



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS TH1/TH2
EN MUESTRAS DE COVID-19 DEL LABORATORIO DE
PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL CM-ABC”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMÍCA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

YATZIRY HERNÁNDEZ CACIQUE

DIRECTORA: DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN

ASESOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ

ASESOR: Q.F.B. GILDARDO HERRERA QUIROZ



THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER I.A.P

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Dedicatorias.....	4
Abreviaturas.....	5
Resumen	8
Introducción.....	9
Marco teórico.....	11
Planteamiento del problema y pregunta de investigación	26
Hipótesis	26
Objetivos.....	26
Material y métodos	27
A) Diseño del estudio.....	27
B) Universo.....	27
C) Variables	27
D) Técnicas o instrumentos.....	28
E) Procedimiento.....	28
F) Análisis estadísticos.....	32
Resultados.....	32
Discusión	39
Conclusiones.....	45
Referencias	47
Anexos	52

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por darme los talentos necesarios en esta vida, por permitirme llegar hasta aquí y porque siempre me ha quitado algo bueno y lo ha sustituido por algo mejor.

A la Dra. Diana Aguilar León, mi directora de tesis, por su apoyo y enseñanzas durante todo el proyecto, por permitirme desarrollar nuevas habilidades, por compartir su conocimiento conmigo, pero sobre todo por confiar y creer en mí, ha sido pieza clave en mi crecimiento profesional, estaré siempre agradecida con usted.

A Angie, por su ayuda y enseñanzas, por recordarme todos los días a que debo confiar en mí misma a pesar de mis inseguridades, gracias porque siempre has creído en mí.

A mis asesores de tesis, por su apoyo y su conocimiento, por cada una de sus observaciones y por aceptar ser parte de este trabajo.

A mis sinodales, por tomar de su tiempo para revisar este trabajo.

A la UNAM, especialmente a la FES Zaragoza, por permitirme ser parte de su matrícula para poder aprender en cada una de sus aulas, porque me dieron las herramientas necesarias para progresar profesionalmente, por darme los mejores años de mi vida y recordarme todos los días que existimos para ayudar a los demás.

DEDICATORIAS.

A mis padres, Julio y Lorena, por desarrollar desde muy pequeña en mí el gusto por la química, por darme todo lo necesario para que pudiera superarme, trabajando muy duro para que nada me faltara, gracias por enseñarme que para lograr lo que me proponga debo trabajar y esforzarme arduamente, hoy pueden tener la seguridad que todo su esfuerzo ha valido la pena, los amo.

A mi hermano, Leonardo, porque siempre ha sido parte fundamental de mi vida, gracias por despertarme cuando me quedaba dormida haciendo tareas y porque me has enseñado a afrontar la vida con valentía. A Nadia porque has llegado a ser una hermana para mí.

A Victorita, mi sobrina, para que cuando leas esto en algunos años, siempre recuerdes que la única que puede ponerse límites en esta vida eres tú y para que nunca olvides lo lejos que puedes llegar, te amo.

A mis abuelitos, Sara y Aarón, por apoyarme a la distancia y por creer en mí y también a mis abuelitos Patricio y Carmen, que, aunque no están ya físicamente, sé que están orgullosos.

A mis tíos, tías y primos porque también son parte de mis logros.

A mi mejor amiga Gabriela, porque en casi una década de amistad has estado para mí, apoyándome y aconsejándome, gracias por los momentos que hemos pasado juntas, han sido un bálsamo sanador en los momentos difíciles.

A Óscar, César, Keny, Fany y Vicky, gracias por estar siempre para mí y escucharme cuando lo necesito, por formar parte de mi vida y por los momentos que hemos pasado juntos.

A todas aquellas personas que perdieron la batalla contra el SARS-CoV-2 durante la pandemia.

ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

cADN: Ácido desoxirribonucleico complementario

APC: Célula presentadora de antígeno

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

sgARNs: RNAm subgenómicos

CM ABC: Centro Médico ABC

CoV: Coronavirus

COVID-19: Coronavirus Disease 19

CP: Control positivo

CN: Control negativo

CSF: factores estimulantes de crecimiento

dNTPs: Desoxinucleótido trifosfato

E: Proteína de la Envoltura

ECA 2: Enzima Convertidora de Angiotensina tipo 2

ERGIC: compartimento interno del aparato de Golgi

HCoV: Coronavirus Humanos

HAS2: Hialuronano sintasa 2

HE: Hemaglutinina esterasa

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular tipo 1

IFN γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

Kb: Kilobases

kDa: Kilodaltons

M: Proteína de Membrana

MERS: Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MPM: Marcador de peso molecular

Mpro: Proteasa principal

N: Proteína de nucleocápside

NK: células Natural Killer

nm: nanómetros

nsps: Proteína viral no estructural

ORF: Open Reading Frames

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PM: Peso molecular

RBD: Dominio de Unión al Receptor

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN

RTC: complejo replicasa transcriptasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcriptasa inversa

S: Proteína Spike

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo

SDRA: Síndrome de dificultad respiratoria aguda

sHLH: linfocitosis hemofagocítica

Tc: Linfocitos T citotóxicos

Th: Linfocitos T cooperadores

Th1: Linfocitos T cooperadores tipo 1

Th2: Linfocitos T cooperadores tipo 2

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TMPRSS2: Enzima Proteasa de Serina Transmembrana tipo 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Treg: Linfocitos T reguladores

3CLpro: Quimotripsina codificada viralmente

2'-O-Mtasa: 2-O-metiltransferasa

μ L: microlitro

RESUMEN

En diciembre del 2019, en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, se reportaron 27 casos de neumonía de etiología desconocida, con siete pacientes graves, todos los casos estaban asociados a trabajadores o visitantes de un mercado de mariscos, Huanan Seafood Wholesale Market. Este fue el inicio de la aparición del nuevo Coronavirus SARS-CoV-2, el cual ha causado un alto impacto a la salud pública.

Los síntomas pueden ser variados de persona a persona, pudiendo presentar un cuadro leve, moderado o severo, dependiendo del estado de salud del paciente, de su inmunidad innata y de la dosis del inóculo viral. La progresión de la enfermedad puede representarse en tres fases: multiplicación viral aguda, hiperactividad de la respuesta inmune y recuperación pulmonar o destrucción pulmonar que conduce a la muerte. (1)

En un estudio, se analizó el suero de pacientes que desarrollaron SARS grave, se encontró la presencia de altos niveles de citocinas pro-inflamatorias (IFN γ , IL-1, IL-6, IL-12 y TGF- β) y quimiocinas (CCL2, CXCL10, CXCL9 e IL-8), en comparación con los pacientes que no desarrollaron una enfermedad grave. (2)

Por tanto, al evaluar el perfil de citocinas Th1/Th2 se podrá comprender mejor el desbalance provocado por el nuevo HCoV (Coronavirus humano) y conocer el porqué es un marcador importante de desenlace fatal en la enfermedad.

Para este proyecto, se analizó a través de PCR en punto final, el perfil de citocinas Th1 y Th2 de un total de 80 muestras de hisopados nasofaríngeos. Los resultados obtenidos nos muestran como durante el curso de la enfermedad hay una exacerbación de la producción de citocinas pro-inflamatorias causada por la constante activación de macrófagos, producto de la presentación antigénica, se observó una predominancia de una respuesta Th1 durante la enfermedad y al paso del estado patológico, además de como los sinergismos entre citocinas pueden conducir a un cuadro más grave para el paciente, por tanto al poder controlar la producción descontrolada de estas moléculas, se podría tener un mejor pronóstico de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Día a día los seres humanos nos enfrentamos a un gran número de agentes infecciosos que comprometen nuestro estado de salud, como: bacterias, parásitos, hongos y virus; afortunadamente, también contamos con el sistema inmunológico, cuya función es protegernos de los patógenos que hay a nuestro alrededor. A pesar de ello, nuestro estilo de vida puede dar origen al desarrollo de nuevos patógenos altamente infecciosos que burlan nuestro sistema inmunológico, causando grandes afectaciones a la salud pública, un ejemplo de esto es la aparición del nuevo coronavirus, SARS-CoV-2 y con ello la aparición de una enfermedad desconocida, COVID-19.

En las últimas décadas, los coronavirus humanos han evolucionado, convirtiéndose en una amenaza de salud pública mundial, ya que surgen de manera inesperada trayendo consigo grandes consecuencias.

La respuesta inmunitaria es esencial para controlar y eliminar las infecciones por HCoV, sin embargo, una respuesta desajustada puede dar origen a inmunopatologías y alteración del intercambio gaseoso pulmonar. (3)

El curso clínico de los SARS se presenta en tres fases distintas. La fase inicial se caracteriza por una fuerte replicación del virus acompañada de fiebre, tos y otros síntomas, una segunda fase clínica asociada a fiebre alta, hipoxemia y progresión a síntomas similares a los de la neumonía, durante la tercera fase, hay una progresión a SDRA (Síndrome de dificultad respiratoria aguda), que puede llevar a la muerte, resultado de una respuesta inflamatoria exuberante del huésped (2). Por tanto, al comprender de mejor manera la interacción entre el nuevo virus y el sistema inmune, ayudaría a encontrar tratamientos más específicos y eficaces, disminuyendo las muertes por COVID-19.

Las citocinas son proteínas o péptidos de bajo peso molecular, las cuales regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmune al inhibir o estimular la activación, proliferación y diferenciación de diversas células y controlar la secreción de anticuerpos y otras citocinas. Epidemias previas por coronavirus humanos, han demostrado que las neumonías graves que estos producen están asociadas a una rápida replicación del virus, una masiva infiltración de células inflamatorias al tejido pulmonar y una elevada producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias.

La detección de citocinas se hace en tres fases, la primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 de una muestra de hisopado nasofaríngeo, seguido de la amplificación de segmentos seleccionados del genoma del microorganismo mediante la PCR y finalmente se realiza la detección de los fragmentos amplificados mediante la hibridación de sondas específicas. (4)

MARCO TEÓRICO

VIRUS

Los virus son un conjunto de genes empaquetados en un recubrimiento que contiene proteínas (cápside), y en algunos casos, cuentan con una envoltura externa de lípidos, proteínas y glucoproteínas, llamada membrana. (5) Utilizan los recursos de su hospedador para poder multiplicarse.

Algunas características son:

- ✓ Contienen un único tipo de ácido nucleico, ya sea ARN o ADN, este último puede ser monocatenario o bicatenario, lineal o circular, el ARN puede ser en sentido positivo o negativo, de doble cadena o de doble polaridad (ambisense). (6)
- ✓ Su tamaño va de 10 a 1000 nm y el rango de su genoma va de 3000 a 1×10^6 pb.
- ✓ Algunos completan su replicación en minutos y otros en días, semanas o meses. (7)
- ✓ Las proteínas de la cápside pueden unirse al genoma para formar una nucleocápside, y representa la forma empacada del genoma viral.
- ✓ No poseen maquinaria metabólica o de producción de energía. (8)

SARS-CoV-2

Los coronavirus son causantes de algunas infecciones respiratorias que pueden desencadenar neumonías graves, estos virus se han clasificado de la siguiente manera:

Dentro del orden de los Nidovirales, se encuentran las familias: Coronaviridae, Arteriviridae, Mesoniviridae y Roniviridae, la familia Coronaviridae a su vez se divide en dos subfamilias: Coronavirinae y Torovirinae (9), la subfamilia Coronavirinae, es categorizada en cuatro géneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus, los dos primeros géneros afectan a los humanos, mientras que los últimos dos, a las aves. (10)

Son siete los coronavirus de importancia médica y pertenecen a los géneros alfa y betacoronavirus, desde el punto de vista epidemiológico se pueden clasificar (Ver cuadro 1) como coronavirus adquiridos en la comunidad (HCoV), lo cuales están asociados a enfermedades leves del tracto respiratorio superior y coronavirus zoonóticos, los cuales afectan al tracto respiratorio inferior y pueden causar una neumonía fatal.

Cuadro 1. Clasificación de los coronavirus de importancia médica.

Adquiridos en la comunidad (HCoV)	Zoonóticos
HCoV 229E	SARS-CoV
HCoV OC43	MERS-CoV
HCoV NL63	SARS-CoV-2
HCoV HKU-1	

HCoV: Coronavirus humanos, SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo, MERS: Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

Los HCoV circulan libremente en todo el mundo, causando enfermedades respiratorias leves, son causantes de aproximadamente el 10-30% de los resfriados comunes (10), caso contrario ocurre con los coronavirus zoonóticos, deben su nombre por ser originalmente virus presentes en animales que no afectan al hombre, pero que en ocasiones nuestro estilo de vida puede dar origen a mutaciones, traslocaciones, inserciones, deleciones etc. de estos, que al sufrir cambios genéticos pueden dar origen a agentes infecciosos nuevos, causantes de enfermedades desconocidas que afectan al hombre. Los betacoronavirus zoonóticos están filogenéticamente relacionados con los coronavirus de murciélagos, los cuales podrían haber sido su fuente para el hombre ya sea directa o indirectamente a través de un hospedero intermediario, estos virus reciben el nombre de SARS ya que pueden causar un Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

El primer reporte de una infección causada por un SARS ocurrió en noviembre del 2002 en la provincia Guangdong, China, causó una epidemia que duró aproximadamente siete meses, se cree que el huésped intermediario fue una civeta. (11) En el 2012, en Arabia Saudita fue reportada una infección por otro SARS, pero se le dio el nombre de MERS-CoV (Síndrome Respiratorio de Oriente Medio) por el lugar en donde se originó, los pacientes afectados por este virus desarrollaron una neumonía grave e insuficiencia renal, se cree que su huésped intermediario fue el dromedario. (12)

En diciembre del 2019, en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, se reportaron 27 casos de neumonía de etiología desconocida, con siete pacientes graves, todos los casos

estaban asociados a trabajadores o visitantes de un mercado de mariscos, Huanan Seafood Wholesale Market, en dicho lugar no solo se comercializaba comida marina, también se dedicaban a la venta y consumo de animales silvestres, el primer caso de neumonía se reportó el 8 de diciembre del 2019. (13)

El uso de métodos de secuenciación profunda, que no requieren información previa sobre el agente que se busca, así como el aislamiento en cultivo de células, seguido de microscopía electrónica y de secuenciación profunda, demostró que se trataba de un agente viral nuevo, perteneciente al grupo de los betacoronavirus, inicialmente fue llamado 2019-nCov, genéticamente relacionado, pero distinto al agente del SARS. (14) El 11 de febrero del 2020, el nombre del virus cambió a SARS-CoV-2.

- **Organización genómica.**

Los coronavirus son virus esféricos con un diámetro de 118-136 nm, su genoma consiste en ARN monocatenario, lineal, no segmentado, de polaridad positiva de 25-32kb, cuenta en el extremo 5' no codificante, con un casquete de 7 metil guanósina, o cap, y en el extremo 3' con una cola poliadenilada (poli A), (9) lo que le permite actuar como ARNm para la traducción de proteínas estructurales y accesorias. Posee una nucleocápside de simetría helicoidal y una envoltura externa, en la nucleocápside, el genoma viral está asociado con la proteína de la nucleocápside (N), y en la envoltura externa se encuentran las proteínas estructurales Spike (S), proteína de membrana (M) y la proteína de envoltura (E), así como proteínas accesorias como la hemaglutinina esterasa (HE), proteína 3 y proteína 7a. (15) (Ver figura 1)

Aproximadamente dos terceras partes del genoma, hacia el extremo 5' codifican para el gen de la replicasa viral, el cual está constituido por dos ORF (ORF 1a y ORF 1b), los cuales, durante la replicación son traducidos en dos poliproteínas: pp1a y pp1ab, posteriormente son procesados proteolíticamente para dar origen a 16 proteínas no estructurales, entre las que se destaca la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), una helicasa y dos proteasas, que están implicadas en la replicación del genoma viral y en la transcripción de ARNm subgenómicos (sgARNs). El último tercio del genoma, hacia el extremo 3', codifica para los genes de las cuatro proteínas estructurales (S, M, E y N) y las proteínas accesorias. (15) (Ver figura 2)

Proteína Spike (S): Pesa aproximadamente 150kDa, está formada por homotrímeros, permitiéndole tener una estructura en forma de espiga, su principal función es facilitar la unión del virus al receptor de la célula huésped. Posee dos dominios: S1 (N-terminal), que se une al receptor y S2 (C-terminal) que forma el tallo de la proteína para anclarse a la membrana del virión. (16)

Proteína de Membrana (M): Es la más abundante y es la que le da forma curva, pesa alrededor de 25-30 kDa, contiene tres dominios transmembranales, tiene un pequeño ectodominio glicosilado N-terminal y un endodominio más largo C-terminal que se extiende dentro de la partícula viral, es responsable del transporte transmembrana de nutrientes. (17)

Proteína de Envoltura (E): Pesa de 8-12 kDa, se encuentra en pequeñas cantidades dentro del virión, es una proteína transmembranal, con un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal y posee actividad de canal iónico.

Proteína de Nucleocápside (N): Es la única presente en la nucleocápside, está compuesta por dos dominios separados, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal, ambos son capaces de unirse al ARN en forma de collar de perlas, la proteína N se encuentra fosforilada e insertada dentro de la bicapa de fosfolípidos en la envoltura viral.

Hemaglutinina Esterasa (HE): Actúa como hemaglutinina, uniéndose a los ácidos siálicos en las glicoproteínas de superficie, tiene actividad de acetil-esterasa, la cual favorece la entrada a las células huésped y su propagación a través de las mucosas. (9)

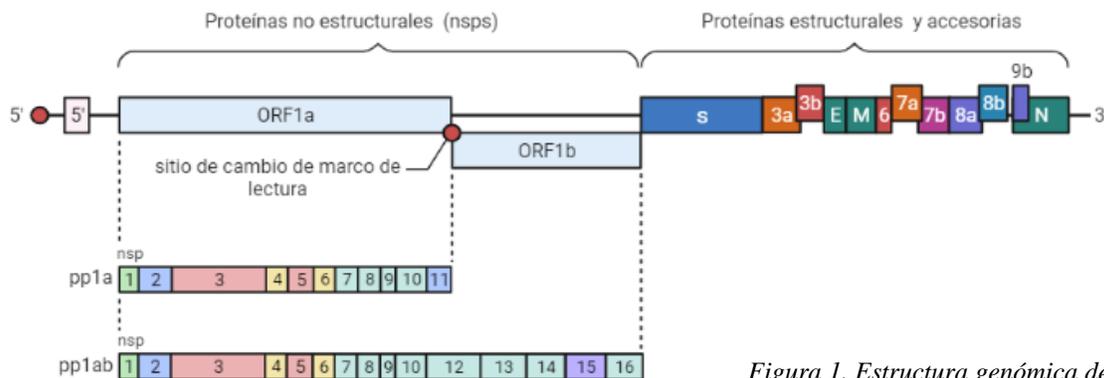


Figura 1. Estructura genómica del SARS-CoV-2

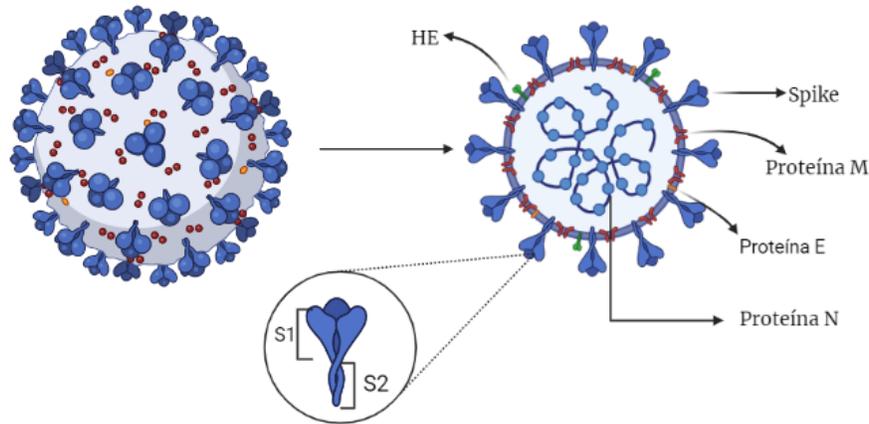


Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2, HE: Hemaglutinina Esterasa.

- **Replicación viral.**

Para que un virus pueda infectar a una célula huésped, es necesario que este se una a un receptor de superficie celular, en el caso del SARS-CoV-2, la unión se da a través de la proteína S, siendo su receptor de superficie celular la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) (17), este receptor se halla expresado en el tracto respiratorio bajo, en el pulmón se expresa principalmente en las células alveolares tipo 2, corazón, riñón, estómago, hígado, testículos, vejiga, esófago, intestino y en la cavidad oral está en las células epiteliales de la lengua, (18) su función principal es reducir la presión arterial, con efecto protector frente a la hipertensión, arteriosclerosis y en otros procesos vasculares y pulmonares, al catalizar la escisión de angiotensina II (un péptido vasoconstrictor) en angiotensina 1-7 (un vasodilatador). (19)

La proteína S posee dos subunidades (S1 y S2), la subunidad S1 es la que interacciona y se une al receptor de ECA2 por medio del dominio de unión al receptor (RBD), mientras que la subunidad S2 determina la fusión de la membrana del virus con la de la célula huésped, para que el virus complete la entrada en la célula hospedera, la proteína S debe de ser escindida proteolíticamente por la enzima proteasa de serina transmembrana tipo 2 (TMPRSS2). La escisión de la proteína S ocurre en dos diferentes posiciones de la subunidad S2, esto contribuye a la separación de la unión RBD de la subunidad S1 con el receptor ECA2 y a la posterior fusión de las membranas, facilitando así, la entrada del virus a la célula huésped por medio de endocitosis. (20)

Una vez completado el ingreso del virus al citoplasma, la nucleocápside se libera, permitiendo la salida del ARN genómico viral, la secuencia de ARN actúa como un ARNm donde se transcribe el gen de la replicasa viral (hacia el extremo 5'), este gen codifica dos ORF, rep1a y rep1b, los cuales expresan dos poliproteína, pp1a y pp1ab, para expresarlas el virus utiliza una secuencia deslizante (5'-UUUAAAC-3') y un pseudonudo de ARN que provoca el desplazamiento de marcos ribosomales desde el marco de lectura rep1a hacia el ORF de rep1b, generalmente el ribosoma desenrolla el pseudonudo y continua la traducción hasta que se encuentra el codón de paro de rep1a, sin embargo, en ocasiones el pseudonudo bloquea el ribosoma para que no continúe con la elongación haciendo que se detenga la secuencia, cambiando el marco de lectura, retrocediendo un nucleótido resultando en la traducción de pp1ab. (21) Las poliproteínas son procesadas proteolíticamente por enzimas proteasas como la quimiotripsina codificada viralmente (3CLpro), proteasa principal (Mpro) y una o dos proteasas similares a la papaína, lo que da lugar a la producción de las 16 nsps designadas nsp1 a nsp 16, (22) pp1a codifica para las nsps de la 1-11 y pp1ab de la 1-16, en el cuadro 2 se enlistan las 16 nsps y las funciones que cumplen.

Las nsps son necesarias para formar el complejo replicasa transcriptasa (RTC), el cual, es ensamblado en vesículas de doble membrana originadas a partir del retículo endoplasmático, este complejo crea un entorno adecuado para la síntesis del ARN viral, por tanto, están implicadas en la replicación del ARN y transcripción de los sgARN, que codificarán para la síntesis de las proteínas estructurales y accesorias.

Cuadro 2. Funciones de las nsps.

Nsps	Función
nsp 1	Promueve la degradación del ARNm celular y bloquea la traducción de la célula huésped, provocando el bloqueo de la respuesta inmune innata.
nsp 2	Desconocida
nsp 3	Proteína transmembranal con multidominios, sus actividades incluyen:

- Dominios Ubl1 y Ac: interactúan con la proteína N
- Actividad ADRP, promueve la expresión de citocinas
- Dominio PLPro/Deubiquitinasas, escinde la poliproteína viral y bloquea la respuesta inmune innata
- Dominios Ubl2, NAB, SUD y Y: funciones desconocidas

nsp 4	Importante para la correcta estructura de la doble membrana
nsp 5	3Mpro, división de polipéptidos, inhibición de la señalización de IFN
nsp 6	Proteína transmembranal que participa en la formación de vesículas de doble membrana
nsp 7	Forma un complejo hexadecamérico con nsp8
nsp 8	Forma un complejo hexadecamérico con nsp7 y puede actuar como primasa
nsp 9	Proteína de unión a ARN
nsp 10	Cofactor con nsp 14 y 16, forma un heterodímero con ambos estimulando la actividad de ExoN y 2-O-MT
nsp 11	Desconocida
nsp 12	RdRp
nsp 13	ARN helicasa, ARN-5'-trifosfatasa (síntesis del cap en 5')
nsp 14	Exoribonucleasa, N7-Mtasa, ExoN, la N7-Mtasa añade el cap al extremo 5' del genoma viral, la actividad ExoN es importante para la corrección del genoma viral
nsp 15	Endoribonucleasa Nendo U
nsp 16	2'-O-Mtasa, protege al ARN viral del reconocimiento de MDA5

Ubl: proteína similar a la ubiquitina, Ac: ácido, ADRP: ADP-ribosa-1-fosfatasa, PLPro: proteasa similar a la papaína, NAB: Unión al ácido nucleico, SUD: dominio único del SARS, Mpro: proteasa principal, RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN, Mtasa: Metiltransferasa, ExoN: Exoribonucleasa viral, Nendo U: Endoribonucleasa viral, 2'-O-Mtasa: 2-O-metiltransferasa, MDA5: proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma.

Después de la traducción y el ensamblaje del complejo replicasa, sigue la síntesis del material genético, ya que el SARS-CoV-2 contiene ARN monocatenario de polaridad positiva, este sirve de molde para sintetizar una copia de ARN monocatenario de polaridad negativa, a partir de la cual se producirán las poliproteínas pp1a y pp1ab, las cuales se procesarán y conformarán el complejo RTC, gracias a la actividad enzimática replicativa de este complejo, se crea de nuevo una copia de ARN de polaridad positiva, tal y como el original. El ARN viral recién sintetizado se asocia con la proteína N para dar origen a la nucleocápside. Las proteínas estructurales S, M y E, así como las accesorias son expresadas a partir de los sgARN, son elaboradas en el retículo endoplásmico, moviéndose a lo largo de la vía secretora y posteriormente transportadas al compartimento interno del aparato de Golgi (ERGIC) en donde serán ensambladas junto con la nucleocápside para producir nuevas partículas víricas que serán transportadas hacia la membrana plasmática celular en forma de vesículas, para luego ser liberadas al espacio extracelular por medio de exocitosis. (23)

CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19)

Después de que la OMS nombrara al nuevo virus como SARS-CoV-2, también se le asignó el nombre de COVID-19 a la enfermedad que produce. (24)

- **Método de transmisión**

La transmisión se puede dar de forma directa o indirecta. Dentro de los mecanismos directos se encuentran:

Transmisión por gotas: ocurre de persona a persona por medio de las secreciones respiratorias que emiten los infectados al hablar, toser, estornudar, cantar o respirar. El contagio ocurre cuando estas gotas entran en contacto con la mucosa (nariz o boca) y/o con la conjuntiva ocular, estas gotas tienen un tamaño mayor a 5-10 μ m, y pueden ser desplazadas hasta un metro de distancia cuando se estornuda o tose. (25)

Transmisión por aerosoles: una vez que se evaporan las secreciones respiratorias, se forman partículas de menos de 5 μ m, produciendo aerosoles los cuales quedan suspendidos en el ambiente, siendo infectivas al menos por tres horas, estas partículas se desplazan de ocho a diez metros de distancia, pudiendo entrar a las mucosas o conjuntiva. (26)

Dentro de los mecanismos indirectos se encuentran: la transmisión por contacto, en donde el virus es depositado por gotas o aerosoles en distintas superficies (fómites) permaneciendo viable en función de las características del material, por tanto, el contacto con el fómite y posterior con alguna mucosa (oral, nasal o conjuntival) pueden ocasionar la infección por SARS-CoV-2.

También hay registros de transmisión de forma fecal-oral, esto debido a la capacidad de infección a las células del epitelio intestinal por la expresión de receptores de ECA2 y TMPRSS2. (27)

- **Síntomas**

No todas las personas infectadas por SARS-CoV-2 desarrollan el mismo cuadro de sintomatología, los infectados pueden clasificarse en dos grupos: pacientes asintomáticos, en donde solo se detecta la presencia del virus en su organismo, pero no desarrolla signos de la enfermedad y pacientes sintomáticos, que pueden llegar a presentar síntomas sistémicos como: fiebre alta, escalofríos, tos seca, diarrea, mialgias, fatiga, falta de aliento o dificultad respiratoria, expectoración y hemoptisis, si el cuadro de la enfermedad se agrava se puede desarrollar neumonía, insuficiencia cardiaca, respiratoria y hepática, pudiendo tener un desenlace fatal. (28)

Se ha propuesto que el grado de la enfermedad puede variar de acuerdo con comorbilidades (edad, sexo, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, obesidad, patología pulmonar crónica, VIH (virus de inmunodeficiencia humana), cáncer, embarazo, inmunosenescencia, etc.) y factores ambientales (contaminación, tabaquismo, estrés, uso de esteroides, inmunosupresores o antineoplásicos). (29)

- **Diagnóstico**

El método más confiable para poder determinar algunos patógenos es la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica varias veces una secuencia específica de ADN genómico o cADN durante varios ciclos repetidos, gracias a la actividad de una ADN polimerasa (30).

Los componentes de esta reacción son: el ADN o cADN, enzima, primers, dNTPs, MgCl₂, buffer o solución amortiguadora y agua grado molecular, todos estos elementos interactúan entre sí durante las tres etapas de la PCR que son:

- **Desnaturalización:** Se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN y/o destruir las estructuras secundarias de la misma, permitiendo el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias.
- **Alineación:** Los primers hibridan, es decir, se genera la energía cinética necesaria para que los primers busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH listo para la adición de dNTPs por la ADN polimerasa.
- **Extensión:** Se produce a la temperatura óptica de la ADN polimerasa, va agregando dNTPs complementarios. (31)

Para visualizar los productos de la PCR, se utiliza la electroforesis. Dado que el material genético del SARS-Cov-2 es ARN, previo a la PCR se debe realizar una reacción previa, la retrotranscripción, que permite convertir ARN en cADN y la PCR se convierte en RT-PCR. Además, para la detección de este patógeno la PCR se hace en tiempo real, es decir la detección de los productos se hace durante el transcurso de la reacción, mediante fluorescencia emitida por primers unidos a fluorocromos. (31)

Para detectar el SARS-CoV-2 en una muestra por medio de la RT-PCR se analizan diferentes genes, como pueden ser:

- **Gen N:** Se detecta un fragmento largo de 126 pb del gen N con sondas de hidrólisis marcadas con FAM.
- **Gen RdRp:** Un fragmento de 100 pb de longitud de una región conservada del gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) se detecta con sondas de hidrólisis marcadas con FAM.
- **Gen E:** Se detecta un fragmento de 76 pb de longitud de una región conservada en el gen E con sondas de hidrólisis marcadas con FAM (canal 530).
- **Gen constitutivo RNAsa,** que se utiliza como un control endógeno para evaluar la calidad de la muestra durante todo el proceso (incluyendo la toma de muestra) y por ende el material genético obtenido.

Ninguno de los primers tiene reactividad cruzada con HCoV respiratorio humano común NL63, 229E, HKU, OC43 o MERS. (32)

SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmune, es un conjunto de tejidos, células y moléculas que interaccionan y forman un frente común para integrar una respuesta inmune, (33) este reconoce a un organismo invasor y proporciona señales para que las células respondan de forma adecuada.

Su función primordial es generar mecanismos que eliminen agentes con potencial patogénico, sin embargo, en algunas ocasiones los patógenos pueden evadir las diversas barreras físicas (piel, mucosas y membranas) y llegar a la circulación en donde son fagocitados por las APC (células presentadoras de antígenos) para luego ser presentados a los linfocitos T a través del MHC tipo II. (34)

- **Células CD4⁺ (Th)**

Las células T CD4⁺ coadyuvantes vírgenes (Th0) salen del timo maduras, pero al reconocer antígenos presentados por las APC, a través del MHC de tipo II, son estimuladas, proliferan y se diferencian en distintos linajes celulares definidos por la producción de factores transcripcionales de diferenciación y la secreción de determinadas citocinas, la diferenciación incluye distintos linajes como: Th1, Th2, Th17 y Treg, a este proceso se le conoce como polarización. (35) Cada uno de estos linajes tiene funciones específicas en la homeostasis y la defensa inmune y una incorrecta regulación de la diferenciación de las células Th (células T cooperadoras) se ha visto implicada en diversas enfermedades autoinmunes e inflamación crónica. (36)

Las células Th1 median las respuestas contra patógenos intracelulares, favorecen la proliferación de células Tc (células T citotóxicas), el reclutamiento de macrófagos y el incremento en su actividad microbicida. Las principales citocinas que secreta este grupo es el IFN γ , IL-12 e IL-2, mientras que el primero fomenta la activación de macrófagos, la IL-2 es importante en la maduración de células de memoria CD4 y CD8, la IL-12 induce la activación de las células NK, las cuales liberan IFN γ reforzando la producción de IL-12 por las APC por lo tanto se favorece la diferenciación de este grupo. (37)

Las células Th2 median las respuestas contra patógenos extracelulares, favorecen la proliferación de células B y el cambio a isotipo IgE. Las principales citocinas que libera es la IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25. La IL-4 favorece el cambio a isotipo IgE, la cual se une a basófilos y mastocitos provocando la liberación de histaminas, IL-4, IL-12 y TNF α . La IL-4 también favorece la diferenciación de las células Th2, la IL-5 recluta eosinófilos y la IL-9 induce la producción de mucinas en las reacciones alérgicas. (38)

Las células Th17 median las respuestas contra bacterias extracelulares y hongos, favoreciendo la respuesta inflamatoria y el reclutamiento de neutrófilos. Las principales citocinas que secreta son IL-17 e IL-6, esta última recluta y activa neutrófilos.

La disminución de las células T CD4⁺ se ha asociado con una reducción del reclutamiento pulmonar de linfocitos y de la producción de anticuerpos neutralizantes y citocinas, lo que da lugar a una fuerte neumonitis intersticial inmunomediada y a un retraso en la eliminación del SARS-CoV de los pulmones. (39)

- **Citocinas**

Mecánicamente, una célula estresada o infectada, a través de interacciones receptor-ligando, activa un gran número de glóbulos blancos, incluidos los linfocitos B, los linfocitos T, células NK, macrófagos, células dendríticas y monocitos. Esto da lugar a la liberación de citocinas inflamatorias, que activan más glóbulos blancos en un bucle de retroalimentación positiva. (40)

Las citocinas son proteínas o péptidos de bajo peso molecular, que pueden tener unidas moléculas de azúcar, son secretadas por los linfocitos en respuesta a estímulos; incluyen a interferones, interleucinas, varios factores estimuladores de colonias (CSF), factores de necrosis tumoral y factores transformantes de crecimiento, tienen un papel directo en la activación de funciones efectoras antimicrobianas, y proporcionan las señales que especifican, amplifican y resuelven la respuesta inmunitaria. (41)

Las citocinas regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune al estimular o inhibir la activación, proliferación y diferenciación de diversas células y controlar la secreción de anticuerpos y otras citocinas. Entre las múltiples respuestas fisiológicas que requieren la participación de éstas podemos encontrar: el desarrollo de reacciones inmunitarias (celular y

humoral), inducción de la respuesta inflamatoria, regulación de la hematopoyesis y el control de la proliferación y diferenciación celular. (42)

En infecciones sistémicas, la presencia de niveles elevados de citocinas tiene un impacto importante en una amplia gama de procesos fisiológicos que dan lugar a daños colaterales. Se ha demostrado que la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias específicas como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$ e $IL-18$ es un marcador distintivo de la infección viral, (1) por tanto, la capacidad de neutralizar las citocinas para mitigar el daño y permitir la resolución de la enfermedad pone de manifiesto que estos niveles elevados no son sólo marcadores de inflamación, sino que también contribuyen de forma decisiva a la enfermedad. (41)

Si bien, la fisiopatología del SARS-CoV-2 no se ha descrito completamente, epidemias previas por otros coronavirus podrían sustentar la hipótesis de comportamiento o anticipar respuestas inmunes, se sabe que la neumonía grave causada por los coronavirus humanos patógenos suele estar asociada a una rápida replicación del virus, una masiva infiltración de células inflamatorias al tejido pulmonar y una elevada producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, lo que puede provocar un SDRA, estudios realizados en humanos que fallecieron por SARS-CoV y en estudios de modelos animales, se presume que se produjo una respuesta inmunitaria desregulada, lo que provocó una inflamación exuberante y por ende una enfermedad letal. (2) Así, tanto el SARS como el MERS se caracterizan por acompañarse de respuestas inmunitarias asociadas a cantidades elevadas de citocinas pro-inflamatorias. (43) También, los coronavirus patógenos muestran un potente antagonismo del interferón (IFN), que es evidente en los casos de COVID-19 con señalización reducida de IFN, y una respuesta inmunitaria excesivamente agresiva agravada por el aumento de citocinas. (44)

Hasta el momento se sabe que el SARS-CoV-2 tiene predilección por el árbol respiratorio, y una vez que penetra genera una respuesta inmune anormal de tipo inflamatorio, con incremento de citocinas, lo que agrava al paciente, produciendo un fallo multiorgánico. (13)

En un estudio previo, se analizó el suero de pacientes que desarrollaron SARS grave, se encontró la presencia de altos niveles de citocinas pro-inflamatorias ($IFN\gamma$, $IL-1$, $IL-6$, $IL-12$ y $TGF-\beta$) y quimiocinas ($CCL2$, $CXCL10$, $CXCL9$ e $IL-8$), en comparación con los pacientes

que no desarrollaron una enfermedad grave; por el contrario, los pacientes de SARS con enfermedad grave tenían niveles muy bajos de la citocina anti-inflamatoria IL-10. (2)

Cabe resaltar que los pacientes graves por COVID-19 presentan un perfil de citocinas semejante a los pacientes con linfocitosis hemofagocítica (sHLH), el cual consiste en un síndrome hiperinflamatorio que se caracteriza por una hipercitoquinemia fulminante y mortal con insuficiencia multiorgánica y se desencadena por infecciones virales (45). En un estudio retrospectivo de casos confirmados de COVID-19 en Wuhan, se encontró que la ferritina y la IL-6 estaban elevadas en pacientes que fallecieron, lo cual apoya la hipótesis de que la mortalidad puede deberse a una hiperinflamación generada por el virus. (46)

En un estudio realizado en Israel se observó que había una mayor secreción de citocinas Th2 en suero como IL-4, IL-5, IL-10 (que aumenta la producción de anticuerpos), en pacientes fallecidos por un caso severo de COVID-19. (47) Y por el contrario, el número absoluto de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ disminuye significativamente y los linfocitos Th1 tienden a ser más bajos en casos severos. (48)

En el cuadro 3, se enlistan las citocinas Th1 y Th2 que se analizaron en este trabajo.

Cuadro 3. Citocinas analizadas.

Citocina/PM	Fuente	Actividad
IL-1β / 17.3kDa	Monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), células T, B y NK	Inducción de fiebre, reacción de fase aguda y estimulación de la producción de neutrófilos.
IL-4 / 15 a 19kDa	Mastocitos, células T, células estromales de la médula ósea	Promueve el crecimiento y desarrollo de células B y T, y de células del linaje monocítico, endoteliales y fibroblastos
IL-6 / 26kDa	Células T y B, macrófagos, células estromales de la médula ósea, fibroblastos, células endoteliales y astrocitos	Regula funciones de las células B y T, efectos <i>in vivo</i> en hematopoyesis e inducen la reacción de fase aguda

Citocina/PM	Fuente	Actividad
IL-12 / 30-33kDa	Macrófagos y CD	Inductor de la diferenciación de Th1, induce la producción de IFN γ en células T y NK, intensificando la actividad de NK
IL-17 / 28-31kDa	Células Th	Estimulación de la producción de citocinas en células epiteliales, endoteliales y estromales. Intensifica la expresión de ICAM-1
IL-18 / 18.2kDa	Células del linaje monocítico y CD	Fomenta la diferenciación a Th1, induce la producción de IFN γ en células T y aumenta la citotoxicidad de NK
IL-23 / 35-40kDa	CD activadas	Actividades biológicas iguales a IL-12
IFN γ / 40kDa	Células Tc, Th y NK	Activación, proliferación y diferenciación de células T, B, NK y macrófagos, incrementa la expresión de MHC en APC, participa en la diferenciación de Th1, actividad antivírica y antiproliferativa
TNF α / 52kDa	Monocitos, macrófagos, células T activadas, neutrófilos y fibroblastos	Mediador potente de funciones antiinflamatorias e inmunitarias, regula la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares, promueve angiogénesis, resorción ósea y procesos trombóticos

CD: células dendríticas, NK: Natural killer, Tc: células T citotóxicas, Th: células T cooperadoras, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, APC: células presentadoras de antígeno.

Por tanto, es importante analizar los niveles de estas moléculas endógenas, ya que son importantes indicadores del pronóstico de la enfermedad, tanto de una resolución o de futuras complicaciones secundarias que pueden conducir a la muerte.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La pandemia por COVID-19, originada por el SARS-CoV-2, es una enfermedad multisistémica que puede presentar un amplio espectro de síntomas que van desde tos, dolor muscular y articular, fiebre, pasando por aquellos que desarrollan problemas respiratorios, gastrointestinales y otros que presentan hiperinflamación pulmonar provocando una reacción inflamatoria exacerbada, denominada por algunos autores como “tormenta de citocinas” y en algunos casos lleva a la muerte. Sin embargo, no se conoce aún si durante la infección provocada por SARS-CoV-2 la tormenta de citocinas es originada por una ruptura del equilibrio de la respuesta inmune (Th1/Th2).

HIPÓTESIS

Si miembros de la familia Coronaviridae (SARS y MERS-CoV) presentan una ruptura del equilibrio de la respuesta inmune (Th1/Th2), causando una alta producción de citocinas pro-inflamatorias, entonces, durante la infección causada por SARS-CoV-2 existirá un desbalance destructivo por la exagerada presencia de células inmunes y producción exacerbada de citocinas, lo que en algunos casos puede causar la muerte.

OBJETIVOS

General:

- Caracterizar el perfil de citocinas (Th1/Th2) en muestras de hisopados nasofaríngeos con PCR positivo para COVID-19, recibidas en el laboratorio de patología molecular.

Específicos:

- Evaluar la presencia de los genes E, RdRp y RNAsa (gen constitutivo) en las muestras recibidas en laboratorio de patología molecular,
- Caracterizar el perfil de citocinas de las muestras positivas para COVID-19

MATERIAL Y MÉTODOS

A) DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental comparativo y longitudinal.

B) UNIVERSO

Población: Se dividirán en cuatro grupos de acuerdo con el cuadro 4, con un total de 80 muestras.

Criterios de exclusión:

- Si hay muestra insuficiente de hisopado nasofaríngeo para evaluar las citocinas.
- Resultados negativos o indeterminados para COVID-19 por RT-PCR.

Criterios de inclusión:

- Muestras positivas para COVID-19 por RT-PCR.
- Muestras que tengan un estudio previo y/o posterior al resultado positivo para COVID-19.
- Individuos sanos sin ninguna comorbilidad y prueba de RT-PCR negativa para COVID-19.

Cuadro 4. Grupos de muestras para análisis de citocinas.

Grupo	Resultado en la RT-PCR
1	Negativo-positivo-negativo
2	Negativo-positivo
3	Positivo-negativo
4	Individuos sanos

C) VARIABLES

Dependiente: relación de citocinas.

Independiente: resultado de la RT-PCR y PCR en punto final

D) TÉCNICAS O INSTRUMENTOS

- Extracción de ácidos nucleicos
- PCR punto final
- RT-PCR
- Electroforesis

E) PROCEDIMIENTO

Se realizó una búsqueda en el banco de muestras de SARS-CoV-2 del laboratorio de patología molecular del CM-ABC, se tomaron las muestras de hisopados nasofaríngeos que cumplían con los criterios de inclusión.

Aislamiento de ARN para determinación de COVID-19 y citocinas.

Se tomó 350 µl de muestra y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 1.5mL que contenía 350µL de Buffer RLT más 350µL de etanol, y se siguió el protocolo de acuerdo con el fabricante: (se utilizó el kit RNeasy Mini Kit QIAGEN (49)).

1. Se transfirió 600µL del homogenizado anterior a la columna de RNeasy, centrifugándose por 15s a 8000g y se desechó el sobrenadante. (se repitió este paso hasta pasar toda la muestra por la columna).
2. Se lavó la columna con 600µL de buffer RW1 y se centrifugó por 15s a 8000g, y se desechó el sobrenadante.
3. Se lavó con 500µL de buffer RPE y se centrifugó por 15s a 8000g, y se desechó el sobrenadante.
4. Se repitió el paso 3.
5. Se centrifugó la columna por 2 min a 8000g para secar la columna.
6. Se transfirió la columna a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y se agregó 60µL de agua libre de RNasa, y se centrifugó a 2 min 8000g, para eluir el RNA.

El material genético obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Evaluación de la presencia de SARS-CoV-2

Se colocaron 5µL de ARN para cada uno de los genes a evaluar (gen E, RdRp y RNasa) en placas de 96 pozos Applied Biosystem con 20µL de Master Mix, de acuerdo al cuadro 5.

Cuadro 5. Master mix para detección de gen E, RdRp y RNasa.

Master Mix (1 reacción)					
Gen E		Gen RdRp		Gen RNasa	
Agua	3.5µL	Agua	2.5µL	Agua	4.1µL
Buffer 2x	12.5µL	Buffer 2x	12.5µL	Buffer 2x	12.5µL
Mg	1µL	Mg	0.5µL	Mg	0.4µL
Primer F	1µL	Primer F	1.5µL	Primer F	1µL
Primer R	1µL	Primer R	2µL	Primer R	1µL
Probe	0.5µL	Probe	0.5µL	Probe	0.5µL
Enzima	0.5µL	Enzima	0.5µL	Enzima	0.5µL

Primer F: primer Forward, Primer R: primer Reverse

Para la RT-PCR, la placa se colocó en un termociclador Applied Biosystem 7500 bajo el siguiente programa: una RT de 55°C por 15 min, desnaturalización a 95°C por 3 min, un ciclo de 45 ciclos: 95°C por 15s y 58°C por 1 min (ver anexo 1).

Evaluación de citocinas

- Calidad del material genético

Para evaluar la calidad del ARN extraído, se utilizaron los primers reportados por BIOMED-2 en 2003 (Ver anexo 2) (50), utilizando 5µL del ARN extraído en 20 µL de Master Mix (Ver cuadro 6) en placas Applied Biosystem de 96 pozos.

Cuadro 6. Master Mix para evaluación del material genético.

Master Mix	
Enzima HotStarTaq (51)	12.5 µL
Pool de primers	7.5 µL
Agua libre de RNAsas cbp	20 µL

La placa se colocó en un termociclador Veriti Applied Biosystems con el siguiente programa: un paso de desnaturalización de 95°C por 5 min, 45 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión de 72°C por 5 min (ver anexo 3). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 60mV por 60 min, analizándose en un Gel Doc E-Z gel Dock System (Bio-Rad), se utilizó el marcador de peso molecular AmpliSize Molecular Ruler 50-2000 pb Ladder de Bio Rad (52).

- Evaluación de Citocinas

Se pusieron 3µL de ARN con 22µL de Master Mix, (ver cuadro 7), colocándose en placas Applied Biosystem de 96 pozos.

Cuadro 7. Master mix citocinas

Master Mix	
Enzima HotStarTaq	12.5 µL
Primer F*	1 µL
Pimer R*	1 µL
Agua libre de RNAsas	7.5 µL

**Los primers se colocarán de acuerdo con la citocina a evaluar*

La placa se colocó en un termociclador Applied Biosystem 7500 para PCR punto final, utilizándose el programa descrito en el cuadro 8.

Cuadro 8. Programa para PCR en punto final

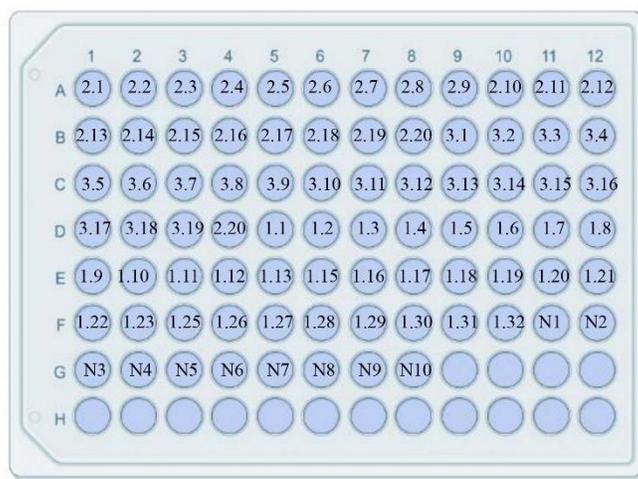
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	5 min
Ciclado (45 ciclos)	95°C	60 s
	60°C*	60 s
	72°C	60 s
extensión	72°C	7 min

**Tm: varía dependiendo de la citocina a evaluar, ver cuadro 9*

Cuadro 9. Tm, que varía dependiendo la citocina a evaluar

Nombre	Primer F	Primer R	Tamaño (pb)	Tm (°C)
IL 1 β	GTCCAAGTGTCTCAAGCAGCC	TTCACTGGCGAGCTCAGGTAC	50	56
TNF α	G TTCAGCCACTGGAGCTGC	AGCCCATGTTGTAGCAAACCC	52	60
IL 4	CCTCACATTGTCACTGCAAATC	TGGGAGGTGAGACCCATTA	50	54
IL 12	CCCTGTGCCTTAGTAGTATTT	ACTCCACCTGGTACATCT	51	57
IL 17	TGGTGTCACTGCTACTGCTGC	TTCCTGCCTTCACTATGGCC	51	59
IL 23	TGAGGCTTGAATCTGCTGAG	CTCCTGCAGCCTGAGGGTC	52	60
IL 18	AGATAATGCACCCCGGACC	AGCCATACCTCTAGGCTGGCT	67	58
INF γ	GTCAGATGCTGCTTCGAGGT	CAGGCAGGACAACAATTACT	53	57

Figura 3. Posiciones de las muestras en las placas.



El producto obtenido se corrió en geles de agarosa al 3% a 80mV por 120 min, visualizando los resultados obtenidos en el analizador de geles E-Z gel Dock (Bio-Rad) utilizando el marcador molecular de tamaño de pares de bases AmpliSize Molecular Ruler 50-2000 pb Ladder de Bio Rad. (52)

Una vez visualizado el resultado, se analizó la intensidad de la banda, la cual es proporcional a la cantidad de producto amplificado.

F) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con los ensayos de expresión mediante PCR en punto final, se evaluaron las diferencias significativas de los grupos de estudio en las citocinas evaluadas, la prueba estadística utilizada fue Chi-cuadrada, mediante el Software SPSS.

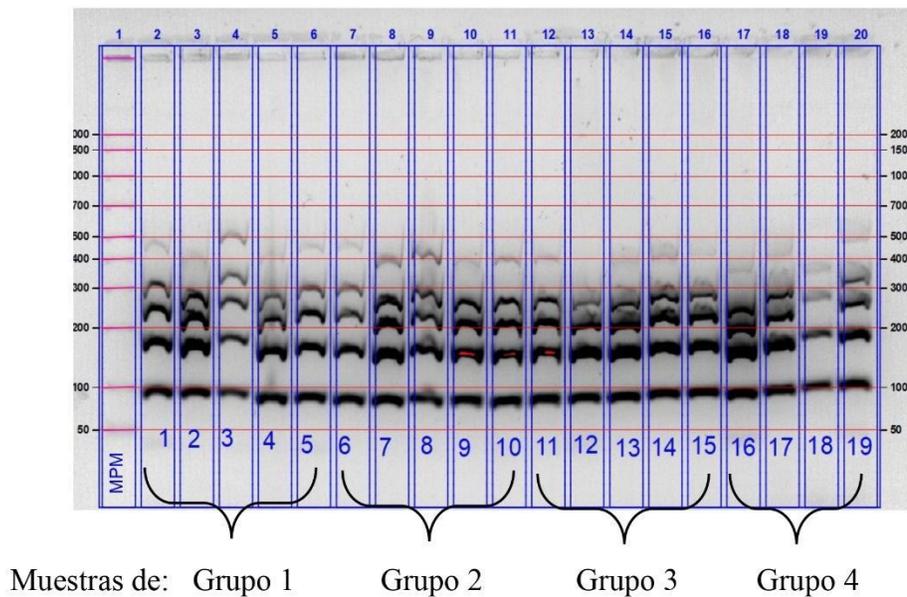
Esta prueba se utilizó ya que nos permite la correlación entre dos variables, en este caso, conocer la relación que existe entre la expresión de citocinas y el SARS-CoV-2.

RESULTADOS

- Evaluación del material genético.

Tras la extracción del material genético con el Kit de Qiagen, se realizó una PCR en punto final, tras lo cual se hizo electroforesis en geles de agarosa al 3% para evaluar la calidad del material genético obtenido, para esto se utilizaron los primers reportados por BIOMED-2 en 2003 (Ver anexo 2).

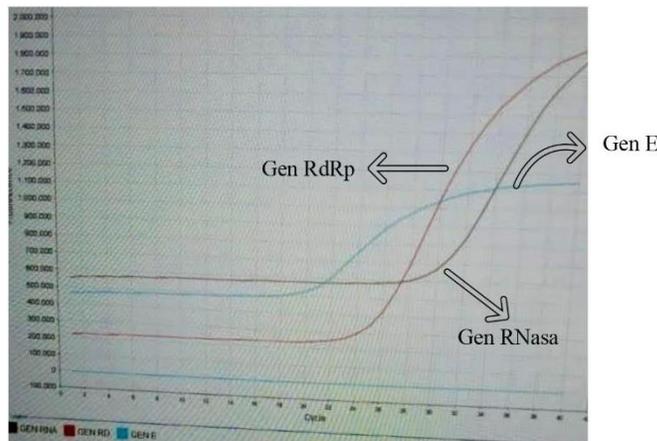
Imagen 1. Resultados de PCR en punto final, para evaluar la calidad del material genético obtenido tras la extracción



- RT-PCR para detección de SARS-COV-2.

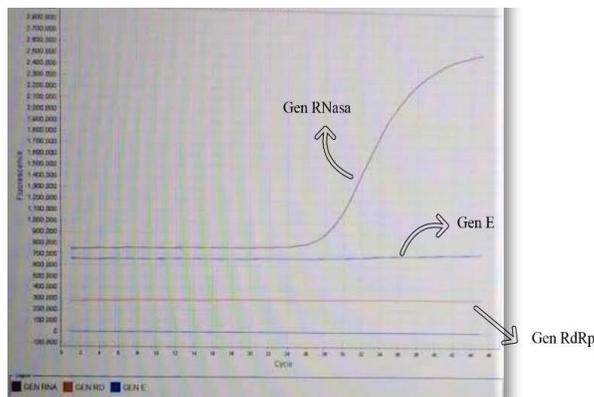
Para que una muestra sea positiva debe de mostrar una amplificación clara, tal y como se muestra en la imagen siguiente, indicando así la presencia de los genes (E, RdRp y RNasa), esto ocurre debido a que en la RT-PCR se utiliza una sonda marcada, que mediante fluorescencia indicará la presencia del gen buscado durante la extensión en la PCR, tras previamente unirse a una secuencia específica en la alineación.

Imagen 2. Muestra positiva para SARS-CoV-2



Por el contrario, una muestra negativa ocurre cuando no se produce ninguna amplificación, es decir, durante el proceso de replicación no se encuentra el fragmento específico y por tanto no se emite fluorescencia.

Imagen 3. Muestra negativa.



NOTA: En ambas muestras siempre debe de amplificar el gen RNasa, el cual se usa como un control endógeno, confirmando una buena toma de muestra, integridad del ARN obtenido o la presencia de algún inhibidor de la PCR.

- Evaluación citocinas

Mediante RT-PCR Se realizó la evaluación de cada uno de los grupos estudiados mediante la prueba estadística Chi cuadrada, en el cuadro 10 se enlistan el porcentaje de muestras que mostraron una elevada expresión de la citocina y el porcentaje de las muestras que expresaron de manera más baja la citocina, además del valor obtenido mediante chi cuadrada.

Cuadro 10. Expresión de citocinas en porcentaje durante el curso de la enfermedad, así como el valor estadístico de chi cuadrada.

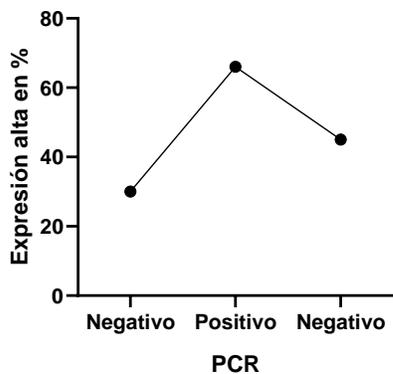
IL- 1 β					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	60%	60%	50%	0.670
	Expresión baja	40%	40%	50%	
Grupo 2	Expresión alta	20%	80%	N/A	0.007
	Expresión baja	80%	20%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	80%	20%	0.007
	Expresión baja	N/A	20%	80%	
IL-12					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	50%	50%	40%	1.0
	Expresión baja	50%	50%	60%	
Grupo 2	Expresión alta	60%	40%	N/A	0.371
	Expresión baja	40%	60%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	50%	30%	0.361
	Expresión baja	N/A	50%	70%	

IFN- γ					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	70%	50%	50%	0.581
	Expresión baja	30%	50%	50%	
Grupo 2	Expresión alta	40%	60%	N/A	0.371
	Expresión baja	60%	40%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	20%	80%	0.007
	Expresión baja	N/A	80%	20%	
TNF- α					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	10%	90%	30%	0.001
	Expresión baja	90%	10%	70%	
Grupo 2	Expresión alta	70%	30%	N/A	0.074
	Expresión baja	30%	70%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	50%	50%	1.0
	Expresión baja	N/A	50%	50%	
IL-18					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	40%	60%	40%	0.585
	Expresión baja	60%	40%	60%	
Grupo 2	Expresión alta	60%	40%	N/A	0.371
	Expresión baja	40%	60%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	50%	50%	0.809
	Expresión baja	N/A	40%	50%	
IL-4					

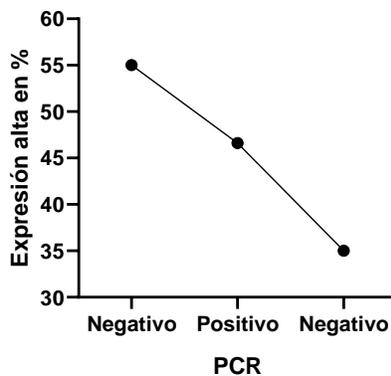
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	70%	20%	50%	0.079
	Expresión baja	30%	80%	50%	
Grupo 2	Expresión alta	50%	50%	N/A	0.809
	Expresión baja	50%	40%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	10%	90%	0.0
	Expresión baja	N/A	90%	10%	
IL-17					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	10%	90%	40%	0.01
	Expresión baja	90%	10%	60%	
Grupo 2	Expresión alta	50%	50%	N/A	1.0
	Expresión baja	50%	50%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	70%	30%	0.074
	Expresión baja	N/A	30%	70%	
IL-23					
		Negativo	Positivo	Negativo	Chi cuadrada
Grupo 1	Expresión alta	50%	50%	60%	0.875
	Expresión baja	50%	50%	40%	
Grupo 2	Expresión alta	50%	50%	N/A	1.0
	Expresión baja	50%	50%	N/A	
Grupo 3	Expresión alta	N/A	50%	50%	1.0
	Expresión baja	N/A	50%	50%	

En las siguientes graficas (1-8) se muestra el comportamiento de las citocinas a lo largo del ciclo de la enfermedad, para esto se tomó en cuenta el promedio de expresión alta en cada una de las fases.

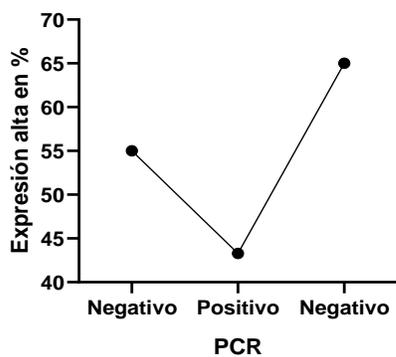
Gráfica 1. IL 1 β



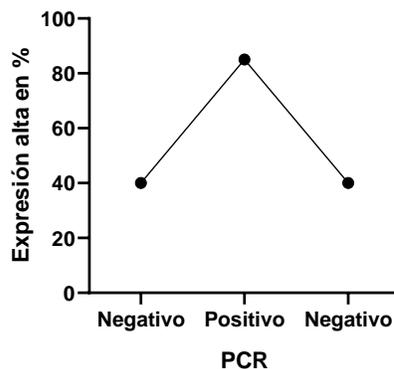
Gráfica 2. IL 12



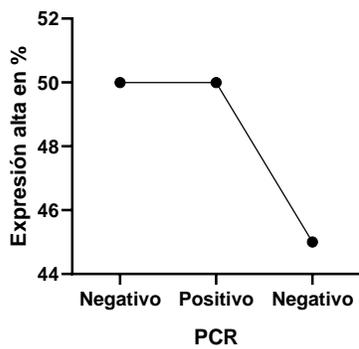
Gráfica 3. IFN γ



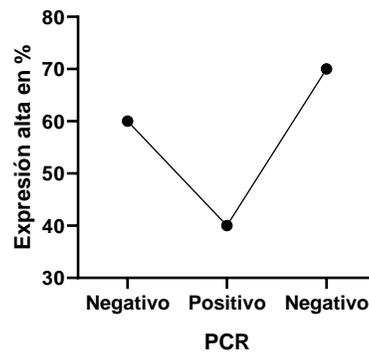
Gráfica 4. TNF α



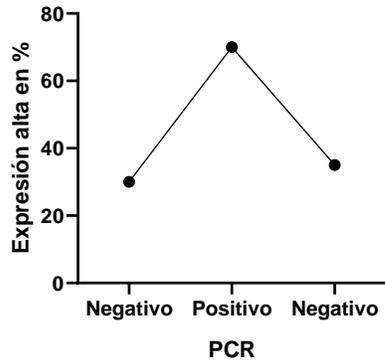
Gráfica 5. IL 18



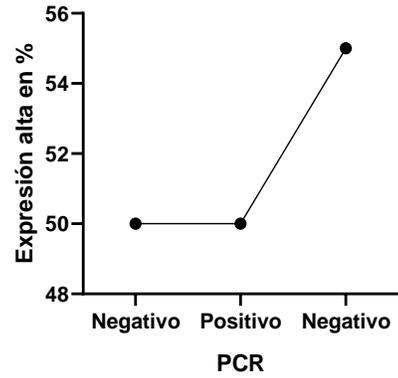
Gráfica 6. IL 4



Gráfica 7. IL 17

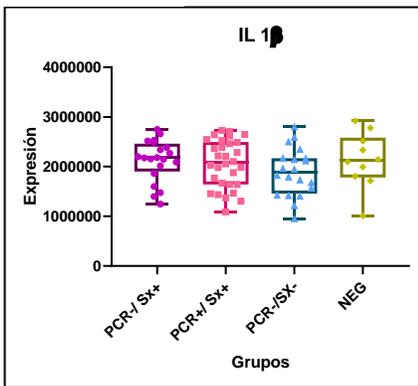


Gráfica 8. IL 23

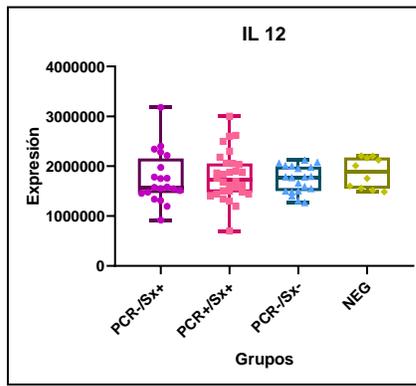


Las gráficas 9-16 muestran la expresión de citocinas en base a la cantidad de pares de bases obtenidas en la RT-PCR.

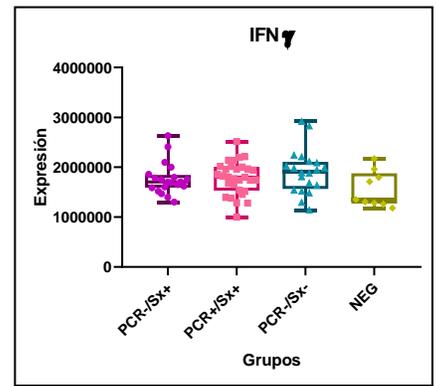
Gráfica 9.



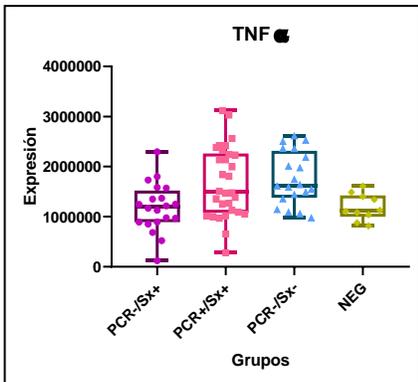
Gráfica 10.



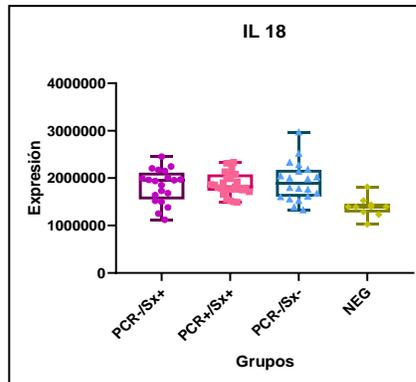
Gráfica 11.



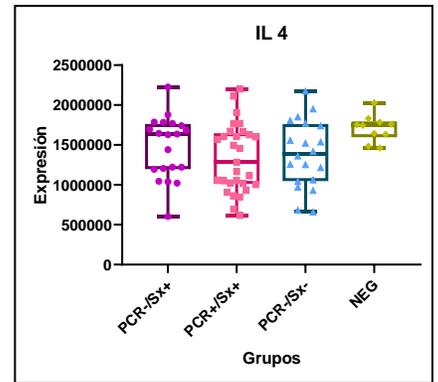
Gráfica 12.



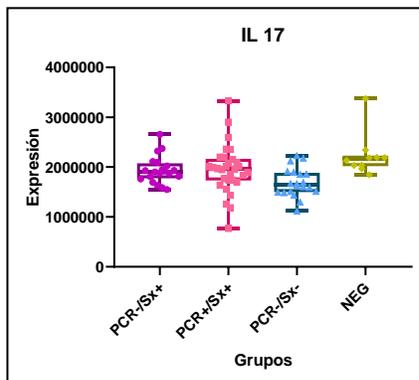
Gráfica 13.



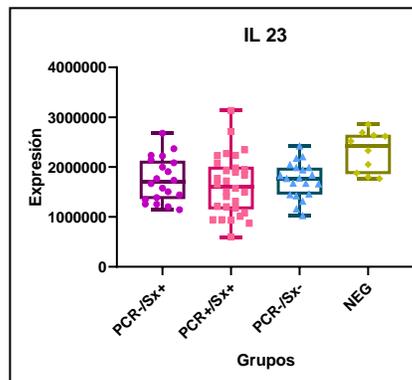
Gráfica 14.



Gráfica 15.



Gráfica 16.



DISCUSIÓN

A través de la técnica de PCR en punto final se analizó el perfil de citocinas Th1/Th2 de un total de 80 muestras de hisopados nasofaríngeos, 30 de ellas positivas por RT-PCR para SARS-CoV-2, 40 con un diagnóstico negativo para dicho virus y 10 como control negativo, las cuales se obtuvieron del banco de muestras del laboratorio de patología molecular del CM ABC.

Las muestras analizadas se dividieron en tres grupos, donde el grupo 1 corresponde a subgrupos en donde hay una muestra con PCR negativo, seguido de un resultado PCR positivo y finalmente una PCR negativa, por ende, se puede inferir cómo se comportan las citocinas durante el curso de la infección. En el grupo 2 y 3 solo se cuenta con un PCR positivo y un PCR negativo antes o después de la infección según corresponda.

Cuando una persona se infecta por el nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, a través de las partículas expulsadas por alguien portador del virus, la primera línea de defensa comienza a actuar, es decir, una respuesta inmunitaria innata que trata de combatir al agente extraño para el organismo, si no se logra eliminar al patógeno, posteriormente comenzará a desarrollarse una respuesta inmune adaptativa que incluye una presentación antigénica por parte de las APC y los linfocitos T provocando una liberación de citocinas que conducirá a la diferenciación entre una respuesta Th1 o Th2 dependiendo del microambiente que exista durante la presentación.

Si bien el sistema inmunológico tiene la tarea de defendernos, una respuesta inmunitaria desregulada y excesiva puede causar inmunopatologías, tal es el caso de la producción de citocinas, que si bien estas nos protegen, también pueden volverse patológicas en el momento en que su producción se vuelve descontrolada.

Algunos estudios han indicado que la progresión de la enfermedad puede representarse en tres fases: multiplicación viral aguda, hiperactividad de la respuesta inmune y recuperación pulmonar o destrucción pulmonar que conduce a la muerte. (1) Se cree que una respuesta inflamatoria excesiva al SARS-CoV-2 es una de las principales causas de la gravedad de la enfermedad y de la muerte de los pacientes con COVID-19, asociándose a niveles altos de citocinas circulantes, linfopenia e infiltración sustancial de células mononucleares en los pulmones, corazón, bazo, hígado, ganglios linfáticos y riñón, como se ha observado en los análisis post mortem. (53)

Para muchos tipos de infecciones, la producción coordinada de niveles circulantes sostenidos de citocinas pro-inflamatorias es una consecuencia natural de una respuesta innata y adaptativa adecuada, crítica para el control de los patógenos. Muchas de las citocinas asociadas con sepsis pueden causar fiebre, inducen muerte celular e impactan en la fisiología y coagulación vascular y como resultado tienen el potencial de causar daños colaterales significativos generalizados en los tejidos.

Es importante resaltar que, de los tres grupos analizados, solo podemos tener la certeza de que el grupo 1 y 3 sobrevivieron a la enfermedad, ya que se tiene un PCR negativo post infección, pero del grupo 2 no se conoce el desenlace.

- Citocinas Th1/Th2 antes del desarrollo de COVID-19.

Antes de que surgiera la enfermedad en el grupo 1 y 2, se observa que sus niveles de citocinas eran relativamente bajas al compararlas con el estado activo de la enfermedad, si bien no se pueden delimitar valores de referencia de citocinas, debido a que al ser parte del sistema inmunológico pueden verse fácilmente modificadas por enfermedades, procesos inflamatorios, entre otros estados que comprometen la salud (patologías diferentes a la COVID-19), al tener una referencia del estado de las citocinas previa al desarrollo del COVID-19, puede mostrarnos un panorama del comportamiento del perfil Th1/Th2 y como

este se modifica durante el curso de la enfermedad y si es un factor determinante para la complicación o evolución favorable de la enfermedad.

- Citocinas Th1/Th2 durante el COVID-19.

Si bien la fisiopatología de la COVID-19 aún no está completamente descrita, al ser una enfermedad respiratoria las primeras células afectadas son las células epiteliales de las vías respiratorias y alveolares, las células endoteliales vasculares y los macrófagos alveolares, estos últimos son APC profesionales, que fagocitarán al antígeno y a su vez liberan IL-1 β , TNF α e IL-6.

La IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria, en los resultados obtenidos se observa un aumento significativo en los tres grupos de la presencia de esta molécula, indicando que el paciente está pasando por un proceso inflamatorio, dicha citocina es liberada por los macrófagos, células NK, linfocitos T, B y células dendríticas, los cuales están en constante activación para tratar de eliminar al patógeno, la fiebre es uno de los primeros síntomas de COVID-19, la cual es provocada por la liberación de esta citocina, al tener una actividad como pirógeno endógeno.

La IL-17 al igual que en la IL-1 β mostró un aumento significativo en las muestras detectadas del grupo 1 respecto al PCR negativo previo a la infección. La IL-17 pertenece al grupo de citocinas producidas por una respuesta Th17, la cual es estimulada por la producción de IL-6. Si esta citocina está presente en concentraciones altas durante el curso de la enfermedad, entonces la IL-17 también se ve aumentada significativamente. Esta citocina también puede reclutar monocitos y neutrófilos al sitio de la infección con inflamación, provocando la elevación de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, por ello éstas aumentan de manera proporcional.

Tanto la IL-18 como la IL-23 no presentaron ningún cambio significativo; si bien ambas citocinas son pieza clave en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias, la IL-23 favorece el desarrollo de una respuesta de la IL-17, que como se menciona en el párrafo anterior, muestra un aumento significativo previo a la infección en el grupo 1, pudiendo comparar la presencia de IL-23 con IL-17.

- Citocinas Th1

La IL-12 no presenta ningún cambio significativo respecto al PCR negativo previo a la infección, es importante recordar que la producción de esta citocina es favorecida por la expresión de IFN- γ , como se explica a continuación, el SARS-CoV-2 genera un antagonismo con el IFN- γ , lo que podría explicar porque la IL-12 no presenta cambios durante el transcurso de la enfermedad.

El IFN- γ muestra un ligero incremento cuando la infección está activa, esta citocina es producida en respuesta a una infección vírica y activa a los macrófagos, no obstante se ha demostrado que el SARS-CoV-2 es un antagonista del IFN, impidiendo su expresión, de tal manera que aunque el IFN- γ debería de estar expresado mayormente, se ve limitado por el antagonismo del SARS-CoV-2, provocando un aumento de la carga viral, siendo un grave problema para el paciente, ya que al disminuir la expresión del IFN provoca el aumento de la carga viral y por ende puede desencadenarse un cuadro más severo de la enfermedad. Pese a que podemos observar una ligera disminución del IFN, una producción sostenida de éste llevará a la activación de macrófagos y con ello a la liberación de citocinas pro-inflamatorias que producen un cuadro más grave de la enfermedad. Un estudio hecho en ratones (2), demostró que el bloqueo de la señalización del IFN, el agotamiento de los monocitos y macrófagos inflamados y la neutralización de una citocina inflamatoria como el TNF, protegió a los ratones de una infección letal por SARS-CoV.

La respuesta por IFN es muy importante, ya que, si es tardía o insuficiente y el daño tisular causado por el virus es muy grave, o la respuesta inflamatoria es desproporcionada, se genera una señal de daño muy grande que provoca un estado de hiper inflamación local, que generará una respuesta desproporcionada del sistema inmune adaptativo generando un cuadro de enfermedad muy similar a la linfocitosis hemofagocítica. (54)

El TNF- α en el grupo 1 aumentó nueve veces más en las muestras positivas que en las negativas para SARS-CoV-2, al igual que la IL-1 β actúa sobre el hipotálamo para inducir fiebre, aumentando la producción de IL-1 e IL-6, por esta razón los valores de ambas citocinas incrementan durante la infección activa, ya que una aumenta la expresión de la otra y viceversa y el aumento de esta puede provocar una progresión negativa de la enfermedad.

Una característica importante que podemos notar es cómo tanto la IL-1 β como el TNF- α están elevadas durante el curso de la enfermedad, estas se producen en los pulmones de pacientes con COVID-19, siendo fuertes inductores de hialuronano sintasa 2 (HAS2) en células epiteliales CD31⁺, células epiteliales alveolares EpCAM⁺ y fibroblastos. El hialuronato, el cual es sintetizado por la HAS2, tiene la capacidad de absorber agua hasta mil veces su peso molecular, formando una especie de gelatina líquida transparente en los pulmones, lo que contribuye a la dificultad respiratoria en las personas infectadas, (55) lo cual explicaría cómo al incrementarse la producción de estas citocinas, se conducirá a la gravedad de la enfermedad, al presentarse una baja en la saturación de oxígeno, inducida por la gelatina formada; por tanto, el reducir o inhibir la producción de la HAS2 podría evitar la dificultad respiratoria.

- Citocinas Th2.

La IL-4 disminuyó en el grupo 1 cuando la infección estaba activa, por ende, podemos inferir que durante el curso de la enfermedad hay una mayor expresión de la respuesta Th1 sobre la expresión de las citocinas Th2.

Se ha demostrado que una respuesta Th1 es menor en casos graves de la enfermedad, (48) contrario a la inducción de una respuesta Th2, la cual si es muy elevada puede conducir a un desenlace fatal de la enfermedad. Por tanto, se explica porque en el grupo 1 la respuesta Th2 estaba disminuida en el transcurso de la enfermedad, ya que son muestras que posteriormente presentaron una PCR negativa, lo que implica que el organismo logró combatir la enfermedad.

- Citocinas Th1/Th2 después de la recuperación por COVID-19.

La IL-1 β que es una de las citocinas pro-inflamatorias que se encuentran en mayor proporción durante del ciclo de la enfermedad, disminuye considerablemente en el grupo 3, de las diez muestras solo dos de ellas continuaron con valores altos respecto al curso de la enfermedad, lo cual indica la disminución del proceso inflamatorio. Al comparar los 3 grupos podemos notar como esta interleucina se encuentra en niveles relativamente bajos en el cuerpo humano, al cursar por la COVID-19 los valores aumentan, pero posteriormente los niveles disminuyen.

Las IL-18 e IL-23 no muestran ningún cambio significativo antes, durante o después de la infección. Una de las funciones de la IL-23 es favorecer la producción de IFN γ , el cual es suprimido por el SARS-CoV-2, pero también ayuda a la expresión de IL-17, la cual podemos ver que durante el curso de la enfermedad aumenta para luego descender, por lo cual se podría sospechar que estas citocinas, IL-18 e IL-23 varían en función de la expresión de otras citocinas como IL-17, al no tener un valor de referencia para las citocinas no se puede demostrar de manera cuantitativa y la manera en que podemos observar su papel inmunológico es la influencia que tiene sobre la expresión de otras citocinas.

IL-17 también disminuye su concentración al finalizar la infección, como se mencionó con anterioridad, esta citocina está involucrada en el aumento o disminución de IL-1, por ende, al disminuir la IL-17 también disminuye IL-1, importante citocina pro-inflamatoria observada en el curso de la enfermedad por SARS-CoV-2.

- Citocinas Th1

La IL-12 en la fase previa, durante y post infección no muestra una variación significativa. El grupo 1 es el único en donde podemos ver la evolución de la enfermedad con un desenlace favorable, ya que al tener un resultado de PCR negativo indica que se venció el estado patológico, por tanto, el no ver una variación de esta citocina, indica la prevalencia de una respuesta Th1 durante la enfermedad.

EL IFN- γ en las muestras después de la infección aumentó cuatro veces más respecto a las muestras positivas para COVID-19, lo cual indica que hay una respuesta Th1 que favorece la recuperación. Aunque el SARS-CoV-2 sea un antagonista del IFN, una mayor producción de éste, indica que logró revertir el antagonismo producido para poder disminuir la carga viral, para así mantener una respuesta Th1 y favorecer la recuperación. Sin embargo, este aumento puede significar una respuesta mayor ante la infección vírica, ya que en un estudio realizado (1); se observó que al menos dos semanas posteriores a la infección, los valores de IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-12 se encontraban elevados.

El TNF- α en el grupo 3 se mantuvo sin ningún cambio, pero en el grupo 1 los valores de esta citocina disminuyeron, indicando así el término del proceso inflamatorio, al disminuir el TNF- α podemos observar como también disminuyeron los valores de IL-1 β y podemos

inferir que los valores de IL-6 debieron disminuir, lo que conduce a evitar un choque séptico que puede llevar a un desenlace fatal, por tanto, los valores de esta citocina son importantes marcadores de la progresión de la enfermedad.

- Citocinas Th2

En el grupo 1 hubo una pequeña diferencia en la expresión de la IL-4, siendo menor su expresión cuando se encontraba activa la enfermedad, no obstante, en el grupo 3 se observó un aumento de la expresión de esta citocina cuando ya no había indicios de infección.

CONCLUSIONES

Durante la infección vírica los factores del huésped desencadenan una respuesta, sin embargo, cuando está fuera de control se le denomina inmunopatogénesis, provocando daños en el tejido pulmonar, deterioro funcional y reducción de la capacidad pulmonar.

Durante el curso de la enfermedad, el TNF- α e IL-1 β se encuentran elevadas, siendo productoras de los síntomas producidos, que previamente se han descrito. Y al disminuir estas citocinas se puede lograr una recuperación.

La presencia de la IL-1 β es un determinante para la recuperación de la enfermedad o para la complicación de esta, ya que en el grupo 1 aumenta durante la enfermedad y disminuye tras esta.

Una producción sostenida de IFN y TNF por parte de las células T, provoca activación de los macrófagos, los cuales liberan de IL-1 β , volviéndose un ciclo constante de liberación de citocinas pro-inflamatorias que pueden causar un desenlace fatal al paciente,

De la misma manera, IL-17 es un importante marcador de mal pronóstico de la enfermedad, al estar relacionada con la IL-1 β , y favorecer la expresión de esta citocina.

En la primera fase de la enfermedad hay un predominio de la respuesta Th1, al ver como la IL-4 se encuentra disminuida durante la fase activa de la enfermedad.

Durante el curso de la enfermedad hay una liberación exacerbada de citocinas pro-inflamatorias, en donde posibles vías de regulación de la carga viral como el IFN son bloqueadas.

En los casos de neumonía por SARS-CoV es importante controlar la producción de citocinas y la respuesta inflamatoria, para evitar una complicación de la enfermedad y con ello un desenlace fatal.

Las principales citocinas por controlar son IL-1 β y TNF- α , al poder mantener estable su producción se podría disminuir los efectos patógenos y de disminución de la oxigenación.

En la etapa posterior al COVID-19 si predomina una respuesta Th1 sobre la Th2, entonces, el resultado es favorable.

REFERENCIAS

1. Wong CK, Lam CWK, Wu AKL, Ip WK, Lee NLS, Chan IHS. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory síndrome. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136(1): 95, 102.
2. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections; causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2017; 39(5):530-532.
3. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q, Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020; 92(4):428.
4. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(5):299.
5. Ryan K, Ray C. *Sherris Microbiología médica.* 5ª Ed. México: McGrawHill; 2011:83
6. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica.* 7ª Ed. España: Elsevier; 2013:393.
7. Payne S. *Viruses from understanding to investigation.* 1ª Ed. Texas USA: Academic Press; 2017:1.
8. Herrero L. Viruses, definitions and reality. *Rev Biol Trop.* 2011; 53(3):994.
9. Maier H, Bickerton E. *Coronaviruses Methods and Protocols.* 1ª Ed. New York USA: Springer; 2015: 1,4.
10. Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kandi V. Severe acute respiratory síndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An update. *Cureus.* 2020; 12(3): 3-9.
11. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronaviruses from animals in southern China. *Science.* 2003; 302(5643): 276.
12. Meyer B, Müller M, Corman V, Reusken C, Ritz D. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(4):552.
13. Maguiña C, Gastelo R. El nuevo coronavirus y la pandemia del COVID-19. *Rev Medica Hered.* 2020; 31(2):125.
14. Diaz F, Toro A. SARS-CoV-2 / COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Med Lab.* 2020; 24 (3): 184.

15. Pastrian B. Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. *Int J Odontostomatol.* 2020; 2014(3):333.
16. Beniac DR, Andanov A, Grudeski E, Booth TF. Architecture of the SARS coronavirus perfusión spike. *Nat Struct Biol.* 2006; 13(8): 751.
17. Olivia J. SARS-Cov-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta.* 2020; 3(2): 3-4
18. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbut K, Gosselin M. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin 1 to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2020; 87(5):7.
19. Soler M, Lloveras J, Batlle D. Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. *Med Clin.* 2008; 131(6): 230.
20. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021; 54(2) 160.
21. Baranov PV, Henderson CM, Anderson CB, Gasteland RF, Atkins JF, Howard MT. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-Cov genoma. *Virology.* 2005; 332(2):300.
22. Chen Y, Lui Q, Guo D. Emmerging coronaviruses: Genome structure replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020; 92(4): 419.
23. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ. The origin, transmisión and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* 2020; 7(1):4.
24. Intervención del Director General de la OMS en la conferencia de prensa sobre el 2019-nCoV del 11 de febrero de 2020 [Internet]. *Who.int.* [citado 2022 septiembre 8]. Disponible en: <https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.
25. Aguilar NE, Hernández AA, Ibanez C. Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión. *Rev Laninoam Infect Pedía.* 2020; 33(3): 144-145.

26. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN. Aerosol and Surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Eng J Med.* 2020, 328(16):1564.
27. Patel KP, Vunnam SR, Patel PA, Krill KL, Korbitz PM, Gallagher JP. Transmission of SARS-CoV-2: an update of current literatura. *Euv J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39 (11):2008.
28. Xu XW, Wu XX, Jiang XG, Xu KJ, Ying LJ, Ma CL. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ.* 2020; 368:1.
29. López G, Ramírez M. Participantes de la respuesta inmunológica ante la infección por SARS-CoV-2. *Pediatric* 2020; 29 (1):6.
30. Tamay de Dios L, Ibarra C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discap.* 2013; 2(2):71.
31. Salazar A, Rodríguez A, Armendaríz J. *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* México: McGrawHill; 2013:149-150,156.
32. Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Zambon M. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR [Internet]. *Who.int.*2020 [Citado 3 marzo 2022]. Available from: http://www.int/docs/default-source/coonaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527es122341d99287a1b17c111902.pdf?sfurns=d381fc88_2
33. Vega G. La respuesta inmune. *Rev Fac Med UNAM* 2008; 51(3):128.
34. Puig N. El sistema inmunológico. Nociones básicas de mecanismos de defensa. *Rev Arg Anest.* 2002; 60(6): 346.
35. Prieto A, Barbarroja E, Haro G. Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine.* 2017; 12(24):1404.
36. Martínez M. Dinámica de la diferenciación de células Th: modelación con redes booleanas. UNAM: Departamento de matemáticas de la facultad de ciencias; 2011:9.
37. Martínez I, Avilés A, Nava H, Ramos M, Carvajal G, Zamudio P, Parra E. Alteración en la actividad inflamatoria regulada por Th1-Th2 en asma. *Rev Inst Nal Enf Res Mex.* 2006; 19(2):137-138.
38. Zhu J, Paul WE. CD4 cell: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; 112(5):1559.

39. Chen J, Lau YF, Lamirande WE. Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4+ T cell are important in control of SARS-CoV infection: *Journal virology* 2010; 84(3):1290.
40. Fara A, Mitrev Z, Rosalía R, Assas B. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. *Open Biol.* 2020; 10(9):2.
41. Mangalmurti N, Hunter CA. Cytokine storms: Understanding COVID-19. *Inmunity.* 2020; 53(1):19.
42. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Inmunología de Kuby.* 6ª Ed. México: McGrawHill; 2007:303.
43. García A. Revisión narrativa sobre la respuesta inmunitaria frente a coronavirus: descripción general aplicabilidad para SARS-CoV-2 e implicaciones terapéuticas. *An pediatric (Engl Ed).*2020; 95(1):60.
44. Harrison A, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020; 41(12):1110.
45. Kan FK, Tan CC. Dengue infection complicated by hemophagocytic lymphohistiocytosis: Experiences from 180 patients with severe dengue. *Clin Infect Dis.* 2020; 70(11):2253.
46. Mehta P, Mc Auley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020; 395(10229):1033.
47. Rokni M, Ghasemani V, Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. *Rev Med Virol.* 2020; 30(3):2111.
48. Chen G, Zhao J. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020; 130(5): 2620-2621.
49. Qiagen. RNeasy Mini Handbook. 2019: 64-65.
50. Van Dongen JJM, Langerak AW. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17(12):2302.

51. Qiagen. HotStarTaq PCR Handbook. 2010:15-16.
52. AmpliSize Molecular Ruler 50-2000 pb Ladder. Bio Rad
53. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role of monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(6):355.
54. Espinosa F. Inmunopatología de la infección por el virus SARS-CoV-2. *Acta Pediatric Mex.* 2020; 41(1): 545.
55. Shi Y, Wang Y, Shao C, Huang J, Gran J, Huang X. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ.* 2020; 27(5):1451.

Figuras.

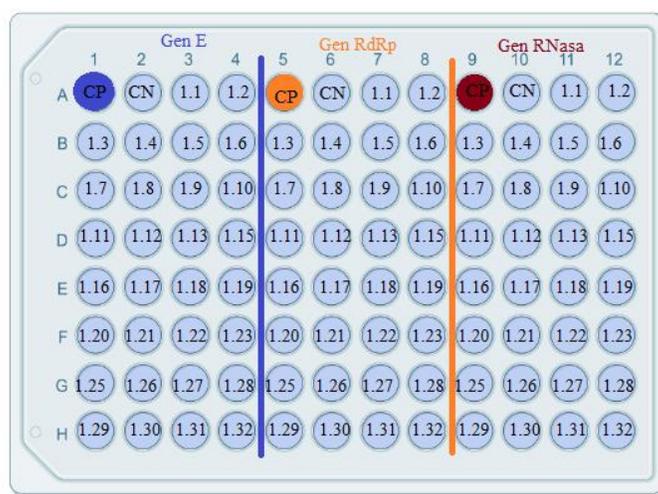
1. Adaptado de: Sanz J, Gómez A, Martín R. Papel del Sistema inmune en la infección por el SARS-CoV-2: inmunopatología de la COVID-19. *Med* 2021;13 (33): 1920.
2. Adaptado de: Adedokun KA, Olarinmoye AO, Mustapha JO, Kamorudeen RT. A close look at the biology of SARS-CoV-2, and the potential influence of weather conditions and seasons on COVID-19 case spread. *Infect Dis Poverty.* 2020;9(1):77

ANEXOS

Cuadro 11. RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de hisopados nasofaríngeos.

Paso	Temperatura	Tiempo
RT	55°C	15 min
Desnaturalización	95°C	3 min
Ciclado (45 ciclos)	55°C	15 s
	58°C	1 min

Figura 4. Posiciones de las muestras en la placa para determinación de SARS-CoV-2 por RT-PCR



CP: control positivo, CN: control negativo. *Se repitió el mismo proceso, para los demás grupos

Cuadro 12. Primers usados para evaluar la calidad del material genético.

Nombre	Primer F	Primer R	Tamaño (pb)
AF4/FMR2	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	CATCCATGGGCCGGACATAA	600
AF4/FMR2	CCGCAGCAAGCAACGAACC	GTCTTCCTCTGGCGGCTCC	400
ZBTB16	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC	300
RAG1	TGTTGACTCGATCCACCCCA	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	200

Cuadro 13. Programa PCR punto final para evaluación del material genético.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	5 min
Ciclado (45 ciclos)	95°C	1 min
	60°C	1 min
	72°C	1 min
Extensión	72°C	5 min

Figura 5. Posiciones en la placa para evaluación del material genético obtenido, a través de PCR en punto final.

