



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL GENERAL REGIONAL No. 1 " Dr. CARLOS MACGREGOR  
SÁNCHEZ NAVARRO"**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN TROMBOSIS, HEMOSTASIA Y  
ATEROGENESIS**

**TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA  
EN PACIENTES RECUPERADOS DE COVID-19: UNA  
SECUELA A LARGO PLAZO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**P R E S E N T A:**

**RESÉNDIZ VÁZQUEZ JENNIFER**



**JURADO DEL EXAMEN  
DIRECTOR: DR. JOSÉ ANTONIO ALVARADO MORENO  
ASESORA: DRA. ADRIANA HERNÁNDEZ REYES  
ASESOR: Q.F.B. GILDARDO HERRERA QUIROZ  
SINODAL: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE  
SINODAL: Q.F.B. PABLO JUAREZ DE LOS SANTOS**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**MARZO 2025**



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.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecerle al Dr. Antonio Alvarado Moreno por aceptarme dentro de su equipo de trabajo. Le agradezco las herramientas y todo el aprendizaje que compartió conmigo, y por contagiarme su pasión por las células endoteliales, nunca imagine que unas células pudieran gustarme tanto.

Al Dr. Abraham Majluf y al Dr. Víctor Domínguez por enseñarme el impacto y la importancia que tiene la investigación en la vida de las personas.

A mis compañeros Fer y Eduardo por hacer más divertido el laboratorio. A Nicole y Daniel por sus consejos, apoyo y amistad.

A la Dra. Antonieta Chávez González por el apoyo proporcionado en esta investigación y ser una fuente de inspiración de la profesionista que me gustaría ser. A su equipo de trabajo Elenka y Sergio por el tiempo que dedicaron a enseñarme. A Yami por haberme compartido esta oportunidad.

Estoy muy agradecida con mis asesores y sinodales: Dra. Adriana Hernández Reyes, Q.F.B. Gildardo Herrera Quiroz, Dra. Raquel Retana Ugalde y Q.F.B. Pablo Juárez De Los Santos por el tiempo que dedicaron a revisar este trabajo y sus recomendaciones.

Le agradezco a la FES Zaragoza por haberme permitido formarme en ella. Gracias por los buenos profesores y por darme a mis dos grandes grupos de amigos.

A mis amigos: Jessy, Diana, Ana, Hannia, Rebe, Ame, Yun, Karen, Félix, Lalo y Julio por ser un apoyo tan importante, por los momentos de estudio y de risas. Me siento muy feliz de seguir creciendo con ustedes.

A mi familia, sobre todo a mis padres, que siempre me han apoyado y que representan una fuerte motivación en mi vida.

Finalmente, mi más grande agradecimiento a las personas que amablemente donaron muestras para la realización de esta investigación.

## **Dedicatoria**

Le dedico este trabajo a mi padre Miguel Ángel Reséndiz Alvarado y a mi madre Carol Vázquez González que nos han impulsado y dado las herramientas a mis hermanas y a mí para trabajar por lo que queremos.

A mis hermanas Ximena y Fátima por su apoyo.

A mi tío Leopoldo que siempre me motivaba a mejorar.

A mis gatitos, sobre todo a Pichu, por ser mis compañeros incondicionales y alegrarme día con día.

## Índice de contenido

Índice de figuras .....	1
Índice de tablas .....	2
Abreviaturas .....	3
Resumen .....	5
Introducción.....	7
Marco teórico.....	9
El endotelio .....	9
La disfunción endotelial .....	17
La trombosis .....	21
El SARS-CoV-2 y su efecto en el endotelio vascular.....	24
Las células formadoras de colonias endoteliales (CFCEs).....	32
Planteamiento del problema.....	34
Pregunta de investigación .....	35
Objetivos .....	35
Método .....	36
Población de estudio .....	36
Técnicas, materiales o instrumentos .....	37
Variables.....	38
Hipótesis.....	39
Tipo de estudio .....	39
Procedimiento.....	39
Análisis estadístico .....	39
Resultados .....	40
Datos demográficos.....	40
Características del cultivo celular de las CFCEs .....	47
Discusión de resultados .....	52
Conclusiones.....	62
Perspectivas.....	62
Referencias .....	62
Anexos .....	70
Anexo 1 .....	70
Productos académicos .....	71

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Funciones del endotelio.....	12
<b>Figura 2.</b> Formación de los vasos sanguíneos. ....	13
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de disfunción endotelial. ....	19
<b>Figura 4.</b> Fenotipo del endotelio sano y disfuncional.....	21
<b>Figura 5.</b> Fisiopatología del COVID prolongado. ....	30
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de reparación de las CFCEs. ....	34
<b>Figura 7.</b> La TVP por COVID prolongado es indistinta en los hombres y mujeres	41
<b>Figura 8.</b> La prevalencia de TVP es en promedio a los 34 años .....	42
<b>Figura 9.</b> La TVP como secuela del COVID-19 a largo plazo es la más frecuente .....	43
<b>Figura 10.</b> Los pacientes de COVID-19 persistente tienen como secuela al menos un evento de TVP.....	44
<b>Figura 11.</b> La TVP por COVID-19 prolongado se presenta aproximadamente meses después de la recuperación de la enfermedad. ....	45
<b>Figura 12.</b> Diferencias entre colonias y clústeres conformados por CFCEs .....	48
<b>Figura 13.</b> Las colonias de las CFCEs predominaron en los cultivos de los pacientes con TVP por COVID-19 prolongado .....	48
<b>Figura 14.</b> La senescencia celular es más frecuente en los pacientes con TVP por COVID-19 prolongado.....	49
<b>Figura 15.</b> La capacidad proliferativa de las CFCEs no se mantiene a largo plazo en los pacientes con TVP por COVID-19 prolongado .....	50
<b>Figura 16.</b> La frecuencia de colonias de CFCEs en pacientes con TVP post COVID- 19 es similar a la de los controles. ....	51
<b>Figura 17.</b> La presencia de las colonias de CFCEs de los pacientes con TVP post COVID-19 es semejante a la de los controles.....	52

## **Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Moléculas implicadas en la angiogénesis .....	15
<b>Tabla 2.</b> Número de dosis aplicadas de vacunas contra el SARS-CoV-2 en hombres y mujeres.....	45
<b>Tabla 3.</b> Laboratorios clínicos .....	46

## Abreviaturas

<b>ADMA</b> = dimetilarginina asimétrica	<b>FT</b> =Factor tisular
<b>ADP</b> =Adenosín trifosfato	<b>FvW</b> =Factor de von Willebrand
<b>ADN</b> =Ácido desoxirribonucleico	<b>g</b> =gramos
<b>Ang</b> =Angiopoyetina	<b>GP</b> =Glicoproteína
<b>ARN</b> = Ácido ribonucleico	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> =Peróxido de hidrogeno
<b>ARNm</b> = ARN mensajero	<b>HDL</b> =Lipoproteína de alta densidad
<b>AT-III</b> =Antitrombina-III	<b>HIF-1 α</b> = Factor inducible por hipoxia alfa
<b>ATP</b> = Adenosín trifosfato	<b>IAM</b> = Infarto agudo al miocardio
<b>BH<sub>4</sub></b> =Tetrahidrobiopterina	<b>ICAM-1(CD54)</b> = Molécula de adhesión intercelular 1
<b>CEs</b> =Células endoteliales	<b>IGFBP</b> =Proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina
<b>CCDC</b> = Centro Chino para la Prevención y Control de Enfermedades	<b>IL</b> =Interleucina
<b>CFCEs</b> = Células formadoras de colonias endoteliales	<b>INR</b> = Índice Internacional Normalizado
<b>CMN</b> = Células mononucleares	<b>LDL</b> =Lipoproteína de baja densidad
<b>COVID 19</b> =Enfermedad por coronavirus	<b>MAC</b> = Células angiogénicas mieloides
<b>COX</b> = Ciclooxygenasa	<b>MCH</b> =Hemoglobina corpuscular media
<b>CPE</b> = Células progenitoras endoteliales	<b>MCP</b> = Factor quimioatrayente de monocitos
<b>CXCL4</b> =Factor plaquetario 4	<b>MCV</b> =Volumen corpuscular medio
<b>DE</b> =Desviación estándar	<b>MHRA</b> = Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>dL</b> =Decilitros	<b>mL</b> =Mililitros
<b>EBM-2</b> = Medio de cultivo para células endoteliales con factores de crecimiento	<b>μL</b> =Microlitros
<b>ECA</b> = Enzima convertidora de angiotensina	<b>μm</b> =Micrómetros
<b>EGM-2</b> = Medio de cultivo basal para células endoteliales	<b>MMP</b> =Metaloproteinasas de matriz
<b>eNOS</b> =Enzima óxido nítrico sintetasa endotelial	<b>MPV</b> =Volumen plaquetario medio
<b>E-NTPDasas</b> =Enzima ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1	<b>NAPDH</b> =Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>EP</b> =Embolia pulmonar	<b>NO</b> = Óxido nítrico
<b>ET-1</b> = Endotelina-1	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> = Anión superóxido
<b>FIIa</b> = Trombina	<b>OH<sup>•</sup></b> =Radicales hidroxilos
<b>FV</b> =Factor V	<b>OMS</b> = Organización mundial de la salud
<b>FVII</b> =Factor VII	<b>ONOO<sup>-</sup></b> = Peroxinitrito
<b>FVIII</b> =Factor VII	<b>OVCR</b> =Oclusión de la vena central de la retina
<b>FX</b> = Factor X	<b>PASC</b> = Secuelas post-agudas de COVID-19
<b>FGF</b> =Factor de crecimiento de fibroblastos	

**PBS**=Solución salina tamponada con fosfato  
**PCR**=Proteína C reactiva  
**PDGF**=Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**PECAM-1 (CD31)** = Molécula de adhesión endotelial-plaquetaria  
**PF4**= Factor plaquetario 4  
**PGI2**=Prostaciclina  
**PIGF**=Factor de crecimiento placentario  
**RDW-CV**=Ancho de distribución de glóbulos rojos-desviación estándar  
**rpm**=Revoluciones por minuto  
**ROS**= Especies reactivas de oxígeno  
**RT-PCR**= Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa  
  
**SARS-CoV-2**= Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo  
**SFB**=Suero fetal bovino  
**SP**= Sangre periférica  
**SPSS**=Statistical Package for Social Sciences  
**TA**=Trombosis arterial  
**TEV**=Tromboembolia venosa  
**TFPI**= Inhibidor de la vía del factor tisular  
**TGF- $\beta$** = Factor de crecimiento transformante beta  
**TIE-2**= Receptor de angiopoyetina  
**TM**=Trombomodulina  
**TMPRSS2**= Proteasa transmembrana de serina 2  
**TNF- $\alpha$** = Factor de necrosis tumoral alfa  
**TP**=Tiempo de protrombina  
**t-PA**= Activador tisular del plasminógeno  
**TTPa**=Tiempo de tromboplastina parcial activado

**TTIV**= Trombocitopenia trombótica inmunitaria inducida por la vacuna  
**TVP**= Trombosis venosa profunda  
**TVP-post COVID-19**= Trombosis venosa profunda después de COVID-19  
**TXA2**=Tromboxano A2  
**VCAM-1 (CD106)** = molécula de adhesión celular vascular 1  
**UI**=unidades internacionales  
**VE**=Vesículas extracelulares  
**VEGF**=Factor de crecimiento vascular endotelial  
**VEGFR-1**= Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1  
**VLDL**=Lipoproteína de muy baja densidad  
**VSG**= Volumen de sedimentación globular

## Resumen

**Antecedentes.** Las personas que se recuperan de COVID-19 (enfermedad por coronavirus) tienen el riesgo de padecer COVID-19 persistente, una enfermedad en la que persisten o se desarrollan nuevos síntomas tras la infección por el virus. La trombosis es una de las posibles secuelas a largo plazo más graves de la enfermedad ya que el SARS-CoV-2 lesiona a las células endoteliales.

**Objetivo.** Determinar la capacidad proliferativa de las células formadoras de colonias endoteliales (CFCEs) de sujetos que presentaron un evento de trombosis después de la recuperación de COVID-19.

**Materiales y métodos.** Se realizó un estudio observacional, retrospectivo parcial, transversal y comparativo. Se incluyeron personas de 18 a 50 años, que sin aparentes factores de riesgo (tabaquismo, diabetes, obesidad, hipertensión, etc.) desarrollaron al menos un primer evento trombótico después de enfermarse por COVID-19. A cada sujeto de estudio se les tomó una muestra de sangre periférica para el cultivo celular de las CFCEs y se les realizó una entrevista con el fin de recabar datos demográficos. Para determinar si existen diferencias en el fenotipo de las CFCEs de los sujetos con Trombosis-post COVID-19, los resultados se compararon con controles y con sujetos con trombosis recurrente antes de la llegada del virus. Los datos demográficos de los pacientes se compararon entre sexos.

**Resultados.** El estudio se realizó en 29 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales el 55.2% fueron hombres y el 44.8% mujeres. En ambos sexos la media de edad fue de 34 años y el tipo de trombosis más común fue la TVP (trombosis venosa profunda) con un solo evento. El tiempo en el que se desarrolló la trombosis después de la infección por COVID-19 para ambos sexos fue de 15 meses. De los datos demográficos que se recabaron no se encontró diferencias entre hombres y mujeres. Con respecto al aislamiento de CFCEs, en más del 50% de los cultivos celulares tanto de hombres como mujeres se identificaron CFCEs,

sin embargo, la mayoría de las colonias tenían una proliferación baja. La mediana de colonias detectadas fue de 1 con un tiempo promedio de detección de 17 días, estos últimos datos fueron similares con datos de controles, pero diferentes a los sujetos con trombosis recurrente antes del COVID-19.

## Introducción

A finales de diciembre de 2019, en la Ciudad de Wuhan China, se presentaron casos de neumonía identificados el 7 de enero de 2020, en muestras de garganta por el Centro Chino para la Prevención y Control de Enfermedades (por sus siglas en inglés CCDC) y nombrado como Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (por sus siglas en inglés, SARS-CoV-2) (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) nombró la enfermedad que esta situación genera, como COVID-19 y el 30 de enero de 2020, definió a la epidemia China del COVID-19 como una Emergencia de Salud Pública de Carácter Internacional, considerando un alto riesgo a los países con sistemas de salud vulnerables (2). Este nuevo virus ha infectado a más individuos y provocado más muertes en el mundo que sus predecesores. Los rangos de edad de pacientes infectados y de muertes oscila entre 20 y 80 años (3). Lo que ha representado un enorme reto para los sistemas de salud desde que se reportaron los primeros casos y actualmente, después de haberse declarado el fin de la pandemia, el COVID-19 sigue generando un enorme impacto debido a las secuelas a largo plazo en la salud de la población. La mayoría de las personas infectadas por COVID-19 tienen síntomas leves y se recuperan completamente, pero, según la OMS alrededor del 10% y 20 % de la población experimenta síntomas persistentes o nuevos aún después de recuperarse de la enfermedad, esta nueva afección se denomina COVID-19 prolongado (4). Los síntomas más comunes del COVID-19 prolongado son la fatiga, disfunción cognitiva, dificultades respiratorias y en casos más graves la trombosis (5).

La trombosis siempre ha representado una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad en el mundo, es una enfermedad de origen multifactorial y recientemente se ha documentado que el COVID-19 es un factor de riesgo para la trombosis. Este mayor riesgo se intenta explicar mediante varios mecanismos del virus sobre el sistema de la coagulación, en especial, se consideran las afectaciones en los vasos sanguíneos, conformados por las células endoteliales, donde promueve la disfunción endotelial (6) .

Las células endoteliales tienen un rol importante en el desarrollo de la trombosis, ya que, regulan la hemostasia. En condiciones fisiológicas, el endotelio sintetiza varias

moléculas como el óxido nítrico (NO) que previenen la formación de trombos, sin embargo, ante la lesión de un vaso sanguíneo las células endoteliales se activan adquiriendo un estado protrombótico como un mecanismo protector que evita la pérdida de sangre (7). Cuando existe disfunción endotelial, las células endoteliales se activan de manera exagerada y desregulada lo que favorece la formación de coágulos patológicos. La infección por SARS-CoV-2 genera una serie de estímulos inflamatorios que lesionan a los vasos sanguíneos, con la subsecuente disfunción endotelial (6). Como las células endoteliales, son una de las principales poblaciones celulares perjudicadas por el COVID-19, es importante evaluar el impacto del virus sobre el fenotipo endotelial para detectar alteraciones en pacientes con trombosis tras la infección.

Las CFCEs definidas como las verdaderas células endoteliales por su alto potencial proliferativo y capacidad angiogénica, son movilizadas a los sitios de daño endotelial para participar en la reparación vascular (8,9). Las CFCEs se han utilizado como biomarcadores y modelos de estudio para la disfunción endotelial, ya que las características morfológicas y funcionales de los cultivos reflejan el estado de las células endoteliales *in vivo* (10). Por lo tanto, en este proyecto, se evaluó la morfología, proliferación y cantidad de las CFCEs en pacientes con trombosis post COVID-19 comparado con un grupo control y un grupo de sujetos con trombosis recurrente antes de la llegada del virus. El estudio de estos parámetros podrá conducir a un mejor entendimiento del efecto del SARS-CoV-2 en el endotelio vascular y en estudios posteriores, determinar mecanismos moleculares que podrían estar modificados por su presencia.

## Marco teórico

### El endotelio

El endotelio está conformado por una monocapa de células muy dinámicas que se encuentran recubriendo la superficie interna de los vasos sanguíneos como capilares, arterias y venas. La mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo están irrigados, por lo que las células endoteliales (CEs) ocupan una gran extensión con un peso aproximado de 1 kg y una superficie total de 4,000 a 7,000 m<sup>2</sup> en personas de tamaño promedio (11,12).

Las CEs tienen forma aplanada, delgada y se disponen como adoquines con un largo promedio de 30 a 50 μm, un ancho de 10 a 30 μm y un grosor de 0.1 a 10 μm (11,13). De igual forma, dependiendo del órgano las CEs muestran características fenotípicas diferentes que garantizan una adecuada homeostasis ante las diversas necesidades locales de las células (14). Además, la glucólisis es la principal fuente de ATP (adenosín trifosfato) para el endotelio (15,16).

### Funciones del endotelio

Inicialmente se pensaba que la función del endotelio era ser solamente una barrera entre la sangre y las células de los tejidos, sin embargo, con el tiempo se ha demostrado que las CEs son mucho más complejas porque están involucradas en la regulación del flujo sanguíneo, el tono vascular, la coagulación, las respuestas inflamatorias y la formación de nuevos vasos sanguíneos (**figura 1**). Las CEs son capaces de realizar todas estas funciones porque tienen una amplia gama de receptores que responden a diferentes estímulos como metabolitos, proteínas, lípidos u hormonas y, además tienen una parte efectora, es decir, constantemente sintetizan y liberan moléculas (14,17).

- a. **Regulación del tono vascular.** Las CEs sintetizan vasodilatadores y vasoconstrictores que modulan el tono vascular. El más potente de los vasodilatadores generados por las CEs es el óxido nítrico (NO), sintetizado a partir de la L-arginina y el cofactor NADPH (Nicotinamida adenina

dinucleótido fosfato) por la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). El NO al ser un gas difunde fácilmente hacia las células musculares lisas donde también aumenta la vasodilatación. La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) es otro vasodilatador sintetizado por el endotelio y esta deriva de la acción de las enzimas ciclooxigenas 1 y 2 sobre el ácido araquidónico (11,12). Las CEs sanas liberan grandes cantidades de NO y PGI<sub>2</sub>.

Los vasoconstrictores que produce el endotelio son la endotelina-1 (ET-1), prostaglandina H<sub>2</sub> y el tromboxano A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>). El endotelio también expresa dos enzimas importantes en la regulación del tono vascular, la primera es la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que interviene en el sistema renina-angiotensina y la ECA<sub>2</sub> que produce angiotensina (1-7), un vasodilatador y antiinflamatorio (11,13).

b. **Función inflamatoria.** Las CEs participan en la coordinación de la respuesta inmunitaria a través de diferentes mecanismos como la secreción de quimiocinas, interleucinas, interferones o factores de crecimiento. Además, están involucradas en el reclutamiento y extravasación de leucocitos a los sitios de daño por la expresión de moléculas de adhesión (13) .

c. **Función en la hemostasia.** Las CEs participan en la hemostasia al mantener la sangre líquida y sin coágulos, por medio de la formación de una capa compuesta de moléculas antitrombóticas y fibrinolíticas que impiden o regulan el proceso de la coagulación bajo condiciones normales (11).

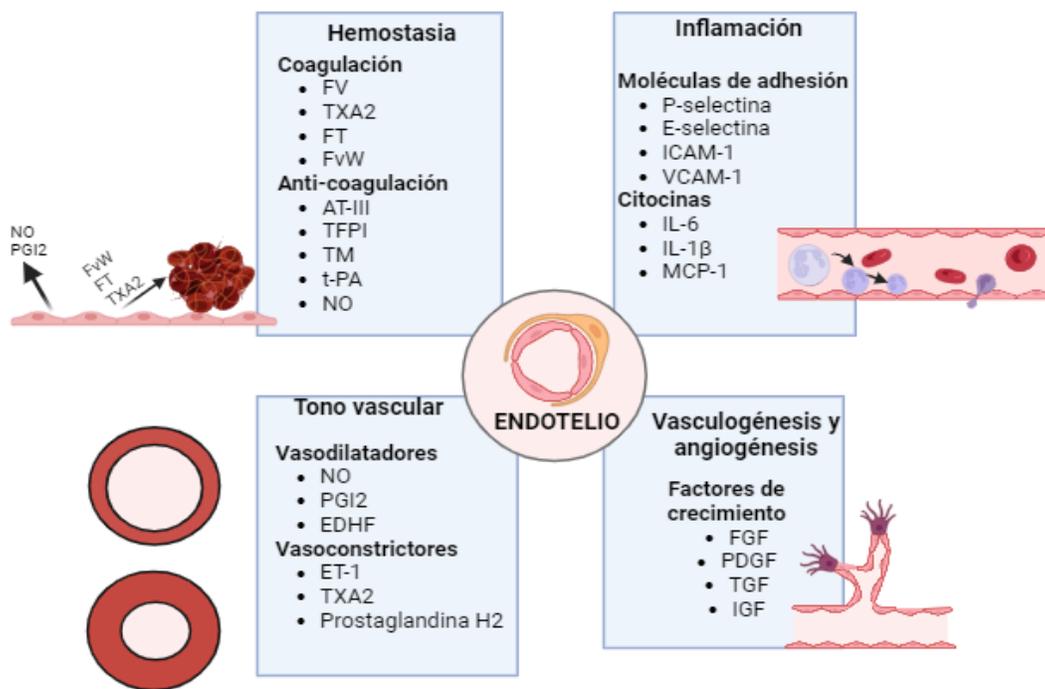
El NO generado por el endotelio actúa como inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria y la PGI<sub>2</sub> impide la activación plaquetaria al inhibir al TXA<sub>2</sub> (11,12).

El ATP y el ADP (adenosín difosfato), dos moléculas que favorecen la activación de las plaquetas son liberadas por estas y por el endotelio cuando existe daño vascular, sin embargo, este efecto protrombótico se ve controlado por la expresión de la enzima ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa-1 (E-NTPDasas) en la superficie endotelial que transforma el ATP y ADP en adenosina (12).

El factor tisular (FT) es expresado por las plaquetas y el endotelio, se encarga de iniciar la vía extrínseca de la coagulación, las CEs limitan su acción porque expresan el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (12).

La trombina es una proteína encargada de producir fibrina a partir del fibrinógeno para generar un coágulo estable. El endotelio tiene diversos mecanismos que impiden su acción. La antitrombina (AT-III) es una proteína generada en el hígado que se une a la trombina y evita su función. Para que la ATIII pueda actuar tiene que unirse a los proteoglicanos de heparán sulfato ubicados en la superficie endotelial (12).

La trombomodulina (TM) es un receptor transmembranal sintetizado constitutivamente por el endotelio y que se une a la trombina reduciendo su concentración. El complejo trombina-trombomodulina a su vez activa a la proteína C que activa a la proteína S inhibiendo los FVa (factor V activado) y FVIIIa (factor VIII activado) (18,19). El endotelio produce el activador tisular del plasminógeno (t-PA) que convierte al plasminógeno derivado del hígado en plasmina, una enzima encargada de degradar a la fibrina (12).



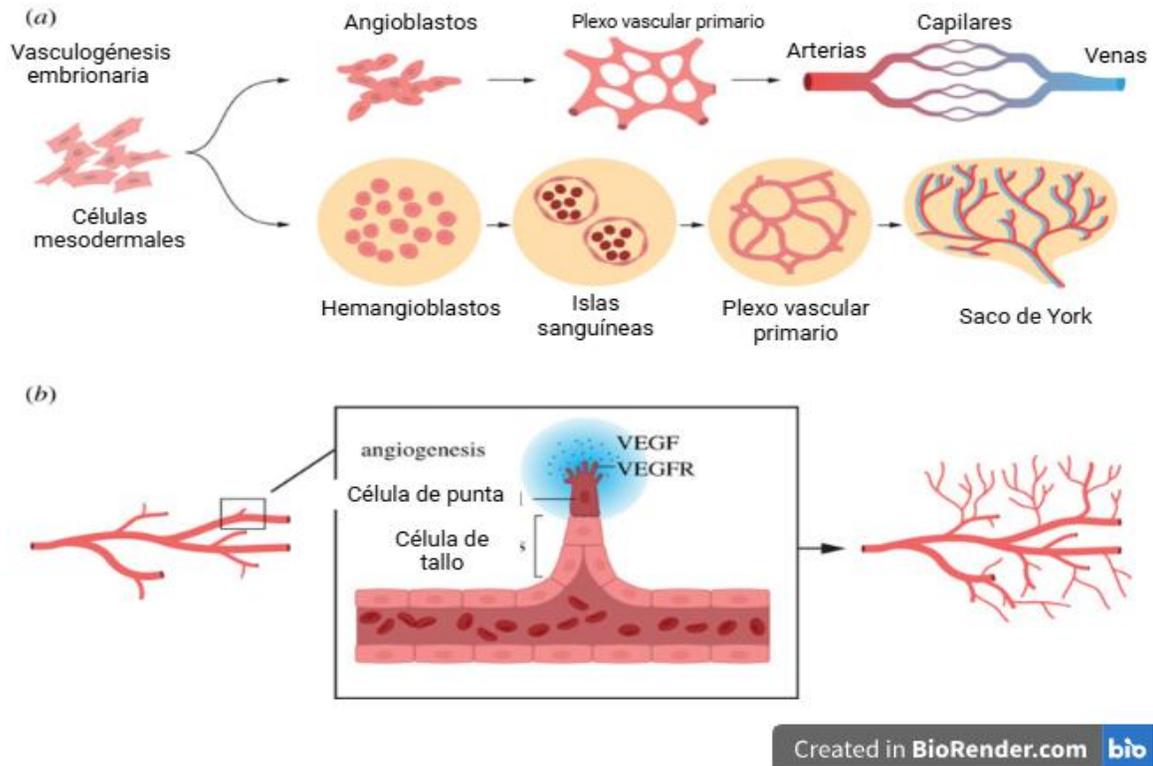
Created in BioRender.com

**Figura 1. Funciones del endotelio.** Las CEs sintetizan varias moléculas implicadas en la hemostasia, respuesta inmunitaria, el tono vascular y la formación de vasos sanguíneos. FV: factor V. TXA2: tromboxano A2. FT: factor tisular. FvW: factor de von Willebrand. AT-III: antitrombina III. TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular. TM: trombomodulina. t-PA=activador tisular del plasminógeno. NO: óxido nítrico. ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1. IL-6: interleucina 6. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta, MCP-1: factor quimioatrayente de monocitos 1. PGI2: prostaciclina. ET-1: endotelina 1. EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio. FGF: factor de crecimiento de fibroblastos. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas. TGF: factor de crecimiento transformante. IGF: factor de crecimiento similar a la insulina. Imagen tomada y modificada de Gao J, et al. (20) .Creado en BioRender.com

## Vasculogénesis y angiogénesis

La formación *de novo* de los vasos sanguíneos tiene lugar dentro de las etapas tempranas del desarrollo embrionario en un proceso conocido como **vasculogénesis (figura 2)**. Las células progenitoras endoteliales (angioblastos) se originan de las células del mesodermo y se fusionan formando una red vascular primitiva (plexo primario), posteriormente las CEs son recubiertas por células murales y se diferencian en arterias, venas y capilares, este mecanismo se denomina vasculogénesis embrionaria. Paralelamente, en el saco vitelino ocurre la

vasculogénesis extraembrionaria, en donde nuevamente en el mesodermo se forman unas estructuras conocidas como islas sanguíneas conformadas por hemangioblastos, un tipo de célula que dará origen a las células hematopoyéticas y a las CE. Las CE generan un plexo vascular extraembrionario que producirá la vasculatura en el saco vitelino (18,19) .



**Figura 2. Formación de los vasos sanguíneos.** a) muestra la vasculogénesis embrionaria y extraembrionaria y b) angiogénesis por brote. VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial. VEGFR: Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial. Imagen tomada y modificada de Del Gaudio F, et al (19). Creado en BioRender.com

Posteriormente, los vasos sanguíneos generados durante la vasculogénesis fungirán como los cimientos para la formación de nuevos vasos sanguíneos en un proceso denominado **angiogénesis**. La angiogénesis tiene un papel importante en la remodelación y extensión del sistema vascular en el desarrollo embrionario, y es un mecanismo que continuará en la vida adulta cumpliendo con funciones fisiológicas esenciales como la cicatrización de heridas, la placentación o el ciclo menstrual en mujeres (15,21).

La angiogénesis es un proceso complejo que consta de varios pasos, en primer lugar, ocurre la degradación de la matriz extracelular, seguido de la proliferación y migración de las CEs, la formación de estructuras tubulares (tubulogénesis) y finalmente la estabilización de los vasos sanguíneos por el reclutamiento de células murales o pericitos (22). Las CEs pueden formar nuevos vasos sanguíneos por dos mecanismos importantes: 1) la intususcepción; y 2) el brote de vasos (15).

El **crecimiento intususceptivo** consiste en la división de un capilar en dos vasos adyacentes. En este mecanismo, las paredes opuestas del capilar se proyectan hacia la luz haciendo que las CEs entren en contacto entre sí para formar un pilar endotelial transluminal dentro de un vaso sanguíneo, que progresivamente se va perforando por la remodelación de las uniones intracelulares, dando como resultado dos vasos hijos (23).

En la **angiogénesis por brote (figura 2)**, los nuevos capilares se forman por un brote o una gemación a partir de un vaso preexistente. Durante la angiogénesis por brote, las CEs adquieren roles diferentes según lo cual se les denominará como: célula de punta, célula de tallo y célula de falange. Las CEs de punta se caracterizan por adquirir un fenotipo migratorio (no proliferativo) con la expresión de numerosos filopodios y lamelipodios que les permitirán guiar los nuevos brotes hacia la fuente de los estímulos pro angiogénicos. En cambio, las CEs de tallo vecinas a la célula de punta, tienen un fenotipo proliferativo (no migratorio) con el cual alargan el brote del nuevo vaso. Las células de falange permanecen inactivas definiendo la parte madura del vaso, cumpliendo con el objetivo de brindar una estabilidad y función de barrera (15).

Los factores que inducen y regulan el proceso de la vasculogénesis y la angiogénesis (**tabla 1**) incluyen Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento placentario (PlGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la ciclooxygenasa-2 (COX-2), la endotelina, angiopoyetina 2 (Ang-2) y el factor Inducible por Hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) (24).

**Tabla 1.** Moléculas implicadas en la angiogénesis

<b>Nombre</b>	<b>Función</b>
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Factor que promueve la proliferación, migración y supervivencia de las CEs, así como la permeabilidad vascular. Se une a los receptores VEGFR1 y VEGFR2 que tienen actividad tirosina quinasa (25).
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	El FGF se une a los receptores FGFR con actividad tirosina quinasa que activa vías de señalización que promueven la migración, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células. El FGF1 y el FGF2 tienen como dianas principales a las CEs (26).
Factor de crecimiento placentario (PIGF)	Factor pro-angiogénico que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1 (VEGFR-1) y aumenta los efectos del VEGF. El PIGF promueve el crecimiento de las CEs, la vasculogénesis y el desarrollo de la placenta (27) .
Factor de crecimiento transformante B $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Citocina multifuncional que promueve la supervivencia celular, metabolismo, crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión, migración y muerte (28).
Angiopoyetina (Ang)	Las angiopoyetinas 1 y 2 son los principales factores implicados en la homeostasis vascular. Los receptores de las Ang son proteínas transmembranales denominadas Tie. La activación de Tie-2 media las funciones de las Ang, mientras que Tie-1 modula la actividad de Tie-2.  La Ang-1 estimula la supervivencia de células endoteliales, la maduración y estabilidad vascular. Por otro lado, la Ang-2 tiene funciones pro o anti-

	angiogénicas en diferentes entornos de acuerdo a las concentraciones de VEGF-A. A altas concentraciones promueve la angiogénesis y a baja concentración induce apoptosis (28).
Factor inducible por hipoxia-1	El HIF-1 es un factor de transcripción que regula genes que responden a la hipoxia. Regula la adaptación celular a la hipoxia, la eritropoyesis e interviene en la supervivencia celular, la migración, apoptosis y el metabolismo de la glucosa. Activa la transcripción de genes que codifican para VEGF o las Ang favoreciendo la angiogénesis (28) .

### Tipos de vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos tienen capas de diferente composición y grosor. El endotelio y el tejido conectivo elástico constituyen la túnica íntima, la capa más interna de los vasos sanguíneos. La túnica media está conformada por músculo liso, tejido elástico y conectivo. La capa más externa, es la túnica adventicia está formada por fibras de tejido conectivo y una lámina elástica (29,30).

- a. **Arterias.** Están compuestas por una gruesa capa de músculo liso y gran cantidad de tejido elástico y fibroso. Su función es propulsar y distribuir la sangre desde el corazón a otros tejidos, por lo que también se les conoce como vasos de conducción (29,30).
- b. **Arteriolas.** Es una arteria muy pequeña, tienen una túnica interna delgada y una túnica media formada por una o dos capas de músculo liso. Son conocidos como vasos de resistencia, porque su función es regular el flujo sanguíneo mediante la regulación de la resistencia (oposición al flujo sanguíneo) (29).

- c. **Capilares.** Son los vasos sanguíneos más pequeños y conectan el flujo arterial con el retorno venoso. Sus paredes únicamente están compuestas por una única capa de endotelio y una membrana basal, por lo que permiten el intercambio de sustancias entre la sangre y el líquido intersticial (29).
- d. **Vénulas.** Se encargan de drenar la sangre de los capilares y comienzan el retorno de la sangre al corazón (29,30).
- e. **Venas.** La túnica interna es delgada, y la túnica media tiene poca cantidad de músculo liso y fibras elásticas, pero cuenta con una túnica externa muy gruesa conformada por fibras de colágenas. Se conocen como vasos de capacitancia, porque contienen el mayor volumen de sangre. Se distienden lo suficiente para adaptarse a las variaciones de volumen y presión, pero a diferencia de las arterias no soportan grandes presiones (29).

## **La disfunción endotelial**

El endotelio produce y libera de forma sumamente regulada una gran variedad de moléculas que actúan de manera autocrina, paracrina y endocrina que lo mantienen en un estado “inactivo” o “activo” según lo requiera. En condiciones fisiológicas el endotelio inactivo se caracteriza por un fenotipo antitrombótico, antiinflamatorio, antioxidante y anti proliferativo (7,13). Sin embargo, ante estímulos inflamatorios el endotelio se activa y cambia completamente su fenotipo a uno protrombótico, proinflamatorio, proliferativo y vasoconstrictor como parte de un mecanismo protector. Esta protección fisiológica se pierde cuando la presencia del estímulo estresante es repetitiva y prolongada dando como resultado la disfunción endotelial (31). La disfunción endotelial es la alteración del fenotipo endotelial caracterizado principalmente por una biodisponibilidad reducida de NO, aumento de ROS, aumento de factores protrombóticos, proinflamatorios y un aumento en la vasoconstricción (17,31). Estos cambios en el endotelio contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares y por ende a un mayor riesgo de trombosis (7).

Los factores que causan la disfunción endotelial son numerosos entre los que se puede mencionar la hiperglucemia, la hipertrigliceridemia, altos niveles de LDL (lipoproteína de baja densidad), el síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes, fármacos o infecciones por bacterias, hongos y virus como recientemente el SARS-CoV-2. Aunado a factores de riesgo como el envejecimiento, el tabaquismo, la inactividad física, dietas no saludables, el estrés, falta de sueño o la exposición a contaminantes (7,13). Estos factores según su gravedad o duración propician la disfunción endotelial a través de diferentes mecanismos (32).

### **Mecanismos de disfunción endotelial**

Los mecanismos principales de la disfunción endotelial son el aumento del estrés oxidativo y el aumento de factores inflamatorios (**figura 3**). Estos factores tienen una fuerte relación entre sí, de tal forma, que el aumento de uno potencia al otro, constituyendo un círculo vicioso, en donde la consecuencia principal es la biodisponibilidad reducida del NO (17).

Las CEs en condiciones normales generan bajas concentraciones de ROS como el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o radicales hidroxilos ( $OH^\cdot$ ) que funcionan como segundos mensajeros en las células. Sin embargo, cuando los mecanismos antioxidantes de las células se ven superados por la cantidad de ROS se inicia el proceso de disfunción endotelial (20,33).

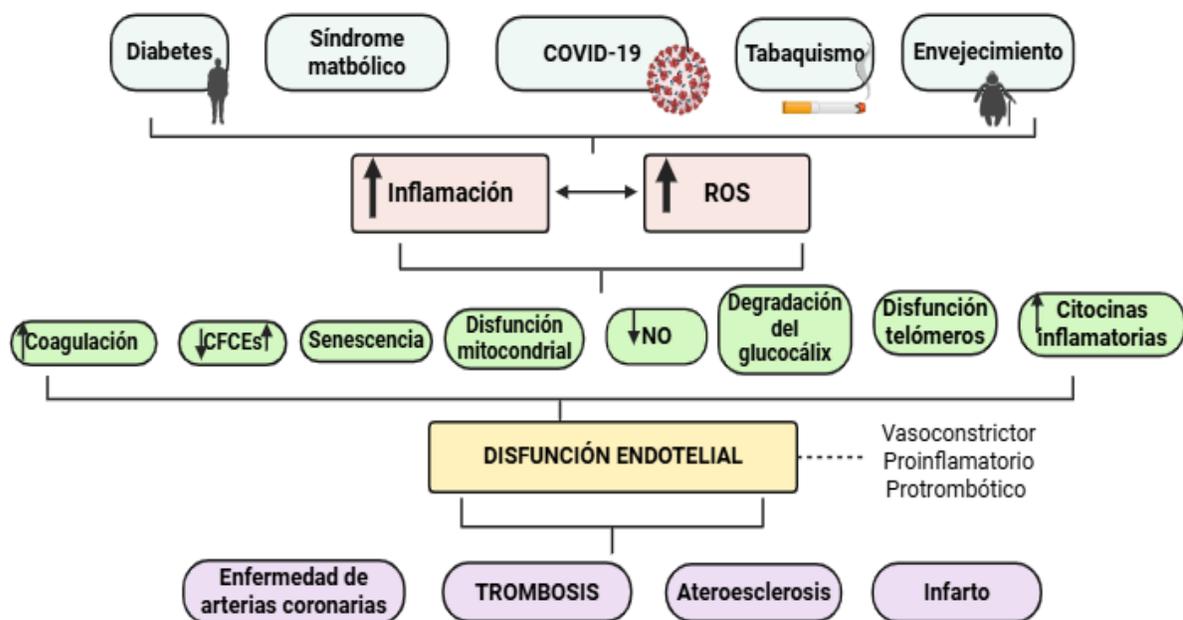
El NO, que es una de las moléculas más esenciales de las CEs es especialmente afectado por el aumento de ROS. El anión  $O_2^-$  reacciona con el NO de las CEs para producir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), una especie reactiva de nitrógeno, esta reacción tiene como consecuencia un aumento en la degradación del NO. Además, los niveles altos de los ROS perjudican a otras moléculas como los lípidos, proteínas y al ADN (ácido desoxirribonucleico) (17,31).

El peroxinitrito también disminuye la producción de NO al oxidar a la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), un cofactor de la enzima eNOS, lo que resulta en su desacoplamiento y en un aumento en las concentraciones de  $O_2^-$  y  $ONOO^\cdot$  lo que perpetúa el estrés oxidativo y el daño en las CEs (20).

La inflamación también tiene un impacto importante en la reducción del NO. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es una citocina inflamatoria que influye en la biodisponibilidad del NO por varios procesos. Se ha observado que el TNF- $\alpha$  desestabiliza el ARNm (ARN mensajero) de la eNOS, lo que lleva a una menor producción de NO. También impide la degradación de ADMA (dimetilarginina asimétrica), un inhibidor endógeno del NO (17,34).

La concentración aumentada de las ROS en las CE también está influenciada positivamente por citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , ya que aceleran la actividad de las enzimas NADPH (NOX) que son fuentes importantes de ROS (34). Las mitocondrias de las CES también se ven afectadas y contribuyen a la disfunción endotelial ya que son la principal fuente de ROS (17).

La activación de estos mecanismos tiene otras consecuencias como la pérdida de antioxidantes, desequilibrio de factores de crecimiento, la reducción de progenitores endoteliales, la disfunción de los telómeros o la senescencia de las CE (7,32).



Created in BioRender.com 

**Figura 3. Mecanismos de disfunción endotelial.** Se muestran los factores que causan disfunción endotelial y su efecto sobre las CE. COVID-19: enfermedad por coronavirus. ROS: especies reactivas de oxígeno. CFCEs: células formadoras de colonias endoteliales. NO: óxido nítrico. Imagen tomada y modificada de Gallo G, et al (7). Creado en BioRender.com

## **Fenotipo del endotelio disfuncional**

La inflamación favorece la expresión de moléculas de adhesión que no se suelen expresar en el endotelio sano, como la E-selectina (CD62e), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1/CD106), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1/CD54) y la molécula de adhesión endotelial-plaquetaria (PECAM-1/CD31) que permiten la extravasación o diapédesis de los leucocitos (**figura 4**). Las CEs disfuncionales también liberan citocinas inflamatorias y quimiocinas que facilitan el reclutamiento de más células inmunitarias como la IL-8 (interleucina 8) o el factor quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y 3 (MCP-3) (13).

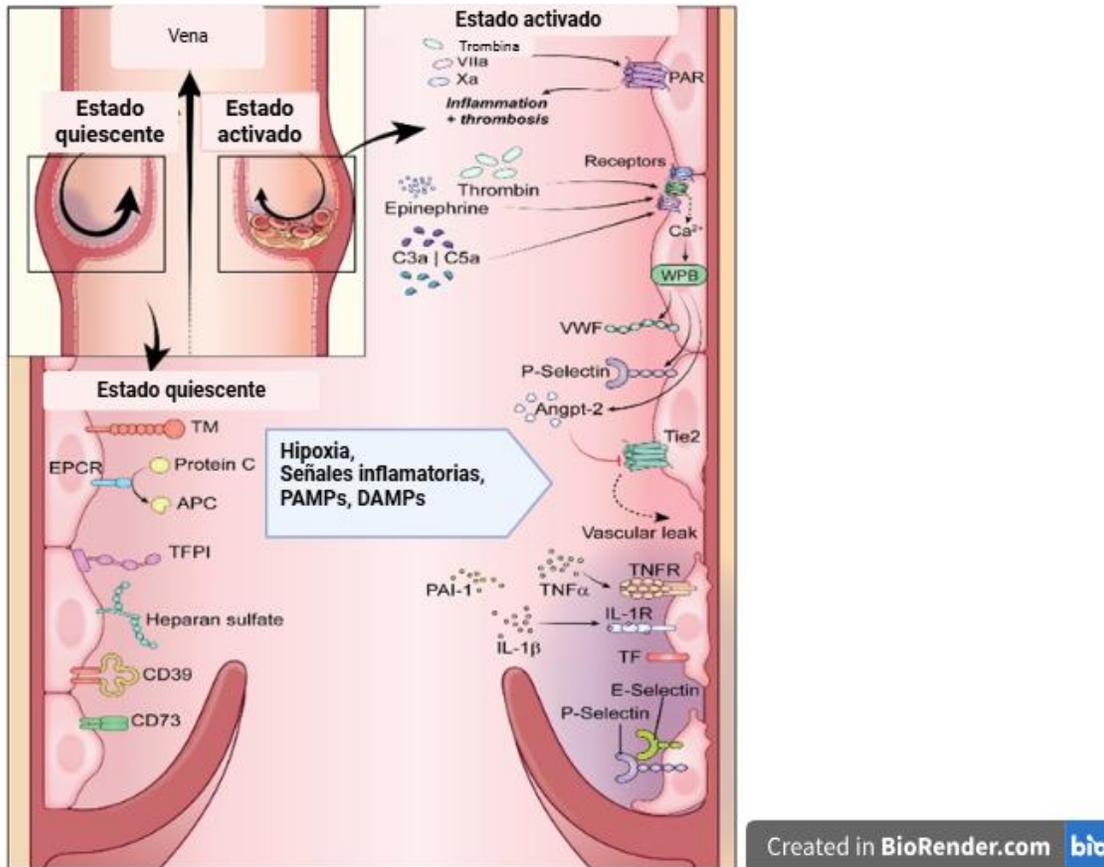
Las uniones que regulan la función de barrera del endotelio sano también son perjudicadas por mediadores inflamatorios que las desensamblan, lo que aumenta la permeabilidad celular y la entrada de leucocitos y otras moléculas (13).

Los niveles reducidos de vasodilatadores y de antitrombóticos como la PGI<sub>2</sub> y el NO del endotelio disfuncional permiten la vasoconstricción y la activación de las plaquetas con la consecuente formación de trombos.

El estado inflamatorio al mismo tiempo induce la coagulación al liberar el factor de von Willebrand (FvW) y P-selectina contenidos en los cuerpos de Weibel Palade (WPB) de las CEs y las plaquetas, lo que aumenta más la adhesión plaquetaria (13,35).

Además, las CEs disfuncionales expresan FT que activa al factor VII de la coagulación. El exceso de trombina no puede ser controlado porque el endotelio disfuncional no sintetiza adecuadamente a sus inhibidores como la TM (13,35).

Todos estos mecanismos que inicialmente tenían como finalidad proteger a los vasos sanguíneos ante el daño, dan lugar a la inflamación crónica y un mayor riesgo de trombosis (13).



**Figura 4. Fenotipo del endotelio sano y disfuncional.** En el lado izquierdo se muestra el endotelio sano o inactivo caracterizado por expresar moléculas que bloquean la formación de coágulos y del lado derecho el endotelio activado que expresa moléculas de adhesión, libera citocinas y promueve la coagulación. TM: trombosmodulina. EPCR: receptor para la proteína C endotelial. TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular. CD39: ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1. CD73: Ecto 5'-nucleotidasa. PAR: receptores activados por proteasas. WPB: cuerpos de Weibel Palade. FvW: factor de von Willebrand. Angpt-2: angiopoyetina 2. TNFR: receptor de factor de necrosis tumoral. TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa. TF: factor tisular. PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos. DAMPs: patrones moleculares asociados al daño. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta. IL-1R: receptor de la interleucina. Imagen tomada y modificada de Colling ME, et al (35). Creado en <https://BioRender.com>

## La trombosis

La trombosis es la obstrucción del flujo sanguíneo debido a la formación de un coágulo patológico denominado trombo que se forma en un sitio y tiempo inadecuado, además de que su crecimiento y resolución no es controlada resultando en la isquemia y necrosis de los tejidos. Cuando un trombo se desprende de su lugar de origen se denomina émbolo (36,37).

La trombosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad prevenibles en México y en el resto del mundo. Las causas que la originan son multifactoriales, sin embargo, los elementos que la predisponen se agrupan en la tríada de Virchow conformada por la alteración en el flujo sanguíneo, la lesión endotelial y la hipercoagulabilidad (36,37).

### **Formación de un trombo**

La hemostasia es el mecanismo fisiológico encargado de evitar la pérdida de sangre cuando los vasos sanguíneos son lesionados mediante la formación de coágulos y su posterior degradación. Además, en vasos sanguíneos sanos se encarga de mantener a la sangre líquida para que se puedan desechar productos del metabolismo, transportar oxígeno y nutrientes en todas las células del cuerpo (36). La hemostasia involucra la interacción de proteínas de la coagulación, las plaquetas y las CEs para mantener un equilibrio pro y anticoagulante. La alteración de cualquiera de estos mecanismos hacia un estado procoagulante favorece la trombosis (38).

Existen 2 mecanismos principales que median la formación de coágulos dependiendo del daño vascular o la estructura del vaso. Uno está mediado por el colágeno y otro por el FT (38).

En el primero, se produce daño en la capa de las CEs lo que expone al colágeno subendotelial. Las plaquetas interactúan con el colágeno y el FvW a través de las glicoproteínas GPVI (glicoproteína VI) y GPIb/V/IX, proceso conocido como adhesión plaquetaria. Las uniones anteriores activan a las plaquetas y a las CEs para que secreten más sustancias procoagulantes como el ADP, ATP, TXA2 o FvW, esto tiene como finalidad amplificar la reclutación y activación plaquetaria. Las plaquetas activadas tienen un cambio conformacional en la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  del receptor plaquetario GPIIb/IIIa que lo activa favoreciendo su unión al fibrinógeno, el cual actúa como una molécula puente en la unión de una plaqueta con otra plaqueta (36,38).

Por otro lado, el daño tisular más profundo conduce a la liberación de FT que se une al factor VII y lo activa, formando el complejo FT/FVIIa que, a su vez activa al

factor X y al factor IX. Posteriormente el FXa (factor X activado) activa al FV (factor V) formando un complejo protrombinasa que transforma a la protrombina en trombina (FIIa). La trombina transforma el fibrinógeno en fibrina y se genera un coágulo más estable. El FIIa genera más FV que amplifica la actividad protrombinasa. De igual forma activa al FVIII, que funciona como un cofactor del FIXa que activará a más FXa. El FIIa también convierte el FXI en FXIa. El FXIa genera más FIXa. Posteriormente se forma un complejo “ten asa” conformado por el FIXa/VIIIa/Ca<sup>2+</sup> que genera la mayor cantidad de FXa. El FXa se une al FVa y al Ca<sup>2+</sup> que juntos generan una enorme cantidad de trombina que transforma el fibrinógeno en fibrina (36,38).

La hemostasia es un proceso altamente regulado que mantiene los coágulos en el sitio de daño y evita que crezcan lo suficiente como para obstruir la luz vascular. El endotelio es el principal componente que lleva a cabo estas funciones al mantener el equilibrio entre factores pro- y anticoagulantes por medio de la síntesis de PGI<sub>2</sub>, NO, TM, TFPI y el t-PA que limitan la progresión de la hemostasia al sitio de lesión (36).

### **Tipos de trombosis**

Se clasifica la trombosis como venosa o arterial según la localización del trombo. La trombosis arterial (TA) se desencadena en la mayoría de los casos por la ruptura de placas ateroscleróticas lo que conduce a la formación de trombos “blancos” ricos en plaquetas y suele darse en sitios donde el flujo de cizallamiento es elevado como en zonas con bifurcaciones. La oclusión total del flujo sanguíneo por los trombos arteriales y conforme a su ubicación puede dar lugar al infarto agudo al miocardio (IAM) o al accidente cerebrovascular (38,39).

La trombosis venosa profunda (TVP) se presenta generalmente por un daño en la integridad del endotelio venoso o también cuando existe una disminución del flujo sanguíneo, estos trombos se conforman principalmente por fibrina, eritrocitos y en menor cantidad por plaquetas. La TVP suele ocurrir en las extremidades inferiores y se pueden presentar síntomas como hinchazón, dolor, sensibilidad o enrojecimiento en el sitio afectado. Los trombos venosos no suelen adherirse

fuertemente a las CEs lo cual conduce a la formación de émbolos que viajan por toda la circulación venosa hasta que quedan atrapados en los vasos de menor calibre de los pulmones produciendo embolia pulmonar (EP), la TVP y la EP son denominadas en conjunto como tromboembolia venosa (TEV) (38,39).

En general los factores de riesgo que predisponen a una TA o a TV son similares como la obesidad, el cáncer, cirugías, la inmovilización o las infecciones (39).

## **El SARS-CoV-2 y su efecto en el endotelio vascular**

A finales de 2019, en la ciudad de Wuhan en China se reportaron los primeros casos de SARS-CoV-2, virus responsable de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). El COVID-19 se expandió rápidamente a otros países, siendo declarado una pandemia por la OMS en marzo de 2020 (40). A nivel mundial, los casos positivos confirmados de COVID-19 a la fecha rebasan los 600 millones y el número de muertes asciende a 6 millones.

### **Características del SARS-CoV-2**

El SARS-CoV-2 pertenece al grupo  $\beta$  de los coronavirus de la familia *Coronaviridae* y se caracteriza por tener un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo con 30 mil nucleótidos, que codifica para proteínas no estructurales y estructurales. La cápside viral está conformada por las proteínas estructurales que incluyen 4 proteínas: 1) proteína N (nucleocápside) encargada de proteger el material genético y la replicación viral ; 2) la proteínas membrana (M) que proporciona estructura y promueve el ensamblaje de las partículas virales; 3) la proteína envoltura (E) participa en la producción, maduración y salida de los viriones de la célula huésped y 4) la proteína S (spike o espícula) es una especie de llave que permite el ingreso del virus a las células hospederas. Usando microscopía electrónica, se observa una estructura rodeada de espículas (proteína S) que asemeja a una corona solar, de donde deriva su nombre. Por otro lado, las proteínas no estructurales participan en la replicación y maduración de proteínas (41,42).

## **Origen del SARS-CoV-2**

La evidencia genética sugiere que el SARS-CoV-2 es un virus de origen zoonótico. Los murciélagos han sido considerados como los principales reservorios para el virus, ya que se ha encontrado una similitud de hasta el 96% en la secuencia genómica del SARS-CoV-2 con el coronavirus "RaTG13" detectado en murciélagos de China. Además del murciélago se han propuestos otros huéspedes silvestres como el pangolín malayo, cuyos coronavirus tienen un dominio RBD casi idéntico al del SARS-CoV-2. Sin embargo, se ha considerado que es poco probable que los pangolines sean el reservorio principal para el virus, ya que, a diferencia de los murciélagos que son portadores de los coronavirus de forma saludable, los pangolines muestran signos clínicos, esto sugiere que lo más probable es que adquieran el virus después de infectarse por los huéspedes naturales, además la secuencia genómica del SARS-CoV-2 con los coronavirus del pangolín es del 90%. Actualmente no hay evidencias que demuestran que los pangolines sean un huésped intermediario (40,41).

También se ha propuesto que el SARS-CoV-2 evolucionó de la recombinación de ARN viral entre diferentes coronavirus relacionados. El origen del SARS-CoV-2 aún es incierto y se desconoce si la transmisión del virus a los humanos fue por un huésped intermediario (40).

## **Receptores y patogénesis**

La entrada del SARS-CoV-2 a las células hospederas inicia con la interacción de la proteína Spike con su receptor, la proteína ECA2 (enzima convertidora de angiotensina 2), que es expresada por muchos tejidos, siendo abundante en pulmones, tracto gastrointestinal, el corazón, el hígado y las CEs de los vasos sanguíneos (42). La proteína S está conformada por dos dominios, el dominio S1 que contiene la región RBD que se une a la ECA2 y el dominio S2 que permite la fusión de membranas. Cuando el virus se une a ECA2 el dominio S1 experimenta un cambio conformacional que expone sitios de corte para proteasas presente en la membrana, en particular de la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2). La

actividad de la proteasa permite la fusión de la membrana viral y la membrana celular, causando la interiorización del virus por endocitosis (43). Una vez dentro, el ARN del virus es traducido en los ribosomas. Las proteínas generadas son ensambladas en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. Finalmente, los viriones formados abandonan la célula por exocitosis para infectar a otras células (41).

### **Características clínicas del COVID-19**

Los síntomas del COVID-19 se observan aproximadamente 5 días después de la incubación y suelen durar un promedio de 11,5 días. Las manifestaciones clínicas suelen variar con la edad y el estado del sistema inmunológico de los pacientes (42). La mayoría de las personas experimentan una enfermedad leve a moderada o son asintomáticos y no tienen la necesidad de tratamiento especial. En cambio, las personas mayores de 60 años y las que tienen comorbilidades tienen más posibilidades de desarrollar una enfermedad respiratoria grave que requiere hospitalización o incluso es causa de muerte. Los síntomas leves son la fiebre, fatiga y tos seca. Los síntomas menos comunes incluyen dolor de cabeza, mareos, diarrea, pérdida del gusto y/o olfato, y dificultad respiratoria (40,44).

El virus se transmite a través de partículas líquidas que expulsan las personas infectadas cuando tosen, estornudan, hablan o respiran (40).

### **COVID-19 prolongado**

Los síntomas del COVID-19 suelen durar entre 2 y 3 semanas en la mayoría de las personas que contraen la enfermedad. Sin embargo, alrededor del 10% de los pacientes refieren síntomas persistentes que no se resuelven después de muchas semanas de transcurrida la infección por SARS-CoV-2 y que no están justificados por un diagnóstico alternativo (5,45). Esta nueva condición se ha denominado COVID-19 prolongado, COVID-19 persistente o como secuelas post-agudas de COVID-19 (PASC) y la OMS la define como la persistencia o el desarrollo de nuevos síntomas 12 semanas después de la infección inicial por SARS-CoV-2 (4). Se

estima que al menos 75 millones de personas en todo el mundo padecen de COVID-19 prolongado (45).

El COVID-19 persistente se puede dividir en 2 etapas dependiendo de la duración de los síntomas: 1) COVID-19 post-agudo, se refiere a los síntomas que se extienden más allá de 3 semanas y hasta 12 semanas; y 2) COVID-19 crónico, cuando los síntomas duran más de 12 semanas (5).

Los factores de riesgo para el COVID-19 persistente incluyen la presencia de comorbilidades como la obesidad, diabetes, hipertensión, dislipidemia o enfermedades cardiovasculares. El riesgo se incrementa en personas mayores de 50 años y se ha demostrado que las mujeres tienen una mayor prevalencia que los hombres. También suele estar asociada con grupos socioeconómicos desfavorecidos. El número y tipo de síntomas en la infección inicial también están relacionados con el COVID-19 prolongado (5,46).

Las personas con COVID-19 prolongado tienen deterioro estructural y funcional en múltiples sistemas incluido el: respiratorio, cardiovascular, hematológico, neurológico, urinario o gastrointestinal; lo que afecta su capacidad para realizar actividades diarias básicas. Los síntomas más comunes son fatiga (47%), disnea (32%), mialgia (25%), dolor en articulaciones (20%), dolor de cabeza (18%), tos (18%), dolor de pecho (15%), anomalías olfativas (14%) y/o diarrea (6%) (47).

La disfunción vascular persistente es común en pacientes convalecientes de COVID-19 y puede ser causada por múltiples mecanismos como la persistencia viral, la inflamación o la hipoxia crónicas, lo que predispone a la trombosis (5,47).

### **Fisiopatología de las complicaciones trombóticas del COVID-19 prolongado**

Se describen 3 posibles mecanismos relacionados entre sí que pueden contribuir al estado de hipercoagulabilidad en pacientes con COVID-19 persistente (**figura 5**): 1) factores virales, 2) factores del huésped y 3) cambios estructurales principalmente la disfunción endotelial debida a la infección inicial (5,46).

## 1. Factores virales

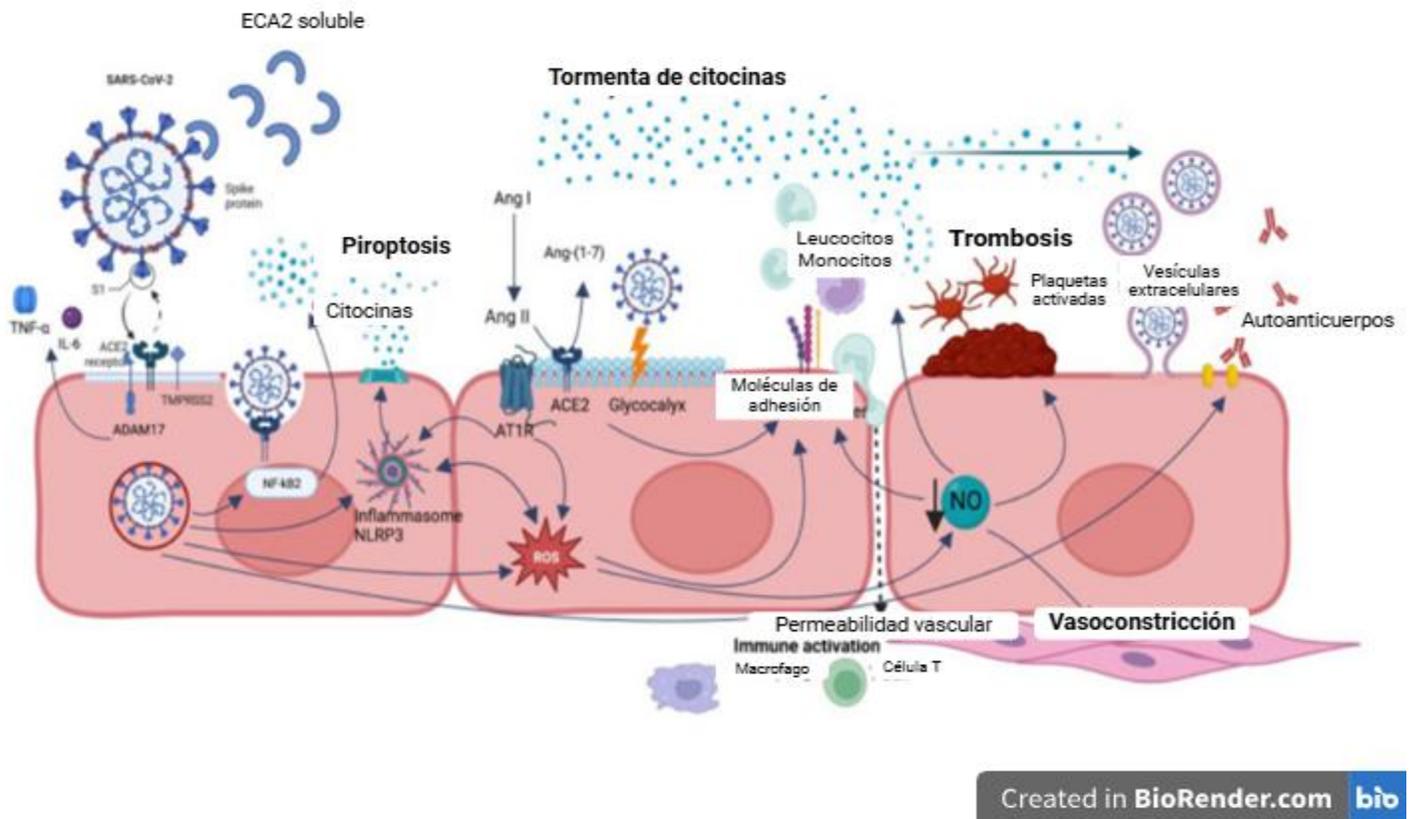
- a. Persistencia viral. Existe evidencia de que el SARS-CoV-2 puede persistir en reservorios tisulares después de una infección. Por ejemplo, en el sistema digestivo y el tracto urinario de pacientes con COVID-19 prolongado se ha detectado ARNm viral y proteínas del SARS-CoV-2 meses después de la infección por el virus. Las vesículas extracelulares (VE), se han propuesto como escondites que el virus utiliza para propagarse por medio del sistema circulatorio a otros tejidos y órganos. Las VE son estructuras lipídicas que son liberadas por la mayoría de las células como neutrófilos, monocitos o las CEs y que en su interior contienen ARNm, ADN, lípidos o proteínas (5,45).
- b. Reactivación de virus latentes. La infección por COVID-19 debilita el sistema inmune de las personas lo que permite que se reactiven virus que permanecían latentes como el virus de Epstein-Barr y el virus de la hepatitis C (5,45).

## 2. Factores del huésped

- a. Inflamación crónica y desregulación inmunológica. Después de la infección por el SARS-CoV-2, el sistema inmune no es capaz de regresar a su estado "normal" debido a la persistencia viral o incluso a cambios estructurales causados por el virus. En el COVID-19 prolongado existe un aumento de citocinas, interleucinas y quimiocinas (tormenta de citocinas) que conducen a una condición hiperinflamatoria que promueven la activación de la coagulación al estimular a las CEs, a las plaquetas y a otras células de sistema inmune (5,45,47).
- b. Autoinmunidad. Los anticuerpos antifosfolípidos se han detectado en muestras de suero de pacientes hospitalizados por COVID-19. Estos anticuerpos promueven la trombosis al activar a las CEs, las plaquetas y a los neutrófilos (47).

### 3. Cambios estructurales

- a. La infección inicial aguda por COVID-19 causa daños graves en los tejidos y órganos, principalmente daño endotelial. Esto se ha demostrado en estudios que han identificado biomarcadores de disfunción endotelial en pacientes después de COVID-19 como concentraciones aumentadas de FvW, factor VIII, trombomodulina o de CFCEs (46). La infección por el virus causa un estado inflamatorio que aumenta la producción de ROS, disminución de NO y aumento de angiotensina II lo que probablemente cause un estado de hipoxia crónica en los pacientes. La hipoxia resultante aumenta aún más la inflamación lo que implica cambios en la estructura del pulmón, cambios en la rigidez de las células sanguíneas, etc. (45). Estos Cambios estructurales también se han demostrado en autopsias de pulmón de las personas fallecidas por COVID-19 (5).



**Figura 5. Fisiopatología del COVID prolongado.** ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2. SARS-CoV-2: coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo. TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa. IL-6: interleucina 6. ROS: especies reactivas de oxígeno. Ang: angiotensina. NO: óxido nítrico. AT1R: receptor de angiotensina II tipo 1. TMPRSS2= Proteasa transmembrana de serina 2. ADAM17: desintegrina y metaloproteasa 17. NF-κB: factor nuclear kappa B. Imagen tomada y modificada de Santoro L, et al (45). Creado en <https://BioRender.com>

### Vacunas contra el SARS-CoV-2 y el COVID-19 prolongado

Las vacunas contra el SARS-CoV-2 desde que se comenzaron a aplicar a finales del 2020, han ayudado a evitar el fallecimiento y la hospitalización de millones de personas en todo el mundo. La OMS ha aprobado 10 vacunas contra el COVID-19 para uso mundial que se pueden dividir en 4 diferentes tipos: 1) vacunas de virus inactivados, 2) vacunas de ARNm, 3) vacunas basadas en vectores de adenovirus y 4) vacunas proteicas adyuvantes (48).

La relación que existe entre la vacunación y el desarrollo de síntomas de COVID-19 prolongado es poco clara y contradictoria. Esto debido a que se han reportado

estudios en donde se demuestra que las vacunas reducen la probabilidad de desarrollar COVID-19 prolongado, y en otras investigaciones, se reporta lo contrario, es decir, la vacunación no tiene un efecto protector ante el COVID-19 prolongado (5).

Otro tema de intenso debate con relación a las vacunas contra el COVID-19 es que se han reportado efectos adversos después de la vacunación, en particular, la trombosis que pueden confundirse con el COVID-19 prolongado (5,48). Los síntomas adversos más frecuentes que se han reportado de las vacunas contra el COVID-19 son de leves a moderados como la fatiga, fiebre, escalofríos, dolor muscular o dolor de cabeza que suele durar pocos días en la mayoría de las personas. Los efectos secundarios más graves que se han reportado de la vacunación contra el COVID-19 incluyen miocarditis, pericarditis, reacciones anafilácticas y la trombosis (48). La trombocitopenia trombótica inmunitaria inducida por la vacuna (TTIV) es un efecto adverso protrombótico de la vacuna contra el SARS-CoV-2. La TTIV es causada por anticuerpos anti factor plaquetario 4 activador de plaquetas (PF4) que son inducidos por vacunas contra el COVID-19 basadas en vectores de adenovirus como la vacuna de ChAdOX1 nCoV-19 de Oxford-AstraZeneca, Ad26.COV2.S de Johnson & Johnson y Sputnik-V del Instituto de Investigación de Epidemiología y Microbiología Gamaleya en Rusia (49,50). La TTIV se presenta de 3 a 48 días después de la aplicación de la vacuna y los sitios de la trombosis son normalmente atípicos como el seno venoso cerebral o las venas esplácnicas, sin embargo, también se han reportado casos de EP y TVP en extremidades inferiores (50).

A pesar de los efectos adversos de las vacunas contra el COVID-19, sus beneficios son superiores por mucho. Sin embargo, las lesiones por vacunas es un tema que debe estudiarse como cualquier otra enfermedad para el desarrollo de mejores vacunas (5).

## **Las células formadoras de colonias endoteliales (CFCEs)**

Las células progenitoras endoteliales (CPE) es una terminología para describir un subconjunto de células mononucleares (CMNs) CD34+ y VEGFR2+ que muestran características endoteliales (51). El cultivo de CMNs de SP (sangre periférica) da lugar a dos poblaciones de CPE: las CPE tempranas y las CPE tardías (también conocidas como CFCEs), ambas con marcadores celulares y funciones diferentes (52).

Las CPE tempranas fueron nombradas y aisladas de SP por primera vez en 1997 por Asahara y sus colaboradores. Esta población es de origen mielomonocítico y comparte características similares a las CEs como la expresión de marcadores endoteliales, la producción de NO y la liberación de factores pro angiogénicos, sin embargo, son incapaces de integrarse directamente como CEs en la formación de nuevos vasos sanguíneos por lo que no son consideradas como precursores verdaderos de CEs (8,51).

En cambio, las CFCEs, definidas como las verdaderas progenitoras endoteliales, es una población celular rara capaz dar lugar a células endoteliales y formar vasos sanguíneos. Las CFCEs son consideradas como verdaderas CPE porque cumplen con 3 características importantes: 1) tienen la capacidad de diferenciarse en células con un fenotipo endotelial genuino; 2) tienen una alta capacidad proliferativa (una sola célula pueda formar colonias de más de 2000 células) y 3) forman estructuras vasculares funcionales (8).

Esta nomenclatura ha generado una enorme ambigüedad, por lo que se recomienda denominar a las CPE tempranas y tardías como células angiogénicas mieloides (MAC) y células formadoras de colonias endoteliales (CFCEs) respectivamente (8,51).

Existen varios parámetros que permiten diferenciar a las CFCEs y a las MAC en cultivo celular. En primer lugar, están la caracterización de marcadores celulares, las CFCEs expresan marcadores de células troncales CD34+ y marcadores endoteliales como CD31, VE-Cadherina (CD144), factor de von Willebrand (FvW), VEGFR2 y carecen de marcadores leucocitarios como CD45 y CD14 que son abundantes en las MAC (8,51). En segundo lugar está la capacidad angiogénica,

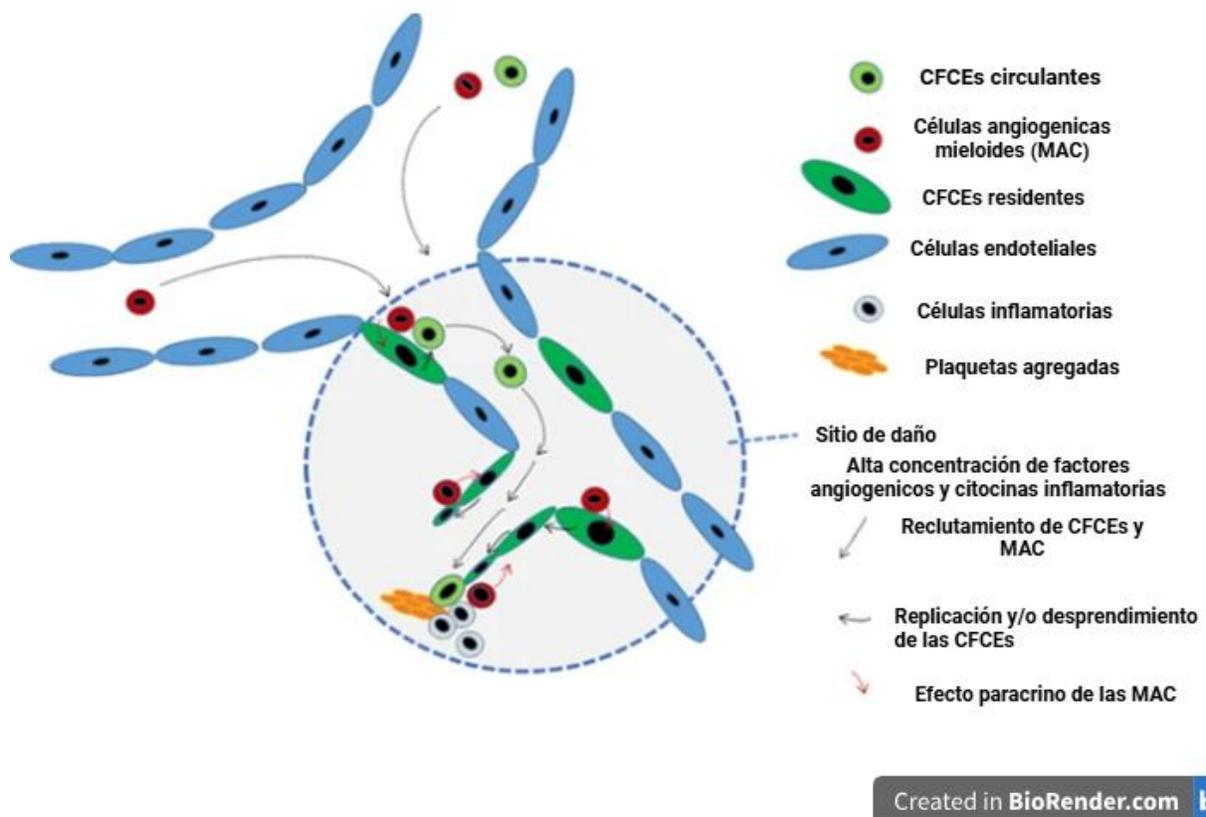
las CFCEs forman estructuras tubulares en Matrigel, mientras las MAC no lo hacen. También las MAC suelen obtenerse a los 7 días de cultivo, muestran poca capacidad proliferativa y exhiben un fenotipo similar a macrófagos (51,52). Mientras que las colonias de CFCEs (más de 50 células/colonia) en cultivo celular suelen detectarse más tarde, por lo regular al día 14 en adultos sanos con la característica área cobblestone (52).

### **Aislamiento y aplicaciones**

Las CFCEs se pueden aislar del cordón umbilical con una frecuencia de 50 CFCEs por  $10^8$  CMN y de sangre periférica de adultos con una frecuencia muy baja de 1 CFCE por  $10^6$ - $10^8$  CMN de torrente sanguíneo (9,51). A pesar de la baja cantidad en SP y de otras limitaciones, estas representa una excelente población celular para la investigación, ya que ofrecen varias ventajas como su obtención por métodos no invasivos (punción venosa), alta proliferación y además reflejan las anomalías estructurales y funcionales asociadas con las patologías después de su aislamiento de SP, lo que las hace buenas candidatas para el estudio de la fisiopatología de enfermedades o como biomarcadores para enfermedades cardiovasculares (10,53).

### **Origen y regeneración vascular de las CFCEs**

Las CFCEs y las MAC trabajan de manera colaborativa en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Las MAC actúan primero ante la lesión endotelial liberando factores pro-angiogénicos y citocinas que actúan de manera paracrina para el reclutamiento de CFCEs de la circulación o de su nicho vascular local. Las CFCEs reclutadas migran al sitio lesionado para restaurar la integridad endotelial (**figura 6**). El mecanismo exacto que moviliza a las CPE a los vasos dañados y cómo es que ocurre el proceso de reparación es aún desconocido (9).



**Figura 6. Mecanismo de reparación de las CFCEs.** ECFC: células formadoras de colonias endoteliales. MAC: células angiogénicas mieloides. Imagen tomada y modificada de Banno K, et al (9). Creado en <https://BioRender.com>

## Planteamiento del problema

El COVID-19 a largo plazo es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo, y una cantidad representativa de los casos se ha descrito en aquellas personas que desarrollaron una enfermedad leve. Una de las consecuencias del SARS-CoV-2 a largo plazo, es su efecto sobre las células endoteliales, ya que se ha reportado que influye negativamente en su funcionalidad y regulación normal, haciendo que adquieran un fenotipo protrombótico y proinflamatorio crónico, lo que aumenta el riesgo de presentar trombosis y otras patologías en las personas que se infectan por el virus. Por lo tanto, es importante estudiar la influencia que tiene el virus sobre el endotelio y un modelo celular que ofrece esta utilidad son las CFCEs que reflejan fielmente las características del endotelio sano y disfuncional. Por lo

que el objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia, capacidad proliferativa y de expansión de las CFCEs provenientes de pacientes con trombosis de primera vez recuperados de COVID-19.

## **Pregunta de investigación**

¿Las CFCEs provenientes de pacientes con trombosis, como una consecuencia de COVID-19 a largo plazo, presentan alteraciones en su capacidad proliferativa?

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

- Determinar la capacidad proliferativa de las células formadoras de colonias endoteliales (CFCEs) de sujetos que presentaron un evento de trombosis después de la recuperación de COVID-19.

### **Objetivos específicos**

- Seleccionar y reclutar pacientes con evento de trombosis posterior a COVID-19.
- Obtener a partir de SP de pacientes con trombosis, células MNCs.
- Identificar colonias conformadas por CFCEs en cultivos de células MNCs.
- Determinar características morfológicas y capacidad proliferativa de las CFCEs que conforman las colonias.
- Analizar la prevalencia de trombosis entre hombres y mujeres posterior a COVID-19.

## **Método**

### **Población de estudio**

Para la población del estudio se trabajó a conveniencia con los pacientes que llegaron a la Unidad de Investigación en un período de 6 meses y que cumplieron con los criterios considerados en la presente propuesta.

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes hombres y mujeres mexicanos.
- Sin enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, obesidad, cáncer, tabaquismo, o alguna enfermedad hematológica relacionada con la coagulación).
- Edad entre 18 y 50 años.
- Al menos haber padecido un evento de trombosis venosa o arterial.
- Prueba confirmatoria de infección por SARS-CoV-2 (Reacción en Cadena de la Polimerasa, Transcriptasa Inversa (RT-PCR) y prueba de antígeno (nasofaríngea).
- Pacientes recuperados de COVID-19 desde los primeros meses y hasta 36 meses (equivalente a 3 años).

### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con enfermedades crónicas previas a la infección por SARS-CoV-2 (diabetes, hipertensión, obesidad, cáncer, tabaquismo, o alguna enfermedad hematológica relacionada con la coagulación).
- Mujeres embarazadas.
- Que el donador o el paciente no firmen carta de consentimiento informado.

### **Criterios de eliminación:**

- Volumen de sangre menor a 50 mL.
- Muestras coaguladas durante el proceso.

## **Técnicas, materiales o instrumentos**

**Obtención de células mononucleares (CMNs).** Previa firma de la carta de consentimiento informado, a cada paciente o donador, se le tomaron 100 mL de SP por venopunción, utilizando jeringas de 20 mL con 500  $\mu$ L de solución de heparina sódica [1000 UI; HEP-TEC]. Posteriormente la SP se diluyó (2:3) con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS; Thermo Fisher Scientific). La mezcla se colocó en tubos de 50 mL con tapa de rosca a los cuales se les adicionó previamente, 15 mL de Ficoll Paque (STEMCELL Technologies). La centrifugación de los tubos se realizó a 2000 revoluciones por minuto (rpm) por 30 min, para obtener una banda de células mononucleares (CMNs). La fracción de CMNs se recuperó y lavó dos veces con 10 mL de PBS 1X a una velocidad de centrifugación de 2,000 rpm por 5 min. La viabilidad de las CMNs se realizó mediante exclusión con azul de tripano y el conteo de las CMNs por diluyente de Turk, en cámara de Neubauer.

**Cultivo de CMNs.** Las CMNs se resuspendieron en medio EGM-2 (EBM-2 (medio basal para células endoteliales) con factores de crecimiento para endotelio; Lonza), suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB; Cytiva) y 10UI/mL de con antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco), anfotericina B (Gibco) y antibiótico-antimicótico (Gibco). Las células se sembraron en 2 placas de 6 pozos recubiertas con anterioridad con colágeno de humano tipo I (STEMCELL Technologies), con una cantidad de 20,000,000 a 30,000,000 de CMNs en cada pozo y se incubaron a 37°C, una atmósfera saturada de humedad de 5% de CO<sub>2</sub>. El cambio de medio se realizó cada 24 h los primeros 7 días del cultivo y después cada tercer día hasta que el cultivo cumplió un mes. Los cultivos celulares fueron monitoreados cada 3 o 4 días hasta lograr identificar clusters o colonias conformadas de CFCEs hasta que cumplieron 1 mes, utilizando un microscopio de contraste de fases (Olympus CKX41). Durante el procedimiento se reportaron el día de detección de la colonia, su morfología, número de colonias y capacidad proliferativa.

**Clonación de CFCEs.** Las colonias conformadas por CFCEs detectadas, se mantuvieron en el plato de cultivo para evaluar su capacidad proliferativa, manteniéndolas por aproximadamente 7 días. Después de este tiempo, las colonias fueron cosechadas con anillos clonación, el cual fue adherido directamente en el plato de cultivo con un silicón donde se encuentra la colonia. Para disociarla se utilizó una enzima tryPLE Express (Gibco) por 5 min a 37°C. Las células disociadas se lavaron en solución de PBS, centrifugadas a 2000 rpm durante 6 min. El botón celular nuevamente se resuspendió con medio EGM-2 y se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul de tripano en cámara de Neubauer. Las células se sembraron en placas de cultivo previamente tratadas con colágeno humano. Las células fueron monitoreadas y dependiendo de su capacidad proliferativa se hicieron cambios de medio con EGM-2 fresco hasta que lleguen a confluencia celular.

## **Variables**

### **Independientes**

- Edad
- Sexo
- Tipo de trombosis (arterial o venosa)
- Evento de trombosis
- Vacunas contra el SARS-CoV-2

### **Dependientes**

- Tiempo de recuperación por COVID-19.
- Características del cultivo de las CFCE como la morfología, proliferación, día de detección o cantidad de las colonias.

## **Hipótesis**

Las CFCEs provenientes de pacientes con trombosis posterior a la recuperación de COVID-19 presentan alteraciones en su morfología y capacidad proliferativa.

## **Tipo de estudio**

Se realizará un estudio observacional, retrospectivo parcial, transversal y comparativo.

## **Procedimiento**

El estudio se realizó a los pacientes que acudieron a la Unidad Médica de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital General Regional No. 1 “Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro” del Instituto Mexicano del Seguro Social. Primero se les explicó el procedimiento y finalidad de la investigación, se les dio a firmar una carta de consentimiento informado a los pacientes que decidan participar y se tomó muestra sanguínea para cultivo celular y estudios de laboratorio en el laboratorio clínico del hospital (Biometría hemática, química sanguínea y tiempos de coagulación). Se les realizó una encuesta para conocer antecedentes clínicos de la enfermedad COVID-19 (**Anexo 1**).

## **Análisis estadístico**

Se utilizó el Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 22 para las pruebas estadísticas. La comparación estadística entre sexos (hombre y mujer) de las variables cualitativas se realizó por la prueba  $\chi^2$  para variables categóricas nominales y la prueba de U de Mann Whitney para las variables ordinales.

La comparación de variables numéricas entre sexos se realizó por t de Student para muestras independientes, después de determinar que los datos tienen una distribución normal.

La comparación entre controles, pacientes con trombosis antes del COVID-19 y después del COVID-19 se realizó por ANOVA o Kruskal Wallis dependiendo de si la distribución de los datos era o no normal. Los grupos en los que la comparación fue  $p < 0.05$  se consideró diferente.

## Resultados

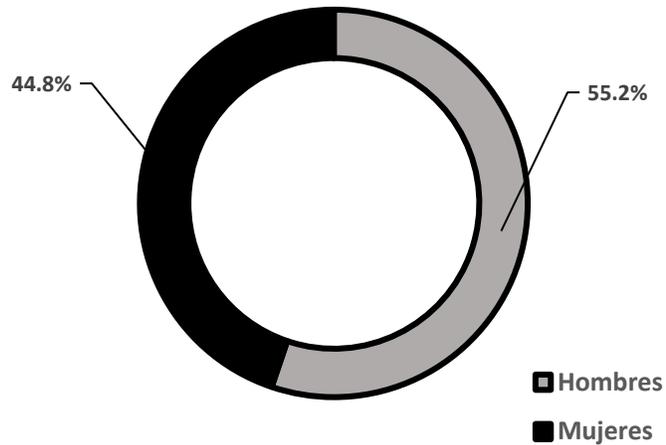
Los resultados obtenidos se dividieron en dos secciones: en la primera se describen los datos de los pacientes y en la segunda las características del cultivo celular de las CFCEs obtenidas.

### Datos demográficos

El estudio se realizó de enero de 2023 a marzo de 2024, con algunos de los pacientes que llegan a la Unidad de Investigación Médica, siendo una Unidad de referencia Institucional con alteraciones del sistema de la coagulación (hemofilia o trombofilia).

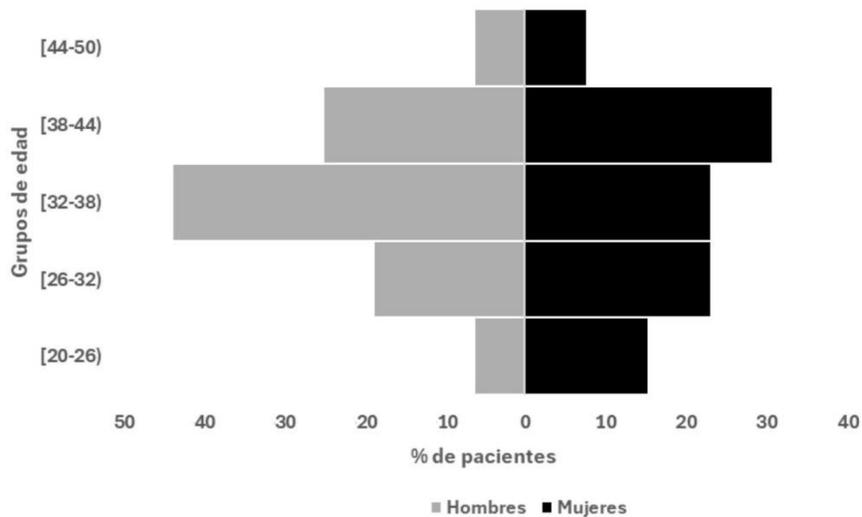
Se reclutaron y seleccionaron 35 pacientes previa firma de la carta de consentimiento informado, con antecedentes de infección por SARS-CoV-2, que desarrollaron una enfermedad COVID-19 leve-moderada y que no requirieron ingreso hospitalario. De igual forma, se consideró que tuvieran al menos un esquema de vacunación contra SARS-CoV-2 y posterior a la recuperación, padecieran un evento de TVP.

De acuerdo con los criterios de inclusión y eliminación, se consideró trabajar con sólo 29 pacientes, de los cuales, el 55.2% ( $n=16$ ) lo representan hombres y el 44.8% ( $n=13$ ) corresponde a las mujeres (**Figura 7**).



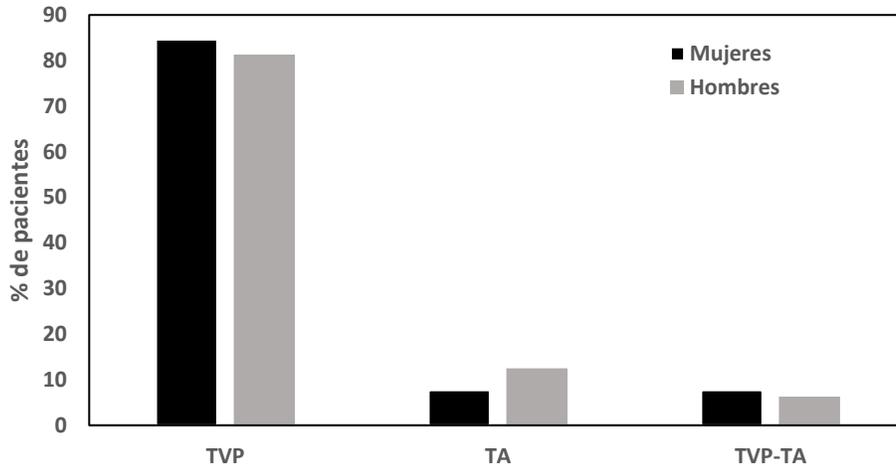
**Figura 7. La TVP por COVID prolongado es indistinta en los hombres y mujeres.** Se representa el porcentaje del sexo de los pacientes recuperados de COVID-19 que desarrollaron al menos un evento de trombosis después de contagiarse con el virus.

Los grupos de edad más afectados se muestran en el siguiente histograma (**Figura 8**) conforme a su sexo. Las mujeres de entre 38 y 44 años son el grupo de edad más propenso a presentar trombosis, en comparación con los hombres, donde el grupo de edad más afectado tiene entre 32 y 38 años. No se encontraron diferencias entre la edad y el sexo de los pacientes ( $p=0.848$ ). La media de edad para hombres y mujeres fue de 34 años.



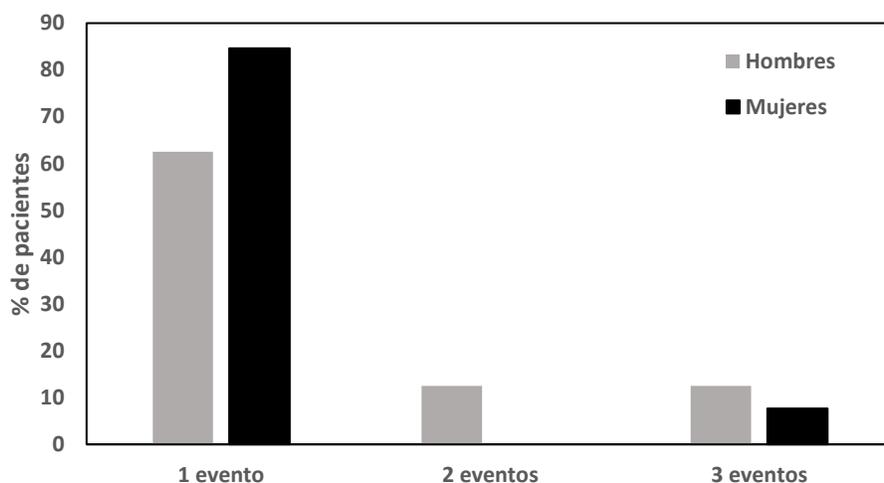
**Figura 8. La prevalencia de TVP es en promedio a los 34 años .** La figura representa el porcentaje de mujeres y hombres para cada grupo de edad. Se realizó la prueba t de Student para muestras independientes, para determinar si hay diferencias entre la edad y sexo de los pacientes. Los grupos en los que la comparación fue  $p < 0.05$  se consideró diferente. Para mujeres se encontró una media de  $34.23 \pm 8.36$  y para hombres una media de  $34.75 \pm 6.08$  respectivamente.

La **figura 9** muestra el tipo de trombosis que presentaron los pacientes. El 84.6% ( $n=11$ ) de las mujeres y el 81.3% ( $n=13$ ) de los hombres presentaron TVP, lo que la convierte en el tipo de trombosis más común para ambos sexos. La TA se presenta en menor medida con un 7.70% ( $n=1$ ) y 12.50% ( $n=2$ ) para mujeres y hombres respectivamente. La TA y TVP simultánea también es un caso menos frecuente para ambos sexos (mujeres 7.70%, hombres 6.30%). No se encontró una relación entre el tipo de trombosis y el sexo ( $p=0.909$ ).



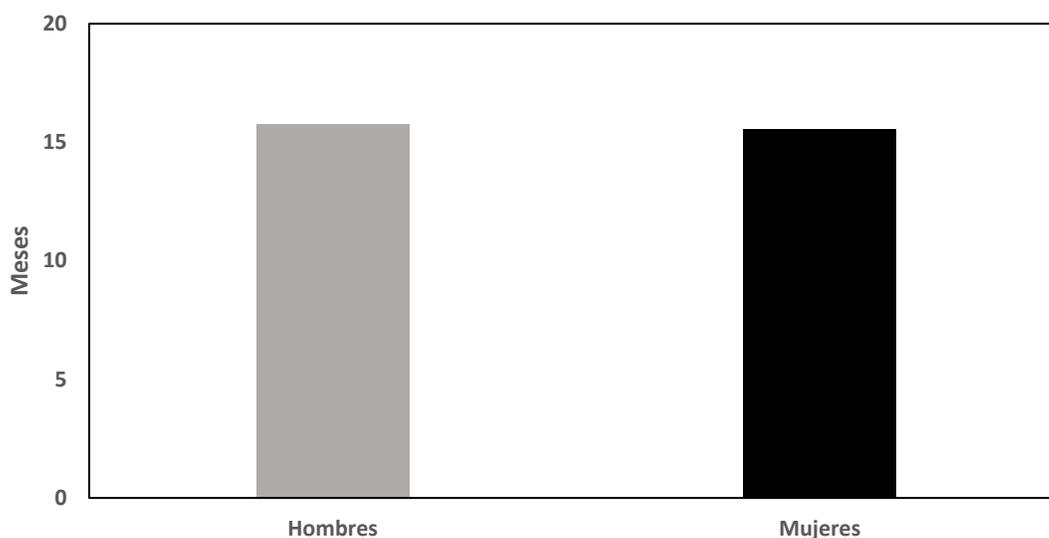
**Figura 9. La TVP como secuela del COVID-19 a largo plazo es la más frecuente.** La figura indica la frecuencia relativa del tipo de trombosis que presentaron hombres y mujeres. Se realizó una prueba de  $\chi^2$  para determinar si existe asociación entre el sexo y el tipo de trombosis, se consideró  $p < 0.05$  como asociación entre variables. TVP=trombosis venosa profunda, TA= trombosis arterial, TVP-TA=trombosis venosa profunda y trombosis arterial.

Se obtuvo el número de eventos de TVP que presentaron los pacientes. Para hombres (62.5%) y mujeres (84.6%) predomina un único evento trombótico después de la infección con SARS-CoV-2 (**Figura 10**). Durante el COVID-19 persistente los síntomas pueden persistir, por lo que, en menor proporción, se registraron pacientes con más de un episodio de TVP. Se obtuvo que el 12.5% (n=2) de los hombres y el 0% de las mujeres han tenido únicamente 2 eventos de TVP y el 12.5%(n=2) de los hombres y el 7.69% (n=1) de las mujeres han tenido 3 eventos de TVP.



**Figura 10. Los pacientes de COVID-19 persistente tienen como secuela al menos un evento de TVP.** La gráfica muestra el porcentaje de mujeres y hombres que han tenido 1, 2 y 3 eventos de TVP. Para determinar si hay asociación entre el número de eventos de TVP y sexo se usó la prueba  $X^2$ , donde se consideró una  $p < 0.05$  como diferente. El número de eventos de TVP no es diferente entre sexos ( $p = 0.488$ ).

La OMS determinó que para ser considerada la enfermedad de COVID-19 a largo plazo o COVID-19 largo, es que hasta tres meses sean persistentes algunos de síntomas generados durante la infección del SARS-CoV-2. Para lo cual, a los pacientes se les realizó una encuesta en la que se incluyó fecha de infección confirmada por prueba nasofaríngea y otras por RT-PCR. Posteriormente la fecha del evento trombótico. Para lo cual cabe enfatizar que los pacientes son adultos jóvenes con un estilo de vida saludable y sin comorbilidades y que el cuadro clínico fue leve-moderado y no requirieron atención hospitalaria. De acuerdo a lo anterior, se encontró que la media para hombres y mujeres es de 15 meses, es decir, 1 año y 3 meses después de haber sido diagnosticados con COVID-19, los pacientes empezaron a presentar al menos un evento de trombosis (**Figura 11**).



**Figura 11. La TVP por COVID-19 prolongado se presenta aproximadamente 15 meses después de la recuperación de la enfermedad.** La gráfica representa el tiempo promedio en meses a los cuáles los pacientes presentan la trombosis después de haberse infectado de SARS-CoV-2. Se realizó la prueba t de Student para muestras independientes, para determinar si hay diferencias en el tiempo que se dan los eventos trombóticos para hombres y mujeres. Los grupos en los que la comparación fue  $p < 0.05$  se consideró diferente. Se encontró una significancia de 0.960, por tanto, ambos grupos son similares. La media para mujeres es de 15.54 con una desviación estándar (DE) de 9.78 y para hombres la media fue de 15.77 con una DE= 10.43.

Con respecto al esquema de vacunación para contra el SARS-CoV-2, se encontró que la mayoría de los pacientes de este estudio tienen 3 vacunas aplicadas (**tabla 2**). En menor proporción están los pacientes que no tienen ninguna vacuna (mujeres=0%, hombres=12.5%) y los que tienen más de 3 dosis (mujeres=15.38%, hombres=0%).

Número de dosis	Mujeres		Hombres	
	N	%	N	%
Sin vacuna	0	0	2	13
1	1	8	2	13
2	2	15	2	13
3	8	62	10	63
4	2	15	0	0

**Tabla 2. Número de dosis aplicadas de vacunas contra el SARS-CoV-2 en hombres y mujeres.** N=número.

Laboratorio	Resultado	Valor de referencia
Colesterol VLDL (mg/dL)	27.57 ± 16.04	2 a 30
Glucosa (mg/dL)	88.06 ± 17.35	74 a 115
Urea (mg/dL)	34.71 ± 21.15	14 a 50
Creatinina (mg/dL)	1.55 ± 2.72	0.5 a 1.5
Colesterol total (mg/dL)	150.63 ± 28.12	50 a 200
Triglicéridos (mg/dL)	137.86 ± 80.2	50 a 150
HDL Colesterol (mg/dL)	46.24 ± 14.95	65 a 0
Colesterol LDL (mg/dL)	76.83 ± 27.16	75 a 193
Aspartato aminotransferasa (U/L)	19.65 ± 6.52	13 a 40
Alanina aminotransferasa (ALT/TGP) (U/L)	22.16 ± 12.64	7 a 41
Deshidrogenasa láctica (DHL) (U/L)	200.14 ± 55.06	135 a 214
Fosfatasa alcalina (U/L)	102.56 ± 37.85	40 a 129
Gamma Glutamilttransferasa (GGT) (U/L)	39.94 ± 34.34	8 a 65
Bilirrubina total (mg/dL)	0.65 ± 0.55	0.10 a 1.20
Bilirrubina directa (mg/dL)	0.21 ± 0.15	0.00 a 0.20
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.45 ± 0.40	0.10 a 0.80
Proteínas totales (mg/dL)	6.97 ± 0.68	6.6 a 8.7
Albúmina	4.16 ± 0.62	4.0 a 5.0
Globulinas (g/dL)	2.72 ± 0.45	2.3 a 3.5
Rel A/G (g/dL)	1.53 ± 0.38	1.2 a 1.9
Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> µL)	5.20 ± 0.83	4.59 a 6.50
Hemoglobina (g/dL)	14.5 ± 2.96	13.8 a 16.7
Hematocrito (%)	43.92 ± 7.28	40.5 a 52.0
MCV (fL)	84.91 ± 8.85	80.4 a 97.0
MCH (pg)	27.98 ± 4.08	25.6 a 31.8
MCHC (g/dL)	32.82 ± 1.90	32.0 a 36.0
RDW-CV (%)	15.74 ± 4.07	15.6 a 18.5
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> µL)	291.94 ± 99.95	150 a 450
MPV	10.37 ± 0.97	7.1 a 11.6
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> µL)	6.66 ± 1.84	4.8 a 10.0
Neutrófilos %	62.36 ± 7.77	44.0 a 63.9
Linfocitos %	27.16 ± 7.07	24.0 a 42.0
Monocitos %	7.43 ± 2.22	5.8 a 9.6
Eosinófilos %	2.21 ± 1.75	1.0 a 4.3
Basófilos %	0.54 ± 0.22	0.0 a 1.3
VSG (mm/h)	14.40 ± 8.23	0.0 a 20.0
TP (seg)	13.92 ± 1.03	12.2 a 14.9
INR	1.08 ± 0.08	0.80 a 1.2
TTPa (seg)	29.41 ± 2.29	25 a 35

**Tabla 3. Laboratorios clínicos.** Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. HDL: lipoproteína de alta densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad. ALT/TGP: alanina aminotransferasa o transaminasa pirúvica. DHL: deshidrogenasa láctica. GGT: gamma glutamil transferasa MCV: volumen corpuscular medio. MCH: hemoglobina corpuscular media. MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media. RDW-CV: Ancho de distribución de glóbulos rojos-desviación estándar. MPV: Volumen plaquetario medio. VSG: volumen corpuscular medio. INR: índice internacional normalizado. TP: tiempo de protrombina. TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado. mg: miligramos. L: litros. dL: decilitros. µL: microlitros. fL: femto litros. Seg: segundos. h: hora. mm: milímetros.

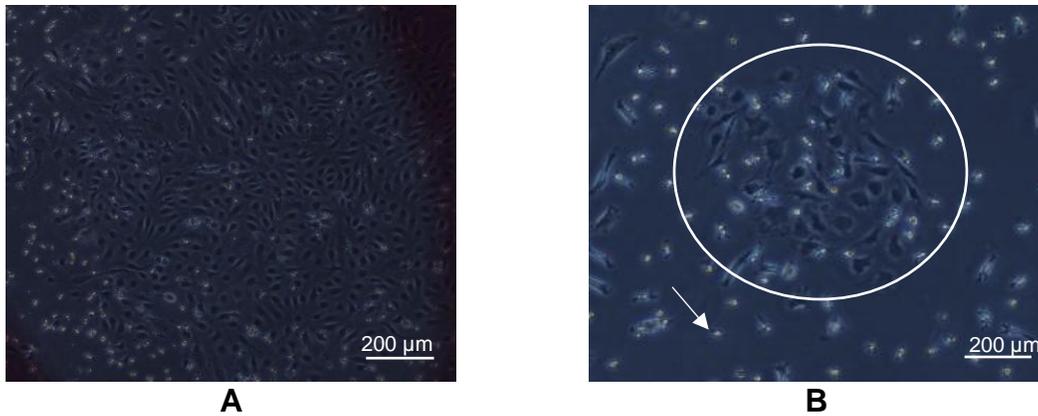
En la **tabla 3** se muestran los resultados de los laboratorios clínicos de los sujetos de estudio. La mayoría de los resultados se encuentran dentro de los rangos normales, no se obtuvo ningún laboratorio que indicara un riesgo alto de trombosis.

### **Características del cultivo celular de las CFCEs**

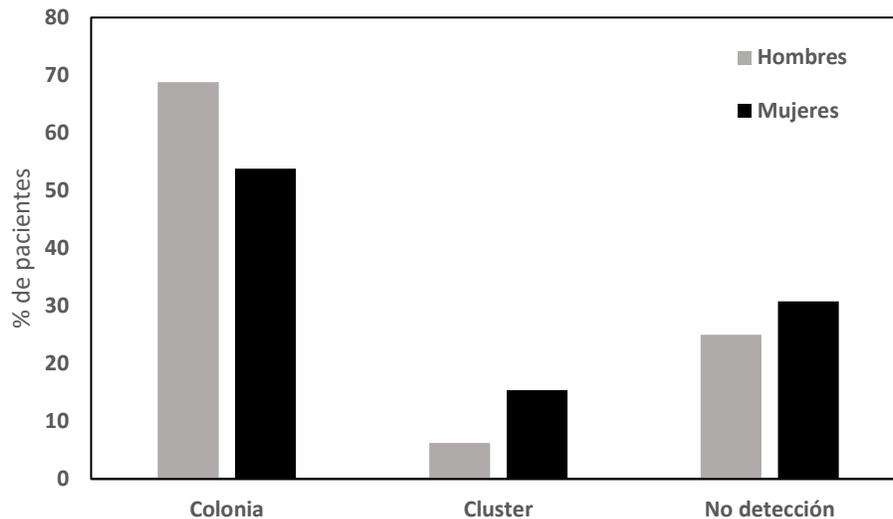
Para determinar si el SARS-CoV-2 está relacionado o representa un factor de riesgo para desarrollar trombosis en personas infectadas por el virus, se consideró un estudio que se realizó en los primeros meses del inicio de la pandemia en nuestro laboratorio y se detectaron alteraciones morfológicas en las colonias conformadas por CFCEs lo cual en su momento determinó que dichas alteraciones estaban directamente relacionadas con la capacidad angiogénica y proliferativa datos que están directamente relacionados con disfunción endotelial y factor de riesgo para posibles eventos trombóticos.

Se realizó el cultivo de células mononucleares para determinar la presencia de las colonias de CFCEs en los pacientes e identificar diferencias entre los mismos y compararlos con controles y pacientes con trombosis recurrente de datos recopilados en nuestro laboratorio antes de la pandemia.

Del total de los 29 pacientes considerados para el estudio, en 18 se identificaron colonias de CFCEs, lo que representa más del 50% (**Figura 12A**). La tasa de detección de colonias más alta corresponde a los hombres con un 68.8% (n=11) y para las mujeres fue del 53.8% (n=7). Los clústeres detectados correspondieron a menos del 50% (**Figura 12B**) y son el tipo de observación que se detectó con menos frecuencia en los cultivos, solamente en el 6.25% (n=1) de los hombres y en el 15.4% (n=2) de las mujeres. El monitoreo a lo largo de los días de las CFCEs que conformaban los clústeres, se observó una proliferación baja, además de características de células senescentes y posterior muerte celular lo que impidió que las células pudieran formar una colonia. La no detección de clústeres y colonias en los 30 días que se mantuvo el cultivo fue del 25% (n=4) y 30.8% (n=4) de los hombres y mujeres respectivamente. (**Figura 13**).



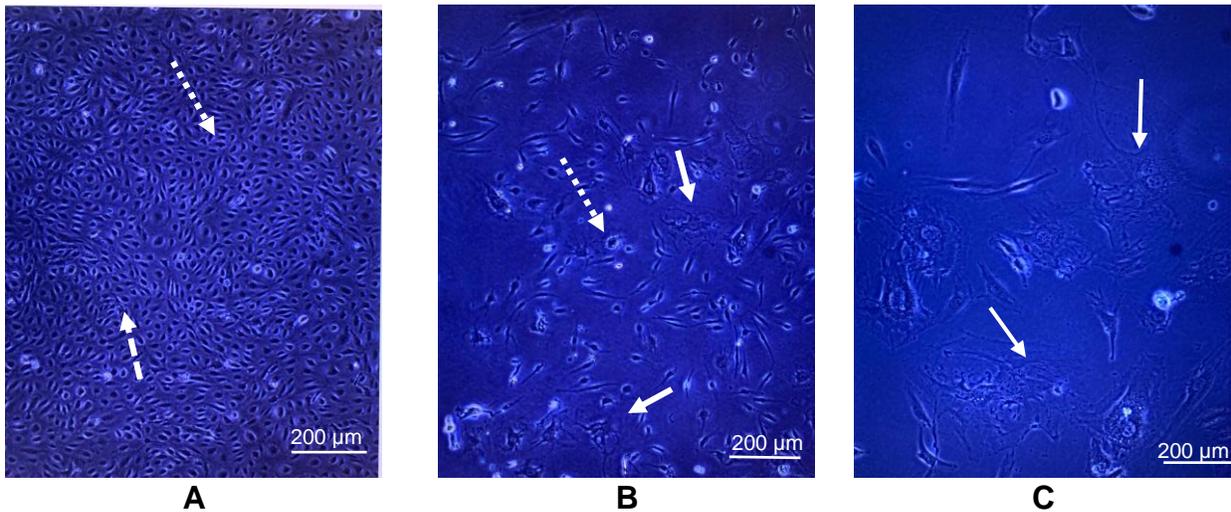
**Figura 12. Diferencias entre colonias y clústeres conformados por CFCEs .** La figura muestra una imagen representativa de un colonia (>50 células) de CFCEs (A) y un clúster (<50 células) de CFCEs (B) identificados durante el cultivo de las CMNs de los pacientes con COVID-19 prolongado. La flecha indica monocitos. Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases, Olympus CKX41, objetivo 4x.



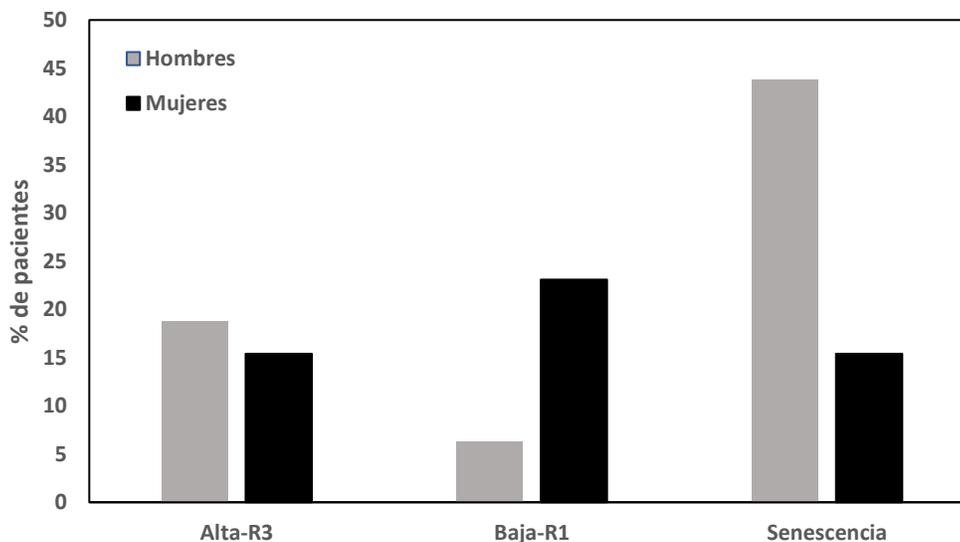
**Figura 13. Las colonias de las CFCEs predominaron en los cultivos de los pacientes con TVP por COVID-19 prolongado.** En la gráfica se describen la frecuencia relativa de la identificación de colonias, clústeres o ninguno de los dos anteriores en los cultivos de CMNs de los pacientes durante un período de 30 días. Se realizó la prueba de  $X^2$  para determinar si hay asociación entre las observaciones de los cultivos y el sexo. Se consideró una  $p < 0.05$  como diferente.

En cuanto a la proliferación (**Figura 15**), para su evaluación solamente se consideraron a los pacientes en los que se detectaron colonias de CFCEs (n=18, 7 son mujeres y 11 son hombres). La proliferación se clasificó en 3 grados de acuerdo con el número de pasajes y la morfología de las células. Se obtuvo que el grado de proliferación más frecuente entre los pacientes con TVP post COVID-19 fue la senescencia, en la cual las células se caracterizan por tener una morfología más

alargada, “de huevo estrellado” o la formación de múltiples vacuolas (**Figura 14C**). La tasa de senescencia más alta corresponde a los hombres con un 43.8% (n=7) mientras que para las mujeres fue del 15.4% (n=2). Curiosamente el segundo grado de proliferación más frecuente es de tipo “alta”, son aquellas colonias en las cuales las CFCEs se encuentran muy unidas entre sí con la particular área Cobblestone o de empedrado (**Figura 14A**); el 18.8% de los hombres y el 15.4% de las mujeres presentaron este tipo de proliferación y morfología. En menor prevalencia se encuentra la proliferación baja (**Figura 14B**), CFCEs que se caracterizan por ser más agrandadas y tener poca unión entre ellas; este grado de proliferación predomina en mujeres con el 23.1%, en comparación, con el 6.25% de los hombres. La prueba de U de Mann-Whitney indica que no hay diferencias entre los sexos y los grados de proliferación ( $p=0.325$ ).



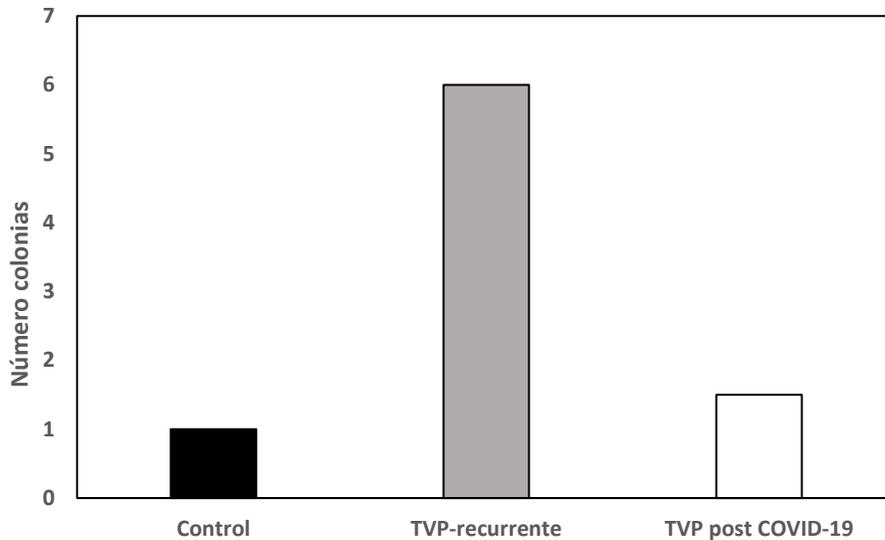
**Figura 14. La senescencia celular es más frecuente en los pacientes con TVP por COVID-19 prolongado.** A) Las flechas discontinuas muestran células con proliferación alta, alcanzan la confluencia y se observa el área Cobblestone; B) células con baja interacción entre ellas y con morfología senescente y C) las flechas continuas muestran una célula senescente. Figura representativa de la capacidad proliferativa de los cultivos de CMNs de los pacientes con COVID-19 prolongado. Imagen tomada con microscopio Olympus CKX41, objetivo 4x.



**Figura 15. La capacidad proliferativa de las CFCEs no se mantiene a largo plazo en los pacientes con TVP por COVID-19 prolongado.** La figura muestra la capacidad proliferativa de las colonias de las CFCEs detectadas en los pacientes. Una proliferación alta corresponde a un cultivo en el que las células se cosecharon hasta un pasaje o resiembra 3 (R3); una proliferación baja son colonias que alcanzaron un pasaje 1 y la senescencia es el grado más bajo de proliferación en el cuál las células no lograron expandirse a un pasaje R1. Se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para determinar si existen diferencias en los grados de proliferación de las colonias de hombres y mujeres, se consideró una  $p < 0.05$  como diferente. R3: resiembra 3. R1:resiembra 1.

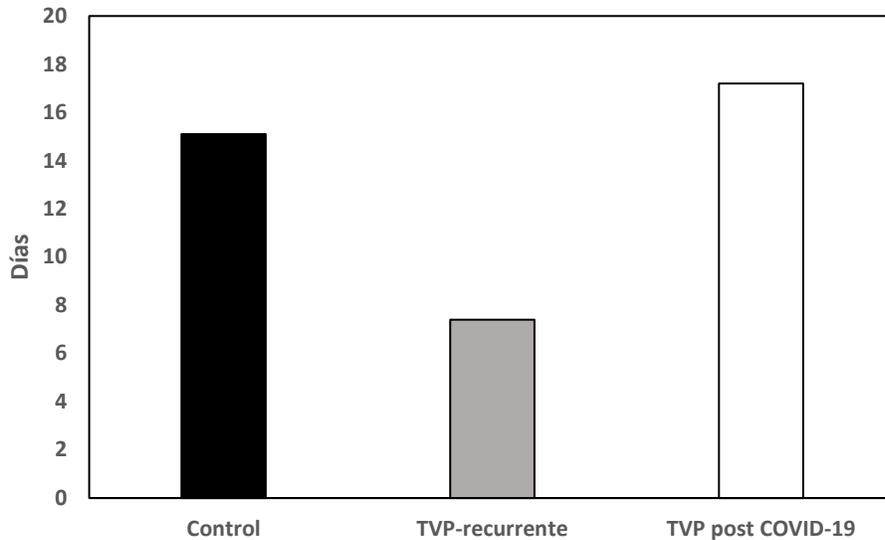
El número de colonias de CFCEs y el día de su detección de los pacientes del estudio (a partir de ahora se referirán como TVP-post COVID-19) se comparó con datos de controles y pacientes con trombosis recurrente (TVP-recurrente) antes de COVID-19, únicamente se consideraron a aquellos pacientes en los que se detectaron colonias de CFCEs.

Con respecto al número de colonias (**Figura 16**), se encontraron diferencias en el número de colonias entre pacientes TVP-post COVID-19 con los pacientes de TVP-recurrente ( $p=0.004$ ), también entre los controles con los pacientes de TVP-recurrente ( $p=0.002$ ). Sin embargo, el número de colonias no difiere entre los controles y los pacientes con TVP-post COVID-19 ( $p=1$ ). Para los controles se obtuvo una media de 1 colonia con una DE de 0.51, para TVP-recurrente 6 colonias con 2.7 de DE y para TVP-post COVID-19 1.5 colonias con DE 1.18.



**Figura 16. La frecuencia de colonias de CFCEs en pacientes con TVP post COVID-19 es similar a la de los controles.** Se compara el número de colonias en controles, pacientes con TVP-recurrente y sujetos con TVP-post COVID-19, los valores se representan como mediana. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar entre los 3 grupos, seguida de una prueba post-hoc para identificar diferencias entre grupos. Se consideró una  $p < 0.05$  como diferencia entre grupos.

Para el número de días en los que se identificaron las colonias (**Figura 17**), los resultados son similares al número de colonias entre los 3 grupos. Se obtuvo que existen diferencias entre controles vs pacientes con TVP-recurrente ( $p=0.01$ ) y pacientes con TVP-post COVID-19 vs pacientes con TVP-recurrente ( $p=0.000$ ), pero no hay diferencias entre controles vs pacientes con TVP-post COVID-19 ( $p=0.385$ ). La media y DE de los controles es de  $15.1 \pm 1.66$ , para los pacientes con TVP-recurrente es de  $7.4 \pm 1.42$  y para los pacientes con TVP- Post COVID-19 es de  $17.2 \pm 5.7$ .



**Figura 17. La presencia de las colonias de CFCEs de los pacientes con TVP post COVID-19 es semejante a la de los controles.** La gráfica muestra un análisis comparativo de los días en los que se detectan las colonias de CFCEs para donadores, pacientes con TVP-recurrente y pacientes con TVP-post COVID-19, los valores se representan como media. Se realizó la prueba de ANOVA para comparar entre los 3 grupos, seguida de una prueba post-hoc para identificar diferencias entre grupos. se consideró una  $p < 0.05$  como diferencia entre grupos.

## Discusión de resultados

La pandemia de COVID-19 constituyó una emergencia de salud pública de carácter internacional que causó la muerte e infección de millones de personas, lo que colapso los sistemas de salud en el mundo. El fin de la pandemia fue declarado por la OMS en mayo de 2023, sin embargo, el SARS-CoV-2 continúa representando una amenaza para la salud de las poblaciones, porque aún se siguen reportando casos de muertes y de infección (54) . Además, ahora se suma el riesgo de padecer una nueva condición denominada COVID-prolongado. En especial, se indica que el COVID prolongado es una enfermedad vascular porque el virus es capaz de dañar directamente a las CEs de los vasos sanguíneos, debido a que la proteína espícula puede interactuar con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA 2) de las CEs, esto favorece la inflamación y la activación de mecanismos procoagulantes, que incrementan el riesgo en la formación de trombos, los cuales pueden transformarse en émbolos y llegar a otros órganos y perjudicarlos, convirtiendo a la trombosis en una de las secuelas más complicadas y graves del COVID-19 persistente (5,55).

La mayoría de las personas con COVID-19 persistente han notificado síntomas variados, siendo más común la fatiga, la disnea, el dolor de cabeza o la confusión mental. Estudios demográficos han indicado que el COVID-19 prolongado afecta en su mayoría a personas con factores de riesgo o comorbilidades como: uso de tabaco, diabetes mellitus, hipertensión o alguna enfermedad cardiovascular (5), debido a esto, la mayoría de los estudios demográficos del COVID-19 prolongado suelen enfocarse en esta población. La TVP como una secuela a largo plazo del SARS-CoV-2 no es la excepción, diversos estudios indican que el riesgo de TVP post viral aumenta en pacientes hospitalizados por COVID-19 incluso después del alta hospitalaria, en personas mayores, en hombres, estadías hospitalarias largas, tratamientos invasivos que requirieron ventilación mecánica y la falta de tromboprolifaxis (56). Como lo observado en un estudio prospectivo de 102 pacientes con infección post-COVID que requirieron estancia hospitalaria, se encontró la persistencia de un estado procoagulante en el 75% de los pacientes a los 3 meses, en el 50% a los 6 meses y en el 30% a los 12-18 meses de seguimiento, siendo mayor el riesgo de acuerdo con la edad, gravedad de la infección aguda y persistencia de síntomas. Este estado procoagulante se determinó de acuerdo con un fibrinógeno >400 mg/dL, o dímero D >500 ng/dL o con el número de plaquetas >450,000 cel/UL, o una lisis máxima del coágulo en la prueba viscoelástica < 2% (57). En otro estudio con 398,350 pacientes ambulatorios que tuvieron COVID-19, se evaluó el riesgo de TEP por alrededor de un año, se identificaron 292 (0.1%) eventos de TEP, con una tasa general de 0.26 (intervalo de confianza (IC) del 95%, (0.24-0.30) por 100 personas-año, los factores asociados a riesgos fueron en individuos mayores a 55 años, hombres o antecedentes de TEP o trombofilia (58). Estos estudios nos demuestran las alteraciones a largo plazo del virus sobre el sistema de la coagulación, sin embargo, pocos estudios abordan estas implicaciones en individuos jóvenes, sin factores de riesgo y con una enfermedad leve-moderada del COVID-19. Por lo cual, uno de los objetivos principales de esta investigación fue estudiar las características demográficas de sujetos sanos que tuvieron una enfermedad leve-moderada de COVID-19 y que aún así desarrollaron eventos de trombosis meses después de haberse recuperado de la infección. En

este estudio se encontró una prevalencia ligeramente mayor en hombres, que concuerda con las tendencias anteriormente mencionadas para TVP por COVID prolongado. No obstante, el sexo no representó una asociación para otros aspectos que se evaluaron como la edad, el tipo de trombosis y el tiempo entre el primer evento de trombosis y la primera infección por COVID-19. En México, los hombres tienen una predisposición más alta de TVP que las mujeres, y su incidencia aumenta con la edad en ambos sexos, siendo mayor después de los 40 años y en personas con factores de riesgo como la diabetes, altos niveles de colesterol o triglicéridos (59). Debido a que los pacientes analizados en nuestro estudio no tienen los factores de riesgo que predisponen a la trombosis (como una edad avanzada o comorbilidades) y se descartó la presencia de otras enfermedades que pudieran influenciar la trombosis; las pruebas positivas de COVID-19 antes del evento de trombótico (en promedio 15 meses desde la infección inicial), nos indican que podría tratarse de un efecto a largo plazo del SARS-CoV-2.

A pesar de que los estudios señalan que la trombosis en individuos con las características de inclusión en nuestro estudio (jóvenes, sanos y ambulatorios) son poco comunes, al realizar una búsqueda en PubMed, se encontraron algunos casos interesantes. Veyre et al., reportó el caso de un hombre de 24 años con un evento de trombosis arterial femoral, este paciente no contaba con factores de riesgo cardiovasculares, ni aterosclerosis, no estaba expuesto a tratamientos o drogas, además no se encontraron elementos que indicarán una trombofilia, únicamente el paciente había referido tener síntomas de COVID-19 no grave días antes de la trombosis, la RT-PCR nasal en el momento fue negativa pero la prueba serológica fue positiva (60). Una serie de casos más son documentados por Ashkenazy y colaboradores, informan sobre 12 pacientes con oclusión de la vena central de la retina (OVCR) con infección confirmada de COVID-19, en su estudio eliminaron aquellos pacientes con más de 50 años, pacientes hospitalizados y con factores de riesgo. Encontraron una mediana de edad de 32 años, el tiempo medio desde el diagnóstico del COVID-19 hasta el desarrollo de los síntomas oculares fue de 6,9 semanas. De igual manera, reportan que uno de los pacientes, tuvo el evento de OVCR a las 18 semanas (4 meses) del diagnóstico de COVID-19, lo que podría

indicar un posible caso de COVID prolongado (61). La información encontrada sobre casos de trombosis, como una consecuencia de COVID prolongado en adultos jóvenes sanos es escasa, lo que dificulta la comparación de los resultados de este estudio. Sin embargo, se encontró un caso reportado por Al-abri et al., de un hombre sano de 33 años que después de 6 meses de haberse infectado por COVID-19 presenta oclusión de la vena central de retina (OVCR), se descartaron factores de riesgo y marcadores de trombofilia hereditaria (deficiencia de proteínas C y S, deficiencia de antitrombina, mutación en el factor de Leiden, etc.) (62), de tal manera que el SARS-CoV-2 pudo ser el detonante para este evento de trombosis. Si bien algunos de estos ejemplos no corresponden a casos de COVID-prolongado debido a que describen eventos de trombosis que ocurren en la fase aguda de la infección, resaltan la posible relación entre el COVID-19 y la trombosis en adultos jóvenes sin factores de riesgo. Además, estos casos junto con los reportados en nuestro estudio sugieren que las personas con una vida saludable, que padecieron una enfermedad de COVID-19 leve, no están exentas de tener una complicación tan grave como es la trombosis cuando se infectan por el SARS-CoV-2.

La edad media de los participantes de este estudio fue de 34 años, resulta interesante que al realizar una revisión en el informe integral de COVID-19 en México a finales de 2023, encontramos que los grupos de edad con prueba confirmatoria de COVID-19 son predominantemente los de 25 a 29 años y en segundo lugar los de 30 a 34 años con una mediana de edad de 39 años (63), lo que coincide con nuestra investigación, lo cual sugiere que la población con en este rango de edad podrían estar en riesgo de tener trombosis por COVID-19 persistente sin tener conocimiento de dicho factor que pueda predisponer a la trombosis, ya que un alto porcentaje de la población a nivel global tuvo una enfermedad de COVID-19 asintomática y mucho de ellos no tuvieron oportunidad de realizarse pruebas rápidas que pudieran determinar si estaban o no infectados y ser portadores y vectores de la enfermedad. La trombosis por COVID-19 prolongado en personas con edades tan jóvenes trae implicaciones sociales importantes, porque pueden verse afectados en realizar sus actividades diarias como trabajar ya que después del evento trombótico persisten ciertos síntomas como limitación para hacer

ejercicio, tales como disnea o el síndrome postrombótico, aunado a un decaimiento en la salud mental como depresión, ansiedad, incertidumbre de la salud y miedo a la recurrencia (64). Se estima que el COVID-19 prolongado generará costos futuros de hasta 4 billones de dólares según economistas de Estados Unidos (5). Estos costos podrían incrementarse considerando que los pacientes con COVID-19 prolongado en su edad más productiva, requerirán tratamiento y atención médica constante, lo que podría afectar gravemente a los sistemas de salud pública.

Las vacunas contra el SARS-CoV-2 y la trombosis han sido un tema bastante controversial, ya que, se han reportado casos poco inusuales en pacientes que después de la vacunación forman trombos. En este estudio, la mayoría de los pacientes tenían al menos una dosis de las vacunas contra el COVID-19, entre las que figuran la vacuna Sputnik, Pfizer y AstraZeneca. Los eventos de trombosis denominados como TTIV (trombocitopenia trombótica inmunitaria inducida por la vacuna) suelen presentarse poco tiempo después de la vacunación (de 3 a 48 días) y se han atribuido principalmente a vacunas basadas en vectores virales como la vacuna ChAdOx1 nCov-19 de AstraZeneca que estimulan la producción de anticuerpos anti-factor plaquetario 4 activador de plaquetas (PF4) (50). Los pacientes que forman parte de nuestro estudio, algunos tienen vacunas basadas en adenovirus, una de las limitaciones de nuestro estudio, es que no se consideró la fecha exacta de la vacunación y no se obtuvieron las concentraciones de anticuerpos anti-PF4 en los pacientes con estas vacunas, con lo cual no se pudo establecer una relación directa entre la vacunación y los eventos trombóticos. A pesar de estos casos, se ha reportado ampliamente que la vacunación tiene más beneficios que riesgos.

Debido a que los eventos de trombosis por COVID-19 persistente están fuertemente relacionados con la disfunción endotelial, se tuvo como finalidad evaluar las características proliferativas de las CFCEs en los individuos de este estudio para determinar si existen alteraciones que pudieran estar relacionadas con el desarrollo de los eventos trombóticos. Las CFCEs son una población celular discreta y rara que se localiza en la circulación de la SP o en nichos vasculares y han sido utilizadas

como biomarcadores de enfermedad cardiovascular (8,10). De las características que se evaluaron en nuestro estudio, no se detectaron diferencias entre sexos. Las CEs disfuncionales liberan diferentes citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que estimulan la migración de las CFCEs a los sitios de daño para que contribuyan a la regeneración endotelial vascular. De tal forma, que la frecuencia y movilización de las CFCEs ha sido estudiada en varias enfermedades, como lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo, Hernández-López et al., demostraron un aumento de CFCEs en pacientes con TVP recurrente, pero con una baja capacidad proliferativa asociada a un incremento de radicales libre y de senescencia; mientras que en otro estudio de fibrosis pulmonar idiopática, se demostró una deficiencia en la presencia de dichas células en circulación (65,66). En este estudio, la frecuencia de colonias de CFCEs en los pacientes con trombosis post COVID-19 no fue diferente en relación con los donadores que fueron clasificados como controles (en ambos la frecuencia fue de 1 colonia de CFCEs). No obstante, a lo anterior, si encontramos una diferencia significativa en los pacientes de trombosis venosa profunda recurrente antes de la pandemia de COVID-19 (6 colonias de CFCEs). Cabe mencionar, que las CFCEs identificadas en muestras de pacientes con trombosis post COVID-19 fueron las que más tardaron en ser detectadas en el cultivo celular con respecto a los donadores control y con TVP recurrente. Esto sugiere, posibles alteraciones en la migración o angiogénesis de las CFCEs y, por tanto, una disminución en la regeneración vascular endotelial, ya que, parece ser que no existe una respuesta adecuada de reparación del endotelio ante el daño a largo plazo del SARS-CoV-2, como ocurre en otras situaciones de emergencia (66). Poyatos et al., estudiaron las características de las CFCEs en 72 pacientes mayores de 50 años recuperados de COVID-19 a los 3, 6 y 12 meses después de la enfermedad inicial, de los cuales 35 tuvieron embolias pulmonares, los resultados fueron comparados con un grupo control (sin infecciones previas de SARS-CoV-2), encontraron un aumento de las CFCEs a los 3 ( $2.79 \pm$  vs  $1.23 \pm 1.86$ ,  $p < 0.05$ ), 6 ( $2.78 \pm 2.00$  vs  $1.23 \pm 1.86$ ,  $p < 0.05$ ) y 12 meses ( $2.90 \pm 2.61$  vs  $1.23 \pm 1.86$ ,  $p < 0.05$ ) en pacientes con COVID-19 con respecto a su grupo control, lo que difiere con nuestros resultados. No obstante, su

perfil angiogénico muestra una disminución en la cantidad de proteínas relacionadas con la angiogénesis como MMP-8/9 (metaloproteinasa 8 y 9), PDGF-AA/AB-BB (Factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A y B), IGFBP-1/2 (proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina), CXCL4 (factor plaquetario 4), FT, endoglina o angiotensina que se mantuvo hasta los 12 meses, en comparación, con los controles que nunca se infectaron por COVID-19 (67). Esto sugiere una reducción en la capacidad angiogénica de las CFCEs ante el daño causado por el SARS-CoV-2.

En la mayoría de los cultivos celulares, se observaron colonias de CFCEs con características morfológicas correspondientes a células senescentes (vacuolas, tamaño alargado, células dispersas) y con una reducida capacidad proliferativa, la cual se reflejó en la ausencia de la formación de la monocapa endotelial confluyente de células en las resiembras celulares posteriores y en consecuencia el agotamiento de los cultivos celulares, lo cual sugiere una incrementada senescencia replicativa de las CFCEs. La senescencia es un estado de detención permanente en el ciclo celular en respuesta a factores estresantes, es un mecanismo que previene la proliferación descontrolada de células dañadas, pero que en exceso puede desencadenar enfermedades (32). La senescencia es una de las consecuencias de la disfunción endotelial, y a su vez, contribuye al aumento de la disfunción endotelial, ya que no se sintetizan moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes como el óxido nítrico que evita la adhesión plaquetaria y formación de coágulos o trombos; lo que representa una alteración crónica, al que puede llegar manteniendo un mecanismo de retroalimentación negativa y disfuncional (7). Una de las limitaciones del estudio, fue que no se evaluaron otros parámetros de funcionalidad endotelial como la formación de estructuras tubulares o la producción de NO. Sin embargo, en un trabajo publicado por nuestro grupo de investigación encontró que en pacientes entre 20 y 50 años de edad, recuperados de COVID-19 leve-moderado, entre los 15 y 30 días post-COVID-19, sus CFCEs presentaban alteraciones morfológicas y una reducción en la capacidad proliferativa, lo cual reflejó un estado senescente en comparación con los donadores, que fueron considerados como controles y de pacientes con trombosis venosa profunda recurrente previa a la pandemia de

COVID-19, lo que puede estar directamente relacionado con nuestros resultados. Además de una capacidad reducida de estructuras tubulares *in vitro*, en pacientes recuperados con COVID-19, esto igualmente concuerda con una reducción de la angiogénesis y la capacidad regenerativa del endotelio vascular (65).

La senescencia que se observa en los cultivos de las CFCEs puede deberse a una combinación de mecanismos directos e indirectos del SARS-CoV-2 sobre el endotelio. La inflamación y las especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales son los principales orquestadores indirectos de la disfunción endotelial por la presencia del SARS-COV-2. En pacientes con COVID prolongado, se han detectado niveles elevados de ROS así como alteraciones mitocondriales que contribuyen a su incremento, estos ROS degradan al ADN gracias a la activación de las caspasa 3 y caspasa 6 generando muerte celular por apoptosis posterior a la senescencia (68). Igualmente se han determinado altas concentraciones de citocinas proinflamatorias como IL-6, PCR, IL-1 $\alpha$  o TNF- $\alpha$  que también causan senescencia y formación de trombos (69,70). Las células endoteliales senescentes expresan mayores moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 que favorecen la interacción con leucocitos, los cuales producen más citocinas inflamatorias y promueven mecanismos protrombóticos como la expresión de FT, FvW o de endotelina. La inflamación y ROS persistente además de inducir la activación y senescencia de las CEs, también activan a otros componentes como a las plaquetas, al complemento o a las células inmunitarias como los neutrófilos, generando un círculo vicioso donde la inflamación causa trombosis y los trombos resultantes contribuyen a la inflamación, esto destruye la función protectora del endotelio, causando una coagulación anormal (47). Lo anterior puede reflejarse, en los niveles elevados de dímero D varios meses después de la infección inicial en pacientes con COVID-19 prolongado (69). En el caso de nuestro estudio, al evaluar los resultados de los laboratorios clínicos, el VSG, las globulinas, así como los niveles de leucocitos se encuentran en niveles normales, lo que indica baja inflamación. Asimismo, la cantidad de plaquetas, el TP y TTPa se encontraron dentro de los parámetros normales, tal vez debido a que las muestras de SP obtenidas de los pacientes de nuestro estudio, se encuentran bajo un tratamiento anticoagulante. En futuros

estudios sería interesante relacionar los resultados de las CFCEs de estos pacientes con la cuantificación y monitoreo por diferentes tiempos de otros biomarcadores de inflamación (PCR o citocinas) para tener información más amplia de si estos mecanismos están alterados y son responsables de la senescencia que observamos en los cultivos y de los eventos de trombosis en los pacientes.

El SARS-CoV-2 también puede persistir en diferentes tipos de células y causar daño, esto incluye a las CEs. Esta facilidad de infección es debido a que la proteína S del virus tiene una alta afinidad con su receptor, la ECA2, que es expresada en varios tejidos. Por ejemplo, en un estudio realizado por Bussani y colaboradