-Serpina A3

- Estructura:

El nombre acuñado para las serpinas se originó por su función principal: se describen como inhibidores de la serina proteasa. La estructura de la proteína serpina se caracteriza por un dominio central con tres hojas β y ocho o nueve hélices α . Un sello distintivo de las serpinas es el centro del bucle reactivo (RCL), un motivo proteico con un enlace escindible por la proteinasa diana. La masa molecular es de aproximadamente 46 a 55 kDa y por lo general tienen una longitud de 330 a 500 aminoácidos. Las serpinas se localizan en el compartimento intra y/o extracelular^{48,49}. En la **Tabla 2** se enlistan algunos ejemplos de serpinas y su asociación con afección orgánica.

| Serpina | Denominación | Diana | Órganos afectados |
|---------|---|------------------------------|--------------------------|
| A1 | Antitripsina | Elastasa de neutrófilos | Hígado y pulmón |
| A3 | Anti-quimiotripsina | Catepsina G (principalmente) | Riñón, ojo, pulmón y SNC |
| A6 | Globulina de unión a corticoesteroides | Unión a cortisol | Fatiga crónica |
| A7 | Globulina de unión a tiroxina | Unión a tiroxina | Tiroides (hipo) |
| B1 | Inhibidor de la elastasa de neutrófilos | Elastasa de neutrófilos | Pulmón, piel |
| B7 | Megsina | Maduración de megacariocitos | Nefropatía por IgA |

Tabla 2: Ejemplos de Serpinas y su localización principal.

- Mecanismo de acción:

Al contrario de lo que sucede con la mayoría de las enzimas y los inhibidores de proteasa de serina no serpina, las serpinas establecen un enlace covalente con su proteasa diana, inhibiendo así, la actividad de la proteasa al distorsionar su proteína diana o mediante un complejo con sus sustratos habituales dando como resultado la pérdida de la estructura y la distorsión de la proteinasa (**Figura 2**)^{1,48}.

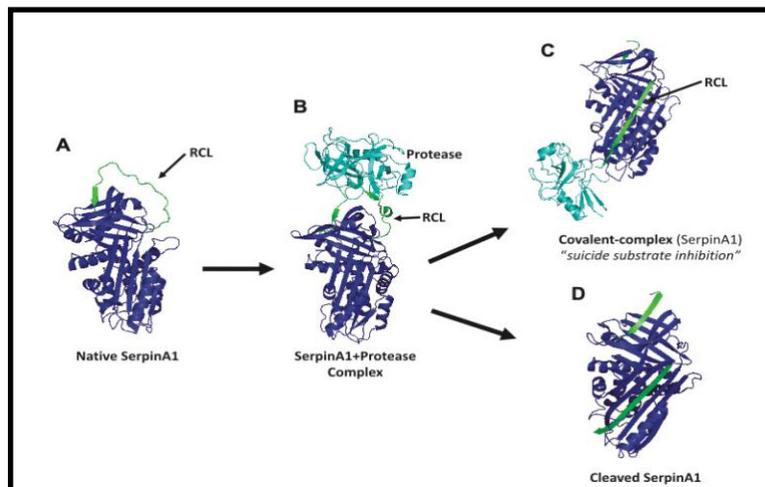


Figura 2: Mecanismos de acción de las Serpinas⁴⁸.

- Funciones:

Las funciones principales (funciones canónicas) de las serpinas es inhibir las proteasas funcionales que están implicadas en el proceso de coagulación, como el factor Xa, el factor XIa, la plasmina, el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el activador del plasminógeno uroquinasa (uPA). Varias de estas serpinas también pueden unirse a heparina y otros glicosaminoglicanos, regulando sus funciones¹. Las serpinas también participan en la regulación de la presión arterial, el transporte hormonal y la sensibilidad a la insulina, así como en procesos inflamatorios, respuesta celular de fase aguda y la activación del sistema del complemento. A pesar de la creencia anterior de que la función principal de las serpinas es actuar como inhibidores de la serina proteasa, muchos de los efectos que ejercen las serpinas están relacionados con vías no canónicas como su participación en: el estrés oxidativo, la proliferación celular y la apoptosis⁴⁸.

-Serpina A3, particularidades¹:

- También conocida como antiqumotripsina.
- Codificada en el cromosoma 14q32.1.
- Formada por 423 aminoácidos y una masa molecular de 55 a 66 kDa.
- La región promotora y los potenciadores poseen sitios de unión para el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear-1X (NF1) y el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT).
- El gen Serpina A3 está regulado por IL-1, IL-6 y oncostatina M, probablemente a través de la regulación de la translocación de factores de transcripción al núcleo para inducir la transcripción de estas citocinas; sin embargo, se desconoce el mecanismo específico.
- Se expresa en diferentes tejidos teniendo una expresión más alta en las retinas, los riñones, el hígado y el páncreas. Se ha encontrado elevada dentro del núcleo de las células malignas, particularmente en los cánceres de páncreas, estómago, hígado, mama y próstata.
- Parece unirse a la ADN polimerasa y a la ADN primasa, y esto puede ser un mecanismo regulador para controlar la replicación celular.

- **Proteasas diana: Serpina A3**

Inhibe varias serinas proteasas como: quimotripsina pancreática, catepsina G leucocitaria, quimasas de mastocitos, calicreína 2, calicreína 3 (también conocida como APE), elastasa catiónica pancreática y proteasa de suero pulmonar. Dentro de estas proteasas, la catepsina G es el principal objetivo de Serpina A3. La catepsina G se expresa en gránulos de neutrófilos y se secreta durante la inflamación⁴³.

- **Funciones: Serpina A3**

Varios estudios han demostrado la participación de Serpina A3 en la regulación de la angiogénesis, apoptosis, estrés oxidativo y respuestas inflamatorias, así como en la preservación del equilibrio de factores pro y antifibróticos. Se ha demostrado que KEAP1-NRF2, SOD2, Wnt, CTGF, fosfolipasa C, AKT y ERK1/2 están regulados por Serpina A3. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo específico por el cual Serpina A3 puede regular estas vías (vías no canónicas). Una posible explicación para esto podría estar relacionado con la capacidad de unirse al ADN, la ADN polimerasa y la ADN primasa^{1,48}.

- Enfermedades asociadas a Serpina A3^{1,48,49}:

1.- Pulmón:

Se han reconocido 2 mutaciones familiares de Serpina A3 en p.Leu55Pro y p. Pro229Ala dan como resultado una deficiencia de Serpina A3 que está relacionada con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

2.- Cerebro:

En el cerebro, las serpinas son sintetizadas por astrocitos que participan en la neurodegeneración y la neuroinflamación. La enfermedad cerebral asociada con Serpina A3 más estudiada es la enfermedad de Alzheimer dónde esta proteína podría unirse a proteínas b-amiloides y, por lo tanto, Serpina A3 forma parte de los depósitos de amiloide.

3.- Ojo:

La enfermedad ocular ha sido uno de los procesos patológicos más estudiados en los que participa Serpina A3. La administración de Serpina A3 recombinante fue capaz de reducir la neovascularización y la inflamación de la córnea en un modelo murino de quemadura corneal alcalina.

4.- Procesos oncológicos:

La actividad de Serpina A3 es diversa, según el tipo y localización del tumor. Por ejemplo, actúa como supresor en el cáncer hepatocelular a través de la regulación negativa de la vía PI3-quinasa/Akt/mTOR, permitiendo la inducción de la apoptosis de células cancerosas. Por el contrario, la sobreexpresión de Serpina A3 se asocia con la progresión del glioblastoma.

5.- Serpina A3 en enfermedades renales:

En condiciones normales, Serpina A3 se expresa principalmente en las células epiteliales del tubulares, pero está ausente en las estructuras glomerulares y en el intersticio. Al igual que en otros órganos, se sabe poco sobre el papel específico de Serpina A3 en la fisiología y fisiopatología renal⁴⁸.

El grupo liderado por la Dra. Bobadilla et al¹., han encontrado aumento de Serpina A3 en las tinciones de los túbulos renales proximales de las biopsias, en comparación con los tejidos renales normales, de una variedad de glomerulopatías primarias y secundarias, como la enfermedad de cambios mínimos, la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFyS), glomerulonefritis

proliferativa mesangial difusa, nefropatía membranosa (NM), nefropatía diabética, nefritis por IgA y nefritis lúpica (NL). Se especula que durante la lesión renal se filtran varias moléculas proteolíticas, lo que podría ser potencialmente dañino para los túbulos y por tal motivo la Serpina A3 se secreta en el espacio luminal, lo que explica su presencia en la orina¹.

Mediante espectrometría de masas de alta resolución se ha identificado la presencia anormal de Serpina A3 en la orina de ratas con enfermedad renal crónica (ERC)¹. En este estudio, Sánchez A. et al., evaluaron primero si Serpina A3 urinaria (uSerpinaA3) se podía detectar en ERC temprana en roedores con un modelo experimental de transición de lesión renal aguda (LRA) a ERC. Se observó una elevación progresiva de dicho marcador, de la proteinuria y la fibrosis renal durante la transición de LRA a ERC en las ratas. En un segundo tiempo, estudiaron la presencia de Serpina A3 en la orina de pacientes con diferentes enfermedades renales dónde uSerpina A3 tuvo correlación significativa con la fibrosis. En el análisis inmunohistoquímico, Serpina A3 se trasladó del citoplasma a la membrana tubular apical en la ERC. Los niveles de uSerpinaA3 aumentaron notablemente en pacientes con ERC secundaria a glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS), vasculitis asociada a ANCA (AAV) o nefritis lúpica proliferativa (NL) de clase III y IV en comparación con un grupo de voluntarios sanos. Además, aunque los niveles de uSerpinaA3 se correlacionaron significativamente con la fibrosis renal en los grupos de pacientes, los niveles de uSerpinaA3 en pacientes con otras enfermedades inflamatorias sin disfunción renal fueron similares a los de voluntarios sanos¹.

Basados en estos resultados, generamos la hipótesis de que Serpina A3 podría ser un marcador de recuperación de la función renal después de un episodio de LRA grave que requirió de TRR en pacientes con COVID-19 crítico, por lo que desarrollamos este estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La LRA grave en los pacientes con COVID-19 es ocasionada por los múltiples factores como los comentados, sabemos que cuando la LRA se presenta, impacta negativamente en el pronóstico a corto y a largo plazo. Al momento no contamos con marcadores que identifiquen de manera temprana aquellos pacientes que en su evolución progresarán a ERC. Los marcadores utilizados suelen reflejar un estado avanzado de la enfermedad y son influenciados por algunos factores que impiden la adecuada valoración de la función renal.

JUSTIFICACIÓN:

Por todo lo anteriormente expresado, consideramos necesario identificar un biomarcador no invasivo y que de manera más certera (no influenciado por factores externos) que sea capaz de predecir la recuperación renal y/o la transición de LRA a ERC. La proteína Serpina A3 posee las siguientes características que lo hacen un buen marcador:

1. En condiciones normales y de inflamación sin afección renal no se expresa en el riñón.
2. Su expresión no depende del estado nutricional del paciente.
3. Es detectado en orina una vez que se ha presentado daño tubular y se mantiene expresado en modelos murinos con ERC.

Pregunta de investigación:

¿La cinética de la proteína Serpina A3 es un biomarcador útil para predecir recuperación de la función renal en pacientes con COVID-19 crítico que tuvieron LRA grave y que requirieron TRR en la UTI?

Hipótesis alternativa:

Los pacientes que presentaron LRA grave con requerimiento de TRR condicionará elevación de la Serpina A3 que será de distinta magnitud entre aquellos que recuperen función renal y los que no la recuperen a los 90 días de su alta hospitalaria.

Objetivo principal:

Evaluar la cinética de la Serpina A3 como biomarcador de recuperación renal a 90 días en pacientes críticos con COVID-19 y LRA grave con requerimiento de TRR en la UTI.

Objetivos secundarios:

- Comparar la Serpina A3 como biomarcador de recuperación vs. HSP-72, KIM-1 y nGAL.
- Identificar las tasas de dependencia a diálisis a 90 días en pacientes con LRA que requirieron TRR en la UTI.
- Evaluar los valores de los diferentes biomarcadores y su asociación con mortalidad.

METODOLOGÍA:

- Estudio prospectivo, observacional, que se realizó del 01 de marzo de 2020 al 28 de febrero de 2022, dónde se incluyeron pacientes que ingresaron a UTI con LRA y requerimiento de TRR. Aprobado por el comité de ética e investigación del instituto con REF. 3325.
- Se obtuvieron datos demográficos, clínicos y de laboratorio del expediente clínico.
- Se firmó consentimiento informado para toma de muestras de sangre y orina.
- Muestras: Se recolectaron muestra de sangre y orina en los momentos que se muestran en la **figura 3**.
 - Las muestras se guardaron a -80°C en alícuotas de 2 mL en los siguientes minutos a su toma. Se estudió en orina Serpina A3, HSP-72, KIM-1 y nGAL. uSerpina A3 se analizó mediante Western-Blot en los momentos señalados en la figura 3 y mediante ELISA únicamente en el día cero, 7 y 14 días. Además, en muestra de sangre se analizaron interleucina 6, 10 y TNF-alfa.

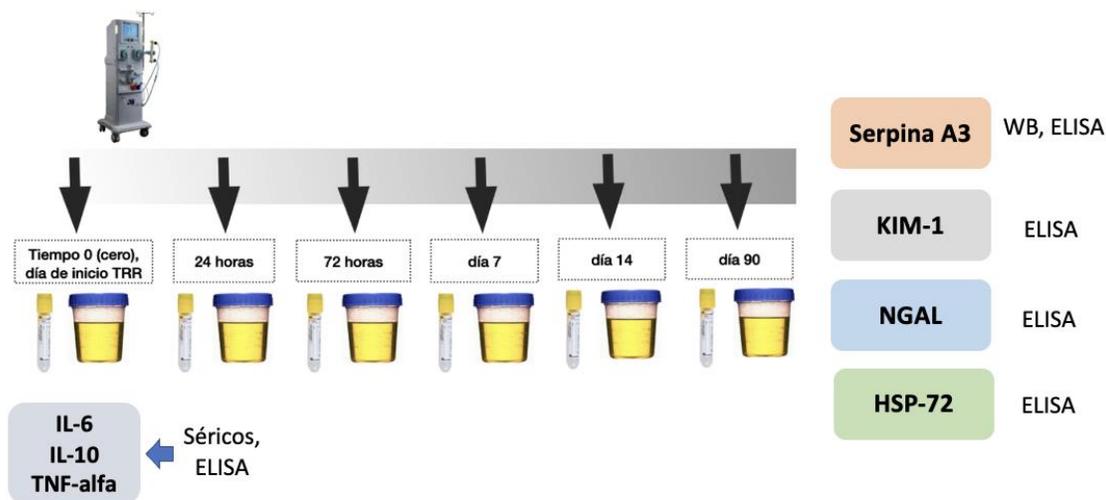


Figura 3. Los biomarcadores urinarios (uNGAL, uKIM-1, uHSP-72, uSerpina A3) se midieron en el día cero (día de inicio de TRR) y posteriormente en los días 1, 3, 7, 14 y 90 días después del inicio de TRR. Los biomarcadores séricos, IL-6, IL-10 y TNF-alfa, se midieron solo en la muestra al día cero.

Tamaño de muestra:

De acuerdo con el estudio realizado en el instituto por Sánchez-Navarro et al¹., dónde se realizó medición de Serpina A3 urinaria a pacientes con diversas clases de nefropatía lúpica, las dividimos en aquellas biopsias con fibrosis intersticial <14% y >15% y utilizando el calculo de tamaño de muestra según la fórmula de comparación de medias independientes, se obtuvo un total de 74 pacientes (37 pacientes por grupo contemplando un 20% de pérdidas) con una potencia del 80% y un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, dado el inicio de la pandemia por COVID-19 decidimos incluir a todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión en el periodo de estudio del 01 de marzo de 2020 al 28 de febrero de 2022.

Criterios de inclusión:

1. Firmar consentimiento informado.
2. Pacientes con LRA con requerimiento de TRR en cualquiera de sus modalidades: hemodiálisis intermitente (HDI), terapia lenta continua (CRRT) y/o diálisis intermitente prolongada (PIRRT) en UTI.
3. Pacientes mayores de 18 años.
4. Historia clínica completa y laboratorios al inicio de la terapia de reemplazo renal.

Inclusión de controles:

1. Se reclutaron pacientes controles sin LRA y con COVID-19 y VMI, pareados para edad (± 5 años) y comorbilidades para los pacientes sobrevivientes incluidos. Tomas de muestra de orina: cero (al ingreso), 24 horas y 72 horas.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes que no deseen participar en el estudio.
2. Paciente con ERC KDIGO G4-5 previamente documentada.
3. Trasplante de órganos sólidos (hígado/riñón).

Criterios de eliminación:

1. No se eliminó ningún paciente.

Toma de datos y mediciones de laboratorio

Las variables recogidas incluyeron datos demográficos, comorbilidades prevalentes, parámetros de laboratorio en el momento del inicio de la TRR (**Tabla 3**), soporte con fármacos vasoactivos (vasopresores o inotrópicos), medicamentos administrados en UTI y evolución de los pacientes.

La concentración urinaria de HSP70, NGAL y KIM-1 se analizaron con kits ELISA disponibles comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, DY008 Ancillary Reagent Kit 2, DY1663-5 para HSP70, DY1757-05 para NGAL y DY1750B para KIM-1). uSerpina A3 se evaluó mediante la técnica de Western blot y análisis densitométrico, como lo informaron previamente Martínez-Rojas et al⁴⁷. Las muestras correspondientes al tiempo cero, día 7 y 14 también fueron analizadas por ELISA según las instrucciones del fabricante (EH411RB, Thermo Scientific). La concentración sérica de IL-6, IL-10 y TNF-alfa, se midió con kits ELISA disponibles comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, DY008 Ancillary Reagent Kit 2, DY206-05 para IL-6, DY217B-05 para IL-10 y DY210-05 para TNF-alfa).

| Estudio | Parámetros incluidos |
|------------------------------------|---|
| Biometría hemática | Hemoglobina, hematocrito, leucocitos, linfocitos y plaquetas |
| Pruebas de función hepática | Bilirrubinas totales, bilirrubina directa, transaminasas (ALT y AST), fosfatasa alcalina y deshidrogenasa láctica |
| Química sanguínea | Glucosa, nitrógeno ureico, urea, creatinina (basal y al momento de LRA con requerimiento de TRR) |
| Electrolitos séricos | Sodio, potasio, cloro, calcio, CO ₂ |
| Coagulación | TP/TTP, INR, fibrinógeno, dímero D |
| Reactantes inflamatorios | Ferritina, PCR, procalcitonina |
| Gasometría arterial | PaO ₂ , pCO ₂ , bicarbonato, lactato |
| Seguimiento | Creatinina al alta, a los 30, 60 y 90 días. |

Tabla 3. Parámetros de laboratorio recabados de los pacientes incluidos en el estudio.

Definiciones operacionales

- **Lesión renal aguda (LRA):** Se definió LRA y se estadificó según las guías KDIGO por los criterios CrS (**Tabla 1**), no se registró diuresis⁵⁰.
- **Creatinina sérica (CrS) basal:** se definió como el valor medio de CrS en los 6 meses previos a la hospitalización, o el valor mínimo de CrS obtenido durante la primera semana de hospitalización si no se disponía de los valores previos⁵¹.
- Se calculó el índice de comorbilidad de Charlson para sintetizar la información de comorbilidades⁵².
- **Recuperación renal completa (RRC):** se definió como CrS dentro del 25 % de la CrS basal a los 90 días⁵³.
- **Recuperación renal parcial (RRP):** se definió como CrS superior al 25% en comparación con la CrS basal con independencia de la TRR a los 90 días⁵³.

Análisis estadístico

Para las variables continuas, su distribución se evaluó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. La estadística descriptiva se expresa como número (porcentaje), media (desviación estándar) y mediana (rango intercuartílico), según corresponda. Comparamos las características basales de los pacientes entre la RRC de la función renal y la RRP a los 90 días, además entre los vivos y muertos a los 90 días, utilizando el U-Mann-Whitney. Para las variables categóricas se utilizó la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher.

Los biomarcadores urinarios (NGAL, KIM-1, HSP-72, SerpinA3) se midieron en puntos de tiempo específicos, en el día cero (día de inicio de TRR) y posteriormente en los días 1, 3, 7 y 14 después del inicio de TRS. Los biomarcadores séricos, IL-6, IL-10 y TNF-alfa, se midieron solo en la muestra al día cero. Los biomarcadores uKIM-1 al tiempo cero y uSerpina A3 en el día 7 y 14 que fueron significativos para predecir RRC se calculó sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

Los factores asociados con RRC y RRP, así como mortalidad fueron evaluados por regresión logística univariada. Todas las variables con un valor de $p < 0.05$ y los factores previamente informados como asociados con el resultado primario se seleccionaron para el análisis multivariado. La edad, el sexo y el SOFA que fueron significativos en el análisis univariado y cada marcador se examinaron utilizando una característica operativa del receptor (ROC) para analizar la precisión en la recuperación renal completa. Edad, el sexo y la relación PaO₂/FiO₂ para la mortalidad.

La cinética de uSerpina A3 se realizó mediante análisis de ANOVA para muestras repetidas, para lo cual, primeramente, se realizó imputación para datos faltantes mediante medianas y posteriormente transformación logarítmica base 10. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y un valor de p por debajo de 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron con SPSS 26.0 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.).

RESULTADOS:

Población incluida y desenlaces

Desde el 01 de marzo de 2020 al 28 de febrero de 2022, hubo un total 1350 hospitalizaciones por COVID-19 con requerimiento de VMI (crítico), de ellos 60 (4.4%) pacientes cumplieron nuestros criterios de inclusión (**Figura 4**). Veintinueve pacientes (48%) sobrevivieron y recuperaron la función renal, de estos pacientes el 79% (23 pacientes) recuperaron de forma completa (RRC) y el resto parcial (RRP) a los 90 días. Ninguno de los pacientes que sobrevivieron a 90 días tuvieron dependencia a diálisis. Los 31 pacientes restantes (52%) murieron durante la hospitalización dependientes de diálisis. Además, incluimos 17 controles con COVID-19 crítico sin LRA, pareados a edad y sexo.

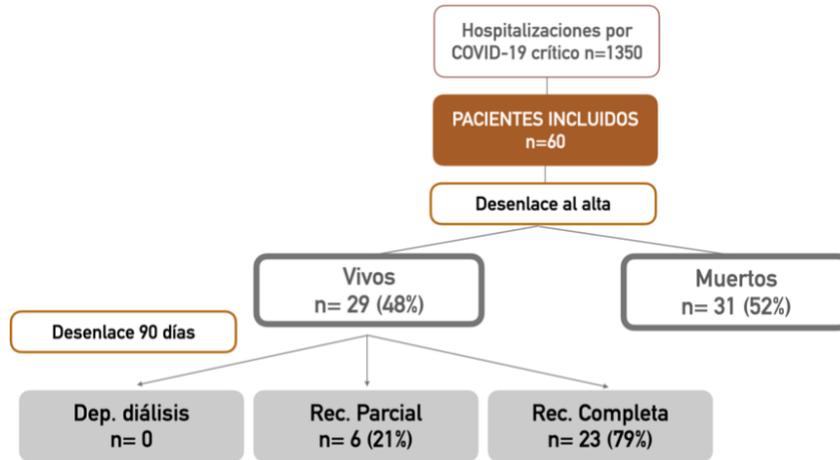


Figura 4: Pacientes incluidos en el estudio y desenlace.

Características clínicas

El promedio de edad de los pacientes incluidos fue de 54 años y el 77% correspondieron al sexo masculino. El índice de comorbilidad, escala de gravedad, así como parámetros bioquímicos al momento de la inclusión al estudio se proporcionan en la **Tabla 4**.

| | Pacientes (n=60) |
|--|-------------------------|
| Características demográficas | |
| Edad, años | 54 ± 12.3 |
| Hombre, n (%) | 46 (77) |
| Índice de masa corporal, kg/m ² | 30 (27-35) |
| Índice de Charlson, n (%) | 2 (0-3) |
| SOFA | 10 (9-11) |
| Días de hospitalización a inicio TRR | 6 (3-12) |
| Días de VMI a inicio TRR | 4 (2-8) |
| Función renal | |
| CrS basal, mg/dL | 1 (0.9-1.2) |
| CrS al inicio TRR, mg/dL | 4.4 (3.3-5.8) |
| Volumen urinario a inicio TRR, ml | 680 (253-1804) |
| CrS al egreso, mg/dL | 1.30 (0.73-2.27) |
| Laboratorios al inicio TRR | |
| Leucocitos, x 1000/mm ³ | 12 (8-15) |
| Proteína C reactiva, mg/dL | 16.9 (10.2-28.8) |
| Creatina fosfocinasa, U/L | 864 (122-1552) |
| Deshidrogenasa láctica, U/L | 468 (330-554) |
| Ferritina, ng/mL | 1037 (572-1801) |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 129 (101-165) |
| Tratamientos en UTI al inicio TRR | |
| Carbapenémicos, n (%) | 38 (63) |

| | |
|----------------------|---------|
| Vancomicina, n (%) | 27 (45) |
| Antifúngicos, n (%) | 6 (10) |
| Norepinefrina, n (%) | 49 (82) |

Nota. Las variables continuas son expresadas en mediana (rango intercuartil) o media (desviación estándar) según corresponda.

Abreviaturas. SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score; TRR, terapia de reemplazo renal; VMI, ventilación mecánica invasiva; CrS, creatinina sérica; UTI, unidad de terapia intensiva; PaO₂/FiO₂, relación presión arterial de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio.

Características clínicas: RRC vs RRP

Dado nuestro objetivo primario, comparamos las características clínicas de los pacientes con RRC y RRP, hubo diferencia solo en los niveles de leucocitos y ferritina (**Tabla 5**). Sin embargo, los niveles de otros marcadores inflamatorios IL-6, IL-10 y TNF-alfa no mostraron diferencias (vide infra).

| | RRC (n=23) | RRP (n=6) | Valor p |
|--|------------------------|----------------------|----------------|
| Características demográficas | | | |
| Edad, años | 51 ± 13.4 | 47 ± 9.8 | 0.45 |
| Hombre, n (%) | 16 (70) | 4 (67) | 1.00 |
| Índice de masa corporal, kg/m ² | 31.2 (28.9-36.6) | 31.2 (31.1-33.4) | 0.86 |
| Índice de Charlson, n (%) | 1 (0-3) | 2 (0-4) | 0.49 |
| SOFA | 10 (9-11) | 9 (7-12) | 0.53 |
| Días de hospitalización a inicio TRR | 6 (2-15) | 5 (4-8) | 0.73 |
| Días de VMI a inicio TRR | 3 (2-8) | 3 (2-5) | 0.58 |
| Función renal | | | |
| CrS basal, mg/dL | 1 (0.8-1.2) | 0.9 (0.7-1.1) | 0.80 |
| CrS al inicio TRR, mg/dL | 4.5 (3.3-5.9) | 5.7 (5.1-6.9) | 0.32 |
| Volumen urinario a inicio TRR, ml | 587 (301-1316) | 1091 (249-1855) | 0.56 |
| CrS al egreso, mg/dL | 0.83 (0.68-1.76) | 3.89 (1.85-4.87) | 0.01 |
| Laboratorios al inicio TRR | | | |
| Leucocitos, x 1000/mm³ | 13 (10-16) | 7 (6-9) | 0.01 |
| Proteína C reactiva, mg/dL | 19.2 (10.2-28.3) | 12.3 (10.4-18.4) | 0.53 |
| Creatina fosfocinasa, U/L | 340 (100-1225) | 267 (43-753) | 0.25 |
| Deshidrogenasa láctica, U/L | 468 (347-554) | 312 (275-524) | 0.21 |
| Ferritina, ng/mL | 1171 (602-1815) | 443 (327-901) | 0.05 |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 144 (110-170) | 160 (113-175) | 0.67 |
| Tratamientos en UTI al inicio TRR | | | |

| | | | |
|-----------------------|---------|--------|------|
| Carbapenémicos, n (%) | 17 (74) | 2 (33) | 0.16 |
| Vancomicina, n (%) | 11 (48) | 3 (50) | 1.00 |
| Antifúngicos, n (%) | 3 (13) | 1 (17) | 1.00 |
| Norepinefrina, n (%) | 20 (87) | 3 (50) | 0.12 |

Nota. Las variables continuas son expresadas en mediana (rango intercuartil) o media (desviación estándar) según corresponda.

Abreviaturas. RCR, recuperación renal completa; RPR, recuperación renal parcial; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score; TRR, terapia de reemplazo renal; VMI, ventilación mecánica invasiva CrS, creatinina sérica; UTI, unidad de terapia intensiva; PaO₂/FiO₂, relación presión arterial de oxígeno y gracción inspirada de oxígeno.

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio divididos por recuperación completa de la función renal (RRC) y recuperación parcial (RRP).

Características clínicas: vivos vs muertos

Al analizar las características clínicas de los pacientes que sobrevivieron, no se observaron diferencias en cuanto a edad, sexo, comorbilidades, función renal basal o escalas de gravedad al inicio del TRR (**Tabla 6**). Únicamente los valores de Creatina fosfoquinasa (CPK) fueron mayores entre los fallecidos (p=0.02)

| | Vivos (n=29) | Muertos (n=31) | Valor p |
|--|----------------------|------------------------|-------------|
| Características demográficas | | | |
| Edad, años | 51 ± 12.2 | 56 ± 12.2 | 0.09 |
| Hombre, n (%) | 20 (69) | 26 (84) | 0.17 |
| Índice de masa corporal, kg/m ² | 31 (29-35) | 29 (27-38) | 0.24 |
| Índice de Charlson, n (%) | 1 (0-2) | 2 (0-3) | 0.32 |
| SOFA | 10 (9-11) | 10 (9-11) | 0.54 |
| Días de hospitalización a inicio TRR | 5 (2-12) | 6 (4-12) | 0.42 |
| Días de VMI a inicio TRR | 3 (2-5) | 6 (3-9) | 0.08 |
| Función renal | | | |
| CrS basal, mg/dL | 1 (0.8-1.2) | 1 (0.9-1.2) | 0.82 |
| CrS al inicio TRR, mg/dL | 5.1 (3.5-6) | 4.2 (3.3-5) | 0.16 |
| Volumen urinario a inicio TRR, ml | 612 (280-1347) | 994 (250-2112) | 0.42 |
| Laboratorios al inicio TRR | | | |
| Leucocitos, x 1000/mm ³ | 12 (9-15) | 12 (8-17) | 0.78 |
| Proteína C reactiva, mg/dL | 16.2 (10.3-27) | 19 (7.6-29.3) | 0.91 |
| Creatina fosfoquinasa, U/L | 369 (69-1049) | 1013 (302-1852) | 0.02 |
| Deshidrogenasa láctica, U/L | 433 (313-552) | 482 (335-586) | 0.61 |
| Ferritina, ng/mL | 939 (532-1689) | 1202 (613-1855) | 0.28 |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 144 (113-170) | 123 (96-154) | 0.14 |
| Tratamientos en UTI al inicio TRR | | | |
| Carbapenémicos, n (%) | 18 (62) | 20 (65) | 0.84 |
| Vancomicina, n (%) | 13 (45) | 14 (45) | 0.98 |

| | | | |
|----------------------|---------|---------|------|
| Antifúngicos, n (%) | 3 (10) | 3 (10) | 1.00 |
| Norepinefrina, n (%) | 22 (76) | 27 (87) | 0.33 |

Nota. Las variables continuas son expresadas en mediana (rango intercuartil) o media (desviación estándar) según corresponda.

Abreviaturas. SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score; TRR, terapia de reemplazo renal; VMI, ventilación mecánica invasiva CrS, creatinina sérica; UTI, unidad de terapia intensiva; PaO₂/FiO₂, relación presión arterial de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno.

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio divididos entre aquellos que sobrevivieron y los fallecidos.

Niveles de biomarcadores en pacientes con recuperación renal completa

Los valores de los biomarcadores séricos y urinarios fueron analizados entre aquellos que tuvieron recuperación renal completa y recuperación renal parcial, encontramos diferencias en los valores de uHSP-72 a las 24 y 72 horas posterior al inicio de TRR (p=0.04). No hubo diferencias en el resto de los biomarcadores medidos en los diferentes tiempos analizados (**Tabla 7**).

| Biomarcador | Tiempo | RRC (n=23) | RRP (n=6) | Valor p |
|--------------------|--------------|--------------------------|-------------------------|-------------|
| uSerpina A3, µg/mg | Día 0 | 16.62 (3.84-29.44) | 9.72 (1.23-77.62) | 0.98 |
| | Día 7 | 10.51 (2.18-27.19) | 40.03 (3.97-62.20) | 0.47 |
| | Día 14 | 4.77 (2.14-26.07) | 28.43 (1.73-64.52) | 0.41 |
| uKIM-1, µg/mg | Día 0 | 3.66 (2.12-8.19) | 2.17 (0.65-4.90) | 0.33 |
| | Día 1 | 3.67 (1.56-6.17) | 0.78 (0.64-7.46) | 0.41 |
| | Día 3 | 2.97 (1.65-4.77) | 0.96 (0.73-5.71) | 0.56 |
| | Día 7 | 2.43 (1.73-3.83) | 3.06 (0.74-4.87) | 0.87 |
| | Día 14 | 3.67 (3.22-5.13) | 2.15 (1.31-7.81) | 0.35 |
| uHSP-72, µg/mg | Día 0 | 1.62 (0.35-7.96) | 0.25 (0.11-0.35) | 0.10 |
| | Día 1 | 3.10 (0.68-12.74) | 0.09 (0.02-0.20) | 0.04 |
| | Día 3 | 3.25 (1.17-24.72) | 0.05 (0.01-0.07) | 0.04 |
| | Día 7 | 4.47 (0.10-16.89) | 1.21 (0.00-2.65) | 0.24 |
| | Día 14 | 2.88 (0.26-15.59) | 0.55 (0.12-4.19) | 0.68 |
| uNGAL, µg/mg | Día 0 | 2108 (1208-5170) | 398 (375-3218) | 0.26 |
| | Día 1 | 2726 (399-4217) | 530 (499-953) | 0.41 |
| | Día 3 | 1826 (136-3888) | 270 (222-683) | 0.41 |
| | Día 7 | 1656 (262-4125) | 965 (196-3291) | 0.43 |
| | Día 14 | 1145 (110-3917) | 816 (571-2103) | 0.73 |
| TNF-alfa, pg/ml | Día 0 | 33.50 (26.60-52.80) | 42.55 (40.30-44.60) | 0.21 |

| | | | | |
|--------------|-------|----------------------|----------------------|------|
| IL-6, pg/ml | Día 0 | 75.20 (30.20-112.40) | 94.65 (43.00-242.60) | 0.48 |
| IL-10, pg/ml | Día 0 | 23.90 (18.20-39.10) | 22.65 (21.80-52.80) | 0.69 |

Nota. Los datos se reportan como mediana y rango intercuartil. Para comparar los 2 grupos se utilizó U de Mann-Whitney.

Tabla 7. Valores de los diferentes biomarcadores en los pacientes con recuperación completa de la función renal (RRC) y recuperación parcial (RRP).

Niveles de biomarcadores y mortalidad

Los valores de los biomarcadores entre los pacientes que sobrevivieron y los que fallecieron, se documentó diferencia únicamente en los niveles de uKIM-1 al tiempo cero (inicio de TRR) con una mediana de 3.63µg/mg en los vivos y 1.77 µg/mg en los que fallecieron (p=0.03). En el resto de los biomarcadores séricos y urinarios no hubo diferencias.

Además, los niveles de los biomarcadores fueron comparados con el grupo control conformado por pacientes con COVID-19 crítico sin LRA, pareado a los sobrevivientes a edad y sexo, como se muestra en la **Tabla 8**, los controles presentaron niveles menores de todos los biomarcadores, siendo estadísticamente significativo para uSerpina A3, uKIM-1 (únicamente día 14), uNGAL, TNF-alfa e IL-10.

| Biomarcador | Tiempo | Control (n=17) | Vivos (n=29) | Muertos (n=31) | Valor p | |
|--------------------|--------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------|------------------|
| | | | | | entre grupos | vivos vs muertos |
| uSerpina A3, µg/mg | Día 0 | 0.03 (0.01-0.09) | 12.6 (3.24-36.41) | 28.12 (9.37-50.28) | 0.00 | 0.10 |
| | Día 7 | 0.02 (0.007-0.10) | 12 (2.46-52.62) | 7.43 (2.96-25.91) | 0.00 | 0.65 |
| | Día 14 | 0.03 (0.006-0.15) | 8.53 (1.73-40.92) | 5.90 (3.81-55.39) | 0.00 | 0.76 |
| uKIM-1, µg/mg | Día 0 | 2.00 (0.88-3.27) | 3.63 (1.51-8.19) | 1.77 (0.69-2.68) | 0.05 | 0.03 |
| | Día 1 | - | 3.55 (0.85-6.75) | 2.02 (1.10-4.24) | - | 0.25 |
| | Día 3 | - | 2.90 (0.96-5.30) | 2.30 (0.68-8.09) | - | 0.93 |
| | Día 7 | 1.48 (0.76-3.11) | 2.43 (1.51-4.11) | 2.31 (0.75-4.72) | 0.38 | 0.70 |
| | Día 14 | 1.76 (0.89-3.25) | 3.56 (2.12-5.49) | 2.88 (1.60-5.75) | 0.02 | 0.56 |
| uHSP-72, µg/mg | Día 0 | 0.84 (0.20-2.54) | 1.09 (0.29-7.96) | 1.31 (0.09-14.97) | 0.72 | 0.88 |
| | Día 1 | - | 1.58 (0.37-9.50) | 0.98 (0.15-4.27) | - | 0.50 |
| | Día 3 | - | 2.03 (0.30-24.72) | 2.86 (0.68-12.23) | - | 0.76 |
| | Día 7 | 2.86 (0.39-4.84) | 3.15 (0.70-16.21) | 0.40 (0.00-10.34) | 0.80 | 0.60 |
| | Día 14 | 1.17 (0.56-8.30) | 1.91 (0.21-15.50) | 2.47 (0.32-15.63) | 0.90 | 0.66 |
| uNGAL, µg/mg | Día 0 | 57 (29-135) | 2081 (630-5170) | 757 (261-3017) | 0.00 | 0.12 |
| | Día 1 | - | 1128 (454-3908) | 783 (285-6523) | - | 0.93 |
| | Día 3 | - | 1253 (136-3888) | 1551 (301-15339) | - | 0.44 |
| | Día 7 | 61 (13-160) | 1534 (229-3935) | 862 (59-7059) | 0.00 | 0.96 |
| | Día 14 | 307 (24-705) | 993 (161-3917) | 474 (108-2854) | 0.04 | 0.56 |

| | | | | | | |
|-----------------|-------|-------------|-------------|---------------|------|------|
| TNF-alfa, pg/ml | Día 0 | 20 (13-26) | 35 (29-52) | 39.40 (24-54) | 0.00 | 0.83 |
| IL-6, pg/ml | Día 0 | 68 (40-137) | 75 (36-139) | 87 (41-207) | 0.44 | 0.31 |
| IL-10, pg/ml | Día 0 | 23 (15-33) | 23 (20-39) | 37 (26-64) | 0.03 | 0.06 |

Nota. Los datos se reportan como mediana y rango intercuartil. La estadística inferencial para comparar los 3 grupos se utilizó prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y para comparar vivos vs muertos se utilizó U de Mann-Whitney.

Tabla 8. Valores de los diferentes biomarcadores en los pacientes vivos, muertos y controles.

Modelos de predicción para recuperación renal completa

Las áreas bajo la curva (AUC) de cada biomarcador para predecir recuperación renal completa se muestran en la **Tabla 9**. Los marcadores con mejor rendimiento fueron uKIM-1 en la muestra del día cero, con una AUC de 0.71 (95% CI 0.55-0.86, $p=0.02$), el valor de corte de 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ presentó una sensibilidad de 90%, con especificidad del 28%, valor predictivo positivo de 57% y valor predictivo negativo de 73%. La uSerpina A3 medida mediante Western Blot al día 7 y 14 después del inicio de TRR mostraron AUC de 0.68 y 0.71 respectivamente ($p=0.04$ y 0.03), en ambos momentos el valor de corte (obtenido por ELISA) fue de 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ con una sensibilidad de 84%, con especificidad del 30%, valor predictivo positivo de 55% y valor predictivo negativo de 65%. El resto de los biomarcadores, niveles de interleucinas y volumen urinario mostraron AUC entre 0.4 y 0.6 sin diferencias significativas.

| Biomarcador | Tiempo | AUC (95% IC) | Valor p |
|------------------------------------|---------------|-------------------------|-------------|
| Biomarcador urinario | | | |
| uKIM-1**, $\mu\text{g}/\text{mg}$ | Día 0 | 0.71 (0.55-0.86) | 0.02 |
| | Día 1 | 0.63 (0.46-0.81) | 0.14 |
| | Día 3 | 0.54 (0.37-0.71) | 0.67 |
| | Día 7 | 0.52 (0.34-0.70) | 0.85 |
| | Día 14 | 0.60 (0.40-0.80) | 0.28 |
| uHSP-72**, $\mu\text{g}/\text{mg}$ | Día 0 | 0.59 (0.43-0.75) | 0.32 |
| | Día 1 | 0.67 (0.50-0.83) | 0.07 |
| | Día 3 | 0.58 (0.41-0.75) | 0.38 |
| | Día 7 | 0.60 (0.43-0.77) | 0.26 |
| | Día 14 | 0.49 (0.30-0.69) | 0.95 |
| uNGAL**, $\mu\text{g}/\text{mg}$ | Día 0 | 0.67 (0.52-0.82) | 0.05 |
| | Día 1 | 0.55 (0.37-0.72) | 0.63 |
| | Día 3 | 0.50 (0.32-0.67) | 0.95 |
| | Día 7 | 0.55 (0.37-0.73) | 0.58 |
| | Día 14 | 0.51 (0.32-0.70) | 0.93 |
| uSerpina A3*, DPI/mg | Día 0 | 0.59 (0.43-0.75) | 0.30 |
| | Día 1 | 0.61 (0.45-0.78) | 0.22 |
| | Día 3 | 0.56 (0.39-0.73) | 0.49 |
| | Día 7 | 0.68 (0.52-0.85) | 0.04 |
| | Día 14 | 0.71 (0.53-0.89) | 0.03 |

| | | | |
|-------------------------------|--------|------------------|------|
| uSerpina A3**, µg/mg | Día 0 | 0.61 (0.47-0.76) | 0.14 |
| | Día 7 | 0.49 (0.31-0.66) | 0.87 |
| | Día 14 | 0.58 (0.39-0.77) | 0.43 |
| Volumen urinario >500ml | Día 0 | 0.53 (0.38-0.68) | 0.72 |
| Volumen urinario >1L | Día 0 | 0.61 (0.47-0.76) | 0.14 |
| Biomarcador plasmático | | | |
| IL-6**, pg/ml | Día 0 | 0.58 (0.37-0.67) | 0.83 |
| IL-10**, pg/ml | Día 0 | 0.64 (0.50-0.79) | 0.07 |
| TNF-alfa**, pg/ml | Día 0 | 0.57 (0.41-0.73) | 0.37 |

Abreviaturas. AUC, área bajo la curva; *Mediante western blot. **Mediante ELISA.

Tabla 9. Área bajo de curva operador-receptor de biomarcadores para predecir recuperación renal completa.

Modelos con variables clínicas y biomarcadores para predecir recuperación renal completa

Los factores asociados a la recuperación renal completa que fueron evaluados por regresión logística fueron: edad, sexo y SOFA > 8 puntos, que resultaron significativos en el análisis univariado y que se mantuvieron significativos en el análisis ajustado por edad y sexo (**Tabla 10**). También describimos la precisión en la predicción de la recuperación renal para cada variable individualmente y luego junto con los biomarcadores urinarios y séricos tomados al inicio de la TRR y aquellos que individualmente fueron significativos. La adición de biomarcadores a las variables clínicas mejoró ligeramente el rendimiento de edad + uNGAL (AUC 0.67, IC 95% 0.52-0.82, p=0.054), sexo (masculino) + uNGAL (AUC 0.67, IC 95% 0.52-0.82, p=0.051), sin embargo, al realizar el análisis de muestras emparejadas para comparar curvas ROC (curva con solo biomarcador vs. biomarcador y variables clínicas) no hubo significancia estadística. Por otro lado, la asociación de sexo (masculino) + uKIM-1 y SOFA >8 puntos + uKIM-1 mejoró el desempeño respecto a las variables clínicas individuales (AUC 0.69 y 0.70, respectivamente) aunque en el análisis emparejado no hubo significancia. IL-10 mejoró el desempeño de la edad y con tendencia a diferencia significativa en su asociación con género masculino y SOFA >8. Asociar las 3 variables clínicas a IL10 presentó un AUC de 0.69 con un IC 95% de 0.55-0.83, p=0.013. El resto de los modelos se muestran en la **Tabla 11**.

| Característica | Univariado | | | Multivariado | | |
|------------------|------------|--------------|---------|--------------|--------------|---------|
| | OR | IC 95% | Valor p | OR | IC 95% | Valor p |
| Edad, por año | 1.031 | 0.955-1.111 | 0.436 | 1.127 | 0.108-11.725 | 0.920 |
| Hombre, vs mujer | 1.214 | 0.179-8.217 | 0.842 | 1.020 | 0.933-1.114 | 0.669 |
| SOFA >8, Vs no | 11 | 1.271-95.178 | 0.029 | 17.287 | 1.435-208.23 | 0.025 |

Abreviaturas. OR, odds ratio; IC 95%, intervalo de confianza al 95%; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score.

Tabla 10. Análisis de regresión logística uni y multivariado para recuperación completa de la función renal.

| Recuperación completa de la función renal | | AUC (IC 95%) | Valor p | |
|---|--|------------------|------------------|------|
| VARIABLES CLÍNICAS | | | | |
| Edad, por año | | 0.56 (0.41-0.72) | 0.41 | |
| Hombre, vs mujer | | 0.56 (0.41-0.71) | 0.46 | |
| SOFA >8 puntos al inicio TRR | | 0.55 (0.40-0.70) | 0.51 | |
| MODELOS | | | | |
| Edad + uKIM-1 | | Día 0 | 0.56 (0.40-0.73) | 0.48 |
| Edad + uHSP-72 | | | 0.52 (0.35-0.68) | 0.85 |
| Edad + uNGAL | | | 0.67 (0.52-0.82) | 0.05 |
| Edad + uSerpina A3* | | | 0.49 (0.32-0.66) | 0.92 |
| Edad + uSerpina A3** | | | 0.38 (0.22-0.53) | 0.15 |
| Edad + IL-6 | | | 0.60 (0.45-0.74) | 0.20 |
| Edad + IL-10 | | | 0.69 (0.55-0.83) | 0.01 |
| Edad + TNF-alfa | | | 0.56 (0.41-0.72) | 0.41 |
| Edad + uSerpina A3* | | Día 7 | 0.48 (0.32-0.66) | 0.81 |
| Edad + uSerpina A3* | | Día 14 | 0.46 (0.27-0.66) | 0.71 |
| Hombre + uKIM-1 | | Día 0 | 0.69 (0.53-0.85) | 0.03 |
| Hombre + uHSP-72 | | | 0.55 (0.38-0.71) | 0.60 |
| Hombre + uNGAL | | | 0.67 (0.52-0.82) | 0.05 |
| Hombre + uSerpina A3* | | | 0.64 (0.48-0.80) | 0.11 |
| Hombre + uSerpina A3** | | | 0.52 (0.34-0.69) | 0.85 |
| Hombre + IL-6 | | | 0.60 (0.45-0.75) | 0.20 |
| Hombre + IL-10 | | | 0.64 (0.50-0.79) | 0.07 |
| Hombre + TNF-alfa | | | 0.57 (0.41-0.73) | 0.37 |
| Hombre + uSerpina A3* | | Día 7 | 0.52 (0.34-0.69) | 0.85 |
| Hombre + uSerpina A3* | | Día 14 | 0.58 (0.39-0.77) | 0.39 |
| SOFA >8 puntos + uKIM-1 | | Día 0 | 0.70 (0.55-0.86) | 0.02 |
| SOFA >8 puntos + uHSP-72 | | | 0.57 (0.41-0.74) | 0.40 |
| SOFA >8 puntos + uNGAL | | | 0.67 (0.52-0.82) | 0.05 |
| SOFA >8 puntos + uSerpina A3* | | | 0.64 (0.48-0.79) | 0.12 |
| SOFA >8 puntos + uSerpina A3** | | | 0.54 (0.37-0.70) | 0.68 |
| SOFA >8 puntos + IL-6 | | | 0.40 (0.26-0.55) | 0.20 |
| SOFA >8 puntos + IL-10 | | | 0.64 (0.49-0.78) | 0.08 |
| SOFA >8 puntos + TNF-alfa | | | 0.57 (0.41-0.73) | 0.37 |
| SOFA >8 puntos + uSerpina A3* | | Día 7 | 0.52 (0.34-0.69) | 0.85 |
| SOFA >8 puntos + uSerpina A3* | | Día 14 | 0.58 (0.39-0.77) | 0.39 |
| Edad + Hombre + SOFA + IL-10 | | Día 0 | 0.69 (0.55-0.83) | 0.01 |

| | | |
|------------------------------|------------------|------|
| Edad + Hombre + SOFA + uNGAL | 0.67 (0.52-0.82) | 0.05 |
| Hombre + SOFA + uKIM-1 | 0.68 (0.52-0.84) | 0.03 |

*ELISA, **Western blot

Tabla 11. Área bajo la curva de diferentes modelos (incluyendo variables clínicas y biomarcadores) para predecir recuperación completa de la función renal.

Modelos de predicción para mortalidad

Las AUC de los biomarcadores para predecir mortalidad se muestran en la **Tabla 12**. uKIM-1 en la muestra inicial presentó AUC 0.68 con IC 95% 0.53-0.84, $p=0.03$. En el resto de los tiempos no hubo diferencia significativa. Por otro lado, uSerpina A3 medido por Western Blot en los días 7 y 14 mostró AUC 0.75 y 0.76 respectivamente ($p=0.01$ y 0.02). De los biomarcadores séricos, solo IL-10 refleja tendencia para predecir este desenlace.

| Biomarcador | Tiempo | AUC (95% IC) | Valor <i>p</i> |
|-------------------------------|---------------|-------------------------|----------------|
| Biomarcador urinario | | | |
| uKIM-1**, µg/mg | Día 0 | 0.68 (0.53-0.84) | 0.03 |
| | Día 1 | 0.60 (0.43-0.77) | 0.25 |
| | Día 3 | 0.51 (0.33-0.69) | 0.93 |
| | Día 7 | 0.54 (0.35-0.73) | 0.70 |
| | Día 14 | 0.56 (0.34-0.79) | 0.56 |
| uHSP-72**, µg/mg | Día 0 | 0.51 (0.34-0.68) | 0.32 |
| | Día 1 | 0.44 (0.27-0.61) | 0.50 |
| | Día 3 | 0.53 (0.35-0.70) | 0.76 |
| | Día 7 | 0.45 (0.27-0.64) | 0.60 |
| | Día 14 | 0.45 (0.24-0.66) | 0.66 |
| uNGAL**, µg/mg | Día 0 | 0.63 (0.47-0.79) | 0.12 |
| | Día 1 | 0.51 (0.33-0.68) | 0.93 |
| | Día 3 | 0.43 (0.26-0.61) | 0.44 |
| | Día 7 | 0.51 (0.31-0.71) | 0.96 |
| | Día 14 | 0.56 (0.35-0.77) | 0.56 |
| uSerpinaA3*, DPI/mg | Día 0 | 0.52 (0.36-0.69) | 0.78 |
| | Día 1 | 0.58 (0.41-0.75) | 0.37 |
| | Día 3 | 0.54 (0.37-0.72) | 0.62 |
| | Día 7 | 0.75 (0.59-0.92) | 0.01 |
| | Día 14 | 0.76 (0.58-0.95) | 0.02 |
| uSerpinaA3**, µg/mg | Día 0 | 0.64 (0.48-0.80) | 0.10 |
| | Día 7 | 0.54 (0.37-0.72) | 0.65 |
| | Día 14 | 0.47 (0.26-0.68) | 0.76 |
| Volumen urinario >500ml | Día 0 | 0.51 (0.37-0.66) | 0.86 |
| Volumen urinario >1L | Día 0 | 0.59 (0.44-0.73) | 0.25 |
| Biomarcador plasmático | | | |
| IL-6**, pg/ml | Día 0 | 0.57 (0.43-0.72) | 0.31 |
| IL-10**, pg/ml | Día 0 | 0.64 (0.50-0.79) | 0.06 |

| | | | |
|-------------------|-------|------------------|------|
| TNF-alfa**, pg/ml | Día 0 | 0.52 (0.37-0.67) | 0.83 |
|-------------------|-------|------------------|------|

Abreviaturas. AUC, área bajo la curva; *Mediante western blot. **Mediante ELISA.

Tabla 12. Área bajo de curva operador-receptor de biomarcadores para predecir mortalidad.

Modelos con variables clínicas y biomarcadores para predecir mortalidad

Las variables significativas y plausibles en el análisis multivariado fueron analizadas mediante curvas ROC: edad, sexo y el cociente PaO₂/FiO₂ (**Tabla 13**). Posteriormente, analizamos el desempeño de las variables clínicas para predecir la mortalidad en conjunto con los biomarcadores medidos. Agregar edad a IL-10 mejoró el rendimiento con AUC 0.73 (IC del 95%: 0.60-0.86, p = 0.002). uKIM-1 + sexo (masculino) AUC 0.68 (IC 95% 0.53-0.84, p=0.03), sin embargo, ninguno fue estadísticamente significativo en análisis de curvas ROC emparejadas. El resto de los modelos elaborados no mostraron mejorar la precisión (**Tabla 14**).

| Características | Univariado | | | Multivariado | | |
|---|------------|-------------|---------|--------------|-------------|---------|
| | OR | IC 95% | Valor p | OR | IC 95% | Valor p |
| Edad, por año | 1.048 | 1.002-1.096 | 0.04 | 1.411 | 0.329-6.050 | 0.64 |
| Hombre, vs mujer | 2.143 | 0.622-7.387 | 0.23 | 1.049 | 0.991-1.110 | 0.10 |
| PaO ₂ /FiO ₂ , por -0.011 | 0.989 | 0.977-1.001 | 0.06 | 0.992 | 0.976-1.007 | 0.30 |

Abreviaturas. OR, odds ratio; IC 95%, intervalo de confianza al 95%; PaO₂/FiO₂, relación presión arterial de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno.

Tabla 13. Análisis de regresión logística uni y multivariado para mortalidad.

| Mortalidad | AUC (IC 95%) | Valor p |
|---|------------------|------------------|
| VARIABLES CLÍNICAS | | |
| Edad, por año | 0.63 (0.49-0.77) | 0.09 |
| Hombre, vs mujer | 0.58 (0.43-0.72) | 0.32 |
| PaO ₂ /FiO ₂ , por -0.011 | 0.61 (0.47-0.75) | 0.14 |
| MODELOS | | |
| Edad + uKIM-1 | Día 0 | 0.53 (0.37-0.70) |
| Edad + uHSP-72 | | 0.58 (0.43-0.75) |
| Edad + uNGAL | | 0.62 (0.46-0.78) |
| Edad + uSerpina A3* | | 0.64 (0.49-0.80) |
| Edad + uSerpina A3** | | 0.59 (0.43-0.75) |
| Edad + IL-6 | | 0.60 (0.45-0.74) |

| | | | |
|--|--------|------------------|------|
| Edad + IL-10 | | 0.73 (0.60-0.86) | 0.01 |
| Edad + TNF-alfa | | 0.58 (0.43-0.73) | 0.29 |
| Edad + uSerpina A3* | Día 7 | 0.49 (0.31-0.67) | 0.88 |
| Edad + uSerpina A3* | Día 14 | 0.56 (0.35-0.77) | 0.56 |
| Hombre + uKIM-1 | Día 0 | 0.68 (0.53-0.84) | 0.03 |
| Hombre + uHSP-72 | | 0.53 (0.37-0.69) | 0.73 |
| Hombre + uNGAL | | 0.63 (0.47-0.79) | 0.12 |
| Hombre + uSerpina A3* | | 0.64 (0.49-0.80) | 0.09 |
| Hombre + uSerpina A3** | | 0.54 (0.38-0.71) | 0.62 |
| Hombre + IL-6 | | 0.58 (0.43-0.72) | 0.30 |
| Hombre + IL-10 | | 0.64 (0.50-0.78) | 0.06 |
| Hombre + TNF-alfa | | 0.52 (0.37-0.67) | 0.84 |
| Hombre + uSerpina A3* | Día 7 | 0.46 (0.28-0.64) | 0.67 |
| Hombre + uSerpina A3* | Día 14 | 0.53 (0.32-0.74) | 0.78 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uKIM-1 | Día 0 | 0.59 (0.43-0.75) | 0.27 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uHSP-72 | | 0.51 (0.35-0.68) | 0.87 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uNGAL | | 0.63 (0.47-0.79) | 0.13 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uSerpina A3* | | 0.51 (0.34-0.68) | 0.91 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uSerpina A3** | | 0.55 (0.38-0.71) | 0.58 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + IL-6 | | 0.46 (0.31-0.60) | 0.55 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + IL-10 | | 0.52 (0.37-0.67) | 0.80 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + TNF-alfa | | 0.61 (0.46-0.75) | 0.16 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uSerpina A3* | Día 7 | 0.59 (0.41-0.77) | 0.35 |
| PaO ₂ /FiO ₂ + uSerpina A3* | Día 14 | 0.52 (0.28-0.75) | 0.89 |

*ELISA, **Western blot

Tabla 14. Área bajo la curva de diferentes modelos (incluyendo variables clínicas y biomarcadores) para predecir mortalidad.

Cinética de uSerpina A3 y desenlace a 90 días

En la cinética de uSerpina A3 dividida de acuerdo con el desenlace a 90 días (muerto, RRP y RRC), una vez corroborada esfericidad, no se documentó diferencia significativa ($p=0.27$), **Figura 5a**. Sin embargo, cuando en el desenlace se comparó vivo vs. muerto se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p<0.01$), **Figura 5b**.

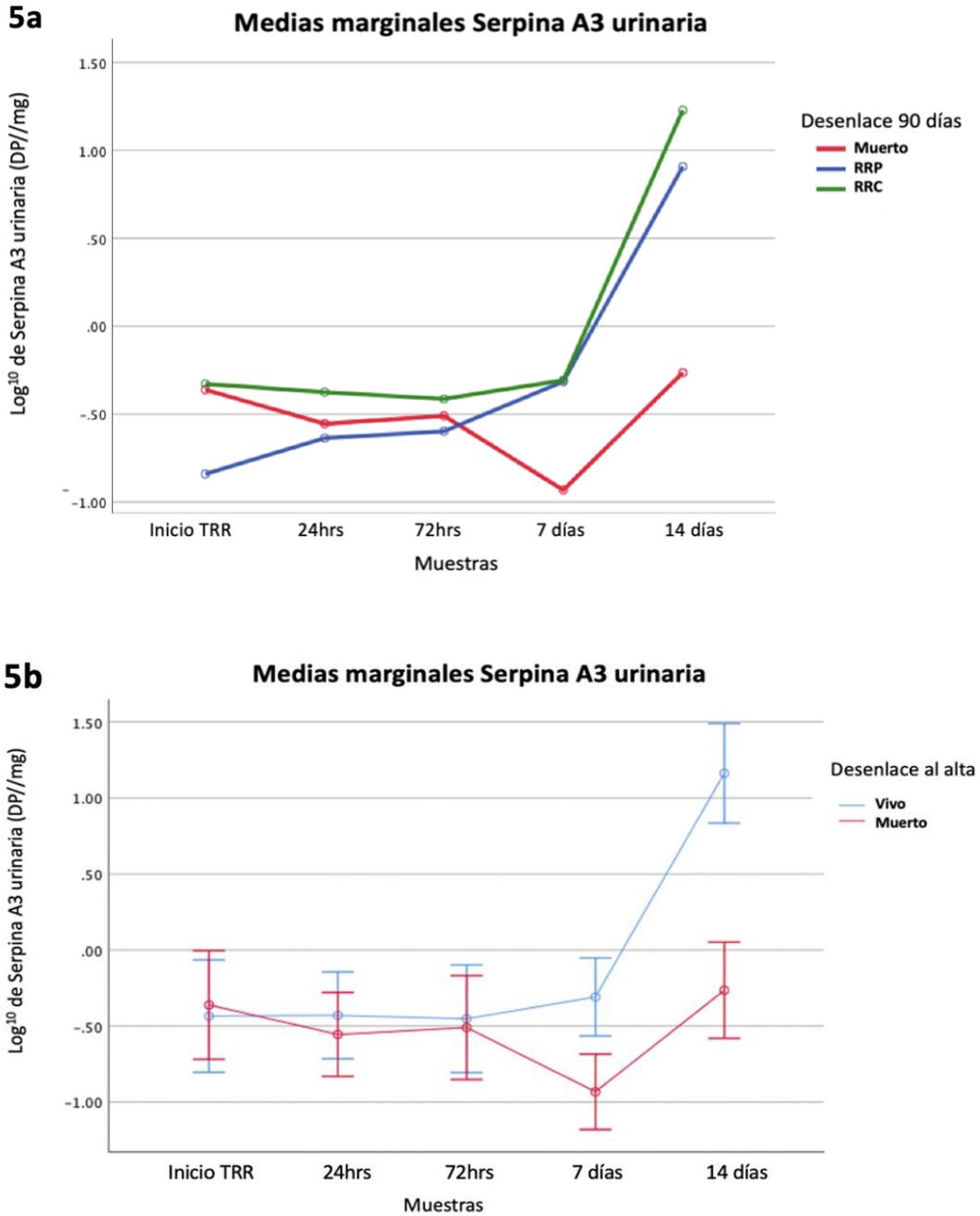


Figura 5. Cinética de uSerpina A3 de acuerdo con su desenlace.

Por otro lado, comparamos el comportamiento de uSerpina A3 contra los controles, lo anterior con la intención de descartar que el presentar únicamente COVID-19 crítico, sin afección renal, pudiera alterar los valores del biomarcador. Como podemos observar en la **Figura 6**, los controles presentaron medias marginales más bajas del marcador ($p < 0.01$).

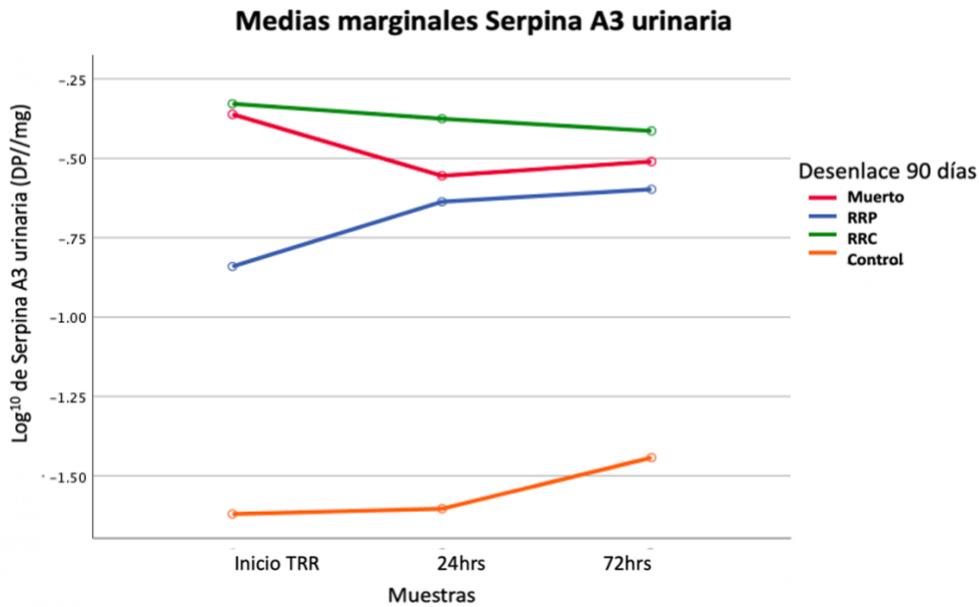


Figura 6. Cinética de uSerpina A3 comparado con los controles.

Posteriormente, analizamos la cinética de la uSerpina A3 incluyendo la muestra de los 90 días. En la **Figura 7** se puede observar que posterior a un ascenso importante en las medias marginales entre la toma 4 y 5 (1 semana y 2 semanas, respectivamente) pero a 90 días disminuyeron de forma comparable a los valores de los controles reportados en la Figura 6.

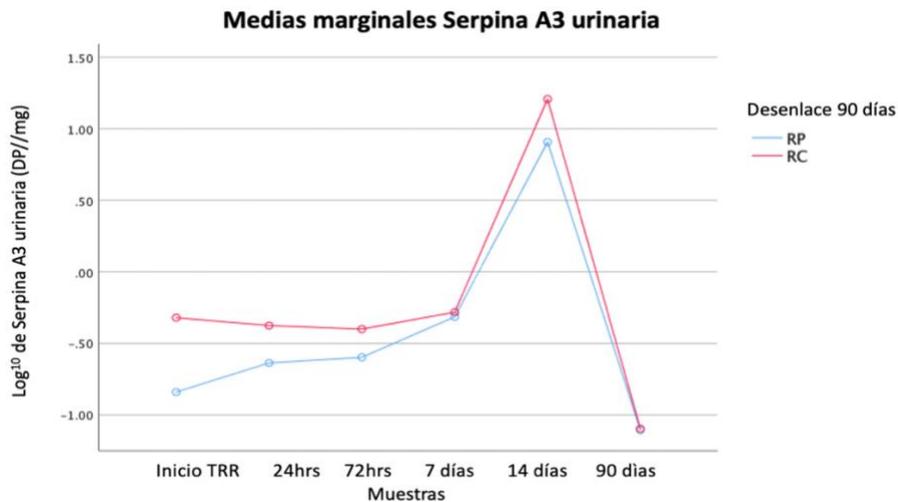


Figura 7. Cinética de uSerpina A3 de acuerdo con el desenlace renal incluyendo la muestra del 3er mes posterior a evento de LRA.

Discusión:

En el presente estudio se encontró que, de los biomarcadores estudiados, la uSerpina A3 y uKIM 1 fueron los que presentaron mejor rendimiento para predecir recuperación completa de la función renal. Nuestra evaluación mostró que uKIM-1 es un biomarcador temprano (tiempo cero), mientras que uSerpina A3 es un biomarcador tardío (7 y 14 días) para predecir, no solo recuperación renal, sino también mortalidad. Este es el primer estudio donde se informa una asociación de estos biomarcadores urinarios para predecir recuperación renal en esta población.

La Serpina A3 se ha asociado con la señalización de diversas vías relacionadas con equilibrio anti y profibrótico^{1,48} (factor de crecimiento del endotelio vascular, el factor de crecimiento del tejido conectivo y la vía WNT/b-catenina en diferentes modelos animales). Teniendo en cuenta estudios previos, especulamos que la Serpina A3 es expresada y secretada por las células tubulares epiteliales en respuesta a un ambiente inflamatorio en el contexto de daño tubular¹. En el presente estudio se documentó la elevación de la uSerpina A3 en el seguimiento de todos los pacientes, por lo que generamos la teoría de que esa elevación en la excreción de uSerpina A3 refleja los mecanismos de reparación/inflamación instaurados, sin embargo, a los 90 días se observó como, la excreción de uSerpina A3 es comparable con los controles sin daño tubular (Figura 6 y 7), lo cual puede indicar que la reparación/daño tubular ha cesado. Lo anterior va de la mano con el tiempo que se ha considerado para recuperar función renal posterior a un evento de LRA.

La cinética de uSerpina A3 se ha estudiado en una población con LEG, Martínez-Rojas et al⁴⁷., estudiaron su comportamiento en una cohorte de 60 pacientes con nefritis lúpica (NL) clase III y clase IV, ellos encontraron niveles mayores de uSerpina A3 en pacientes con NL clase IV atribuido a mayor grado de actividad-inflamación en estos pacientes. Por otro lado, analizaron el comportamiento de este biomarcador según la respuesta al tratamiento en el seguimiento, ellos documentaron que aquellos sin respuesta a tratamiento y con respuesta parcial tenían niveles mayores de uSerpina A3 en orina comparado contra los que tuvieron respuesta completa al tratamiento. Lo anterior probablemente en respuesta a un microambiente inflamatorio no resuelto, lo que pudiera permitir diferenciar entre NL activa y cicatrización renal crónica y que va acorde con la hipótesis que generamos con este trabajo, que la elevación de uSerpina A3 en los pacientes con COVID-19 crítico y que presentaron LRA es secundaria al estado inflamatorio a nivel tubular.

Otro de nuestros objetivos fue comparar la uSerpina A3 con otros biomarcadores de daño tubular ampliamente reportados en la literatura como son uHSP-72, uKIM-1 y uNGAL. Particularmente en pacientes con COVID-19, KIM-1 ha sido reportado para predecir AKI en cualquier grado⁵⁴, AKI grave⁵⁵, así como, el compuesto de AKI, requerimiento de TRR y muerte⁵⁶, en los diferentes estudios se han documentado AUC para predecir estos desenlaces entre 0.5 y 0.8, sin embargo ninguno de ellos evaluó recuperación de la función renal. uNGAL por su parte también se ha estudiado en esta población para predecir los mismos desenlaces comentados con uKIM-1, con resultados similares⁵⁴⁻⁵⁹. Importante destacar que en lo reportado al momento en la literatura los niveles mayores de uKIM-1 y uNGAL fueron relacionados a desenlaces fatales^{54,60,61}, sin embargo, los pacientes incluidos en esos estudios si bien algunos se encontraban hospitalizados en UTI únicamente alrededor del 50% estaban bajo VMI y entre el 12-15% presentaban LRA^{54,60}. Nuestros pacientes representan el mayor espectro de gravedad, por lo que, muy probablemente la condición respiratoria fue la que determinó el desenlace.

Diversas variables clínicas y demográficas son consideradas factores asociados a menor recuperación de función renal y mortalidad, tales como: mayor edad, múltiples comorbilidades (hipertensión, diabetes, enfermedad cardiaca, enfermedad renal crónica), tipo y gravedad de la enfermedad aguda asociada al evento de LRA, grado y duración de la LRA, entre otras^{62,63}. La variable clínica más estudiada para predecir discontinuación de la TRR y recuperación de función renal es el volumen urinario con buen poder predictivo (AUC 0.81)⁶⁴. Por lo anterior, nosotros realizamos constructos para predecir RRC y mortalidad, para lo cual se agregó a los biomarcadores variables clínicas biológicamente plausibles y aquellas variables que resultaron significativas del análisis multivariado. Como podemos observar en la Tabla 11 y 12, en los modelos no hay mayor rendimiento comparado contra los biomarcadores solos. A diferencia de lo reportado, el volumen urinario en nuestros pacientes no fue significativo para predecir mayor recuperación renal.

Particularmente en COVID-19, desde el inicio de la pandemia se consideró que el estado inflamatorio de estos pacientes es un pilar importante en la patogenia, por lo que se utilizaron diversos perfiles de citocinas para predecir desenlaces adversos e incluso como dianas de tratamiento⁶⁵, en nuestro estudio se midió IL-6, IL-10 y TNF-alfa, ninguno de estos marcadores presentó buen rendimiento para predecir los desenlaces estudiados.

La recuperación de la función renal reportada en la literatura en pacientes con LRA y COVID-19 va del 30-80%, según el tipo de pacientes incluidos y las definiciones de recuperación utilizadas⁴⁰⁻⁴². En nuestro estudio todos los pacientes que sobrevivieron tuvieron independencia a diálisis a 90 días. Sin embargo, nosotros excluimos aquellos con TFGe<30 ml/min en los que el daño renal basal claramente está asociado a menor recuperación posterior a evento de LRA grave con requerimiento de TRR, por lo que, consideramos esta es un razón del porque en este estudio observamos tasas de recuperación más altas.

Posterior a todos los análisis realizados, la mejor asociación de uSerpina A3 es con mortalidad, podemos observar que los pacientes que sobrevivieron de manera inicial presentaron niveles similares del biomarcador pero en el seguimiento los niveles eran mayores, lo anterior probablemente asociado a una respuesta inflamatoria y reparación celular mayor. Al momento no hay reportado hallazgos similares, sin embargo, de manera relevante, mediante proteómica se asoció a la Serpina A3 y gravedad de la enfermedad. En la india, se estudió una cohorte de 71 pacientes (20 controles, 19 con COVID-19 no crítico y 33 con COVID-19 crítico), ellos encontraron mayores niveles de Serpina A3 sérica en aquellos pacientes con COVID-19 crítico como un subrogado de gravedad de la enfermedad⁶⁶. En el estudio COVIDomics también se documentó una elevación de Serpina A3 sérica en pacientes con mayor gravedad y riesgo de progresión de la enfermedad⁶⁷, sin embargo ninguno lo asoció a mortalidad. Si bien nosotros no estudiamos la Serpina A3 en sangre ni tampoco incluimos un espectro diferente de pacientes con COVID-19, estos hallazgos van de la mano con el estado inflamatorio sistémico de estos pacientes, nosotros detectamos niveles mayores en orina entre los sobrevivientes asociado a daño tubular, desconocemos el comportamiento de este biomarcador en sangre aunque pudieramos especular que dada la gravedad de la población incluida todos tenían niveles altos de este marcador. Además, el comportamiento de Serpina A3 en sangre puede no indicar lo que está ocurriendo en el tejido renal secundario a LRA.

Hay algunas limitaciones relevantes de nuestro estudio. En primer lugar, nuestra evaluación de Serpina A3 se realizó de forma semicuantitativa por Western blot y por ELISA solamente en el tiempo cero (inicio de TRR), 1 semana y 2 semanas, sin embargo estos kits de ELISA presentaron gran variabilidad incluso en la misma muestra, lo cual limita la interpretación de este resultado, pero para compensar esta limitación contamos con los resultados de Western

blot que han sido utilizados y reportados en nuestro laboratorio^{1,47}. En segundo lugar, tenemos una muestra reducida de pacientes dados los criterios de inclusión y exclusión establecidos. Sin embargo, nuestra mayor fortaleza es que cada paciente cuenta con una cinética extendida de los biomarcadores. Los datos encontrados en este estudio requieren validación a mayor escala y en poblaciones con diferentes etiologías de la LRA dado el impacto de la recuperación renal a largo plazo.

Conclusiones:

La uSerpina A3 es un biomarcador tardío (7 y 14 días después del inicio de TRR) útil para predecir recuperación de la función renal a 90 días y mortalidad; mientras que uKIM-1 resultó ser un biomarcador temprano para predecir los mismos desenlaces. El SOFA >8 y el descenso PaO₂/FiO₂ fueron los principales factores de riesgo asociados a recuperación renal y mortalidad respectivamente. El agregar estas variables clínicas y otras previamente descritas a los biomarcadores estudiados no mejoró el rendimiento para predecir los desenlaces.

Anexo: Hoja de recolección utilizada durante el estudio:

Utilidad de los biomarcadores urinarios para predecir recuperación de la función renal en pacientes con LRA y requerimiento de TSR

Paciente en el protocolo: _____
 Registro _____ Edad _____ Sexo _____
 Causa de ingreso _____ Requirió cirugía urgente _____
 Ingreso urg _____ Ingreso UTI _____ Ingreso TRR _____ Días en UTI _____
 Alta _____ Defunción _____
 AKI al inicio TRR _____ Comunidad/hospital _____ Causas _____
 Peso _____ Talla _____ IMC _____ Comorbilidades _____
 Charlson _____
 ECG _____ SAPS II _____ APACHE _____ SOFA _____
 VMI _____ Vasoactivos _____

| | | | | |
|------------|-------------|------------|---------|-----------|
| Hb | Hto | Leu | PLQ | Alb |
| BT/BD | Na | K | Cl | CO2 |
| DHL | pH | Lactato | HCO3 | Dímero D |
| Pa/Fi | Glu | BUN | Urea | CrS basal |
| ALT/AST/FA | Fibrinógeno | TP/TTP/INR | Tpi/BNP | Ferritina |
| CrS TRR | CrS alta | CrS 30 d | CrS 60d | CrS 90d |

EGO:

Vol urinario inicio TRR _____ Balance acumulado _____

>2 AKI _____ Modalidad TRR _____

Fecha última consulta _____

| | Desenlace al alta | Desenlace 30 días | Desenlace 60 días | Desenlace 90 días |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Completa | | | | |
| Parcial | | | | |
| Dependiente diálisis | | | | |

Referencias bibliográficas:

1. Sánchez A, Mejía J, Pérez R, Carrillo D, Marquina B, et al. SerpinA3 in the Early Recognition of Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease (CKD) transition in the rat and its Potentiality un the Recognition of Patients with CKD. *Sci Rep* 2019; 9(1):10350.
2. Lima I. et al. Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Sci Rep* 2017; 7:12270.
3. Levin A, Stevens P. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int* 2014; 85: 49–61.
4. Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2017; 7:1–59.
5. Ostermann M, Bellomo R, Burdmann, et al. Controversies in acute kidney injury: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference. *Kidney Int* 2020; 98(2): 294-309.
6. Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med* 2008; 36(4 Suppl):S146-151.
7. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* 2015; 41(8):1411-23.
8. Nie S, Feng Z, Xia L, Bai J, Xiao F, Liu J, et al. Risk factors of prognosis after acute kidney injury in hospitalized patients. *Front. Med* 2017; 11:393-402.
9. Elseviers MM, Lins RL, Van der Niepen P, Hoste E, Malbrain ML, Damas P, et al. Renal replacement therapy is an independent risk factor for mortality in critically ill patients with acute kidney injury. *Crit Care* 2010; 14(6):R221.
10. De corte W, Dhondt A, Vanholder R, De Waele J, Decruyenaere J, Sergoyne V, et al. Long-term outcome in ICU patients with acute kidney injury treated with renal replacement therapy: a prospective cohort study. *Crit Care* 2016; 20(1):256.
11. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int* 2011; 79(12): 1361-1369.

12. Lombardi R, Ferreiro A, et al. EPILAT-IRA Study: A contribution to the understanding of the epidemiology of acute kidney injury in Latin America. *PLOS ONE* 2019; 14(11):e0224655.
13. See E, Jayasinghe K, Glassford N, et al. Long-term risk of adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of cohort studies using consensus definitions of exposure. *Kidney international* 2018; 95(1): 160-72.
14. Nisula S, Kaukonen KM, Vaara ST, Korhonen AM, Poukkanen M, Karlsson S, et al. Incidence, risk factors and 90 day mortality of patients with acute kidney injury in Finnish intensive care units: the FINNAKI study. *Intensive Care Med* 2013; 39(3):420-8.
15. Sánchez A, Cruz J, Mariño F, et al. Carga de la enfermedad: insuficiencia renal, diálisis-hemodiálisis y trasplante renal en México. Costo de la enfermedad. *Rev Mex Traspl* 2020; 9(1):15-25.
16. Valdez R, Navarro F, Olvera M, et al. Mortality in Patients With Chronic Renal Disease Without Health Insurance in Mexico: Opportunities for a National Renal Health Policy. *Kidney Int Rep* 2018; 3:1171-82.
17. Chávez J, García G, Lombardi R. Epidemiología y desenlaces de la lesión renal aguda en Latinoamérica. *Gac Med Mex* 2018; Supp 1:6-14.
18. Kellum JA, Angus DC. Patients are dying of acute renal failure. *Crit Care Med*. 2002; 30(9):2156-7.
19. Cerdá J, Liu K, Cruz D, et al. Promoting Kidney Function Recovery in Patients with AKI Requiring RRT. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10(10): 1859-67.
20. Ronco C, Bellomo R, Kellum J. Acute Kidney injury. *Lancet* 2019; 394: 1949-64.
21. De Oliveira B, Xu K, Shen T. Et al. Molecular nephrology: types of acute tubular injury. *Nat Rev Nephrol*. 2019; 15(10):599-612.
22. Ferenbach D, Bonventre J. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat. Rev. Nephrol* 2015; 11:264–276.
23. Yu S, Bonventre J. Acute kidney injury and maladaptive tubular repair leading to renal fibrosis. *Acute kidney injury and maladaptive tubular repair leading to renal fibrosis. Curr Opin Nephrol Hypertens* 2020; 29:310 – 318.

24. Martínez-Rueda AJ, Álvarez RD, Méndez-Pérez RA, et al. Community- and Hospital-Acquired Acute Kidney Injury in COVID-19: Different Phenotypes and Dismal Prognosis. *Blood Purif* 2021; 1-11.
25. Chen N, Zhou M, Dong X et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* 2020; 395: 507–513
26. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma P, Shah HH, Barnett RL, Hazzan AD, Fishbane S, Jhaveri KD; Northwell COVID-19 Research Consortium; Northwell Nephrology COVID-19 Research Consortium. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int.* 2020; 98(1):209-218.
27. Argenziano MG, Bruce SL, Slater CL, et al. Characterization and clinical course of 1000 patients with coronavirus disease 2019 in New York: retrospective case series. *BMJ* 2020; 369:m1996.
28. Rewa O, Bagshaw S. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes, and economics. *Nat. Rev. Nephrol* 2014; 10:193-207.
29. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al., Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382(18):1708-1720.
30. Ronco C, Reis T., Kidney involvement in COVID-19 and rationale for extracorporeal therapies. *Nat Rev Nephrol* 2020; 16(6):308-310.
31. Del Toro-Cisneros N, Caballero-Islas AE, Ramírez-Sandoval JC, Mejía-Vilet JM, Arvizu-Hernández M, Casas-Aparicio G, et al. What did we learn about coronavirus disease-19-associated acute kidney injury during the pandemic? *Rev Invest Clin* 2022; 74(6):302-313.
32. Yalameha B, Roshan B, Lakkakula VKS, Bhaskar ML. Perspectives on the relationship of renal disease and coronavirus disease 2019. *J Nephropharmacol* 2020; 9(2):e22.
33. Kellum JA, van Till JWO, Mulligan G. Targeting acute kidney injury in COVID-19. *Nephrol Dial Transplant* 2020; 35(10):1652-1662.
34. Gabarre P, Dumas G, Dupont T, et al. Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med* 2020; 46(7):1339-1348.
35. Soleimani M. Acute kidney injury in SARS-CoV-2 infection: direct effect of virus on kidney proximal tubule cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21(9):3275.

36. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, Yi F, Yang HC, Fogo AB, Nie X, Zhang C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int* 2020; 98(1):219-227.
37. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, McMurray JJV, Pfeffer MA, Solomon SD. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 382(17):1653-1659.
38. Ng JH, Bijol V, Sparks MA, et al. Pathophysiology and Pathology of Acute Kidney Injury in Patients With COVID-19. *Adv Chronic Kidney Dis* 2020; 27(5):365-376.
39. Joannidis, M. et al. Lung-kidney interactions in critically ill patients: consensus report of the acute disease quality initiative (ADQI) 21 workgroup. *Intensive Care Med* 2020; 46: 654–672.
40. Gupta S, Coca SG, Chan L, Melamed ML, Brenner SK, Hayek SS, et al. AKI treated with renal replacement therapy in critically ill patients with COVID-19. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32:161-76.
41. Ng JH, Hirsch JS, Hazzan A, Wanchoo R, Shah HH, Malieckal DA, et al. Outcomes among patients hospitalized with COVID-19 and acute kidney injury. *Am J Kidney Dis* 2021; 77:204-15.e1.
42. Nugent J, Aklilu A, Yamamoto Y, Simonov M, Li F, Biswas A, et al. Assessment of acute kidney injury and longitudinal kidney function after hospital discharge among patients with and with- out COVID-19. *JAMA Netw Open* 2021; 4:e211095.
43. Srisawat N, Wen X, Lee M, Kong L, Elder M, et al. Urinary Biomarkers and Renal Recovery in Critically ill patients with renal Support. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6(8):1815-23.
44. Charlton J, Portilla D, Okusa M. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 0: 1–11.
45. Kashani K, Al A, Ardiles T. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical Care* 2013; 17:R25.
46. Huasain F, Wilhelm J, Kassoumeh S, et al. Acute kidney injury and urinary biomarkers in hospitalized patients with coronavirus disease 2019. *Nephrol Dial Transplant* 2020; 1-4.
47. Martínez-Rojas MA, Sánchez-Navarro A, Mejía-Vilet JM, Pérez-Villalva R, Uribe N, Bobadilla NA. Urinary serpin-A3 is an early predictor of clinical response to therapy in

patients with proliferative lupus nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2022; 323(4):F425-F434.

48. Sánchez A, González I, Caldiño R, Bobadilla N. An integrative view of serpins in health and disease: the contribution of SerpinA3. *Am J Physiol Cell Physiol* 2021; 320: C106–C118.
49. Gent D, Sharp P, et al. Serpins: structure, function and molecular evolution. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003; 35: 1536-47.
50. Summary of Recommendation Statements. *Kidney Int Suppl* 2012; 2:8–12.
51. Siew ED, Matheny ME. Choice of Reference Serum Creatinine in Defining Acute Kidney Injury. *Nephron* 2015; 131:107–12
52. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40:373–83.
53. Pannu N, James M, Hemmelgarn B, Klarenbach S; Alberta Kidney Disease Network. Association between AKI, recovery of renal function, and long-term outcomes after hospital discharge. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8(2):194-202.
54. Vogel MJ, Mustroph J, Staudner ST, Leininger SB, Hubauer U, Wallner S, et al. Kidney injury molecule-1: potential biomarker of acute kidney injury and disease severity in patients with COVID-19. *J Nephrol* 2021; 34:1007-18.
55. Xu K, Shang N, Levitman A, Corker A, Kudose S, Yaeh A, et al. Elevated neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with the severity of kidney injury and poor prognosis of patients with COVID-19. *Kidney Int Rep* 2021; 6:2979-92.
56. Menez S, Moledina DG, Thiessen-Philbrook H, Wilson FP, Obeid W, Simonov M, et al. Prognostic significance of urinary biomarkers in patients hospitalized with COVID-19. *Am J Kidney Dis* 2022; 79:257-67.e1.
57. Casas-Aparicio G, La Barrera CA, Escamilla-Illescas D, León- Rodríguez I, Del Río-Estrada PM, Calderón-Dávila N, et al. Role of urinary kidney stress biomarkers for early recognition of subclinical acute kidney injury in critically ill COVID-19 patients. *Biomolecules* 2022; 12:275.
58. Shakked NP, De Oliveira MH, Cheruiyot I, Benoit JL, Plebani M, Lippi G, et al. Early prediction of COVID-19-associated acute kidney injury: are serum NGAL and serum cystatin C levels better than serum creatinine? *Clin Biochem* 2022; 102:1-8.

59. He L, Zhang Q, Li Z, Shen L, Zhang J, Wang P, et al. Incorporation of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and computed tomography quantification to predict acute kidney injury and in-hospital death in COVID-19 patients. *Kidney Dis (Basel)* 2021; 7:120-30.
60. Temiz MZ, Hacibey I, Yazar RO, Sevdi MS, Kucuk SH, Alkurt G, et al. Altered kidney function induced by SARS-CoV-2 infection and acute kidney damage markers predict survival outcomes of COVID-19 patients: a prospective pilot study. *Ren Fail* 2022; 44(1):233-240.
61. Su L, Zhang J, Peng Z. The role of kidney injury biomarkers in COVID-19. *Ren Fail* 2022; 44(1):1280-1288.
62. Forni LG, Darmon M, Ostermann M, Oudemans-van Straaten HM, Pettilä V, Prowle JR, et al. Renal recovery after acute kidney injury. *Intensive Care Med* 2017; 43(6):855-866.
63. Gaião SM, Paiva JAOC. Biomarkers of renal recovery after acute kidney injury. *Rev Bras Ter Intensiva* 2017; 29(3):373-381.
64. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, et al. Discontinuation of continuous renal replacement therapy: a post hoc analysis of a prospective multicenter observational study. *Crit Care Med* 2009; 37(9):2576-82.
65. Tjendra Y, Al Mana AF, Espejo AP, Akgun Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, et al. Predicting Disease Severity and Outcome in COVID-19 Patients: A Review of Multiple Biomarkers. *Arch Pathol Lab Med* 2020; 144(12):1465-1474.
66. Suvarna K, Biswas D, Pai MGJ, Acharjee A, Bankar R, Palanivel V, et al. Proteomics and Machine Learning Approaches Reveal a Set of Prognostic Markers for COVID-19 Severity With Drug Repurposing Potential. *Front Physiol* 2021; 12:652799.
67. Costanzo M, Caterino M, Fedele R, Cevenini A, Pontillo M, Barra L, Ruoppolo M. COVIDomics: The Proteomic and Metabolomic Signatures of COVID-19. *Int J Mol Sci* 2022; 23(5):2414.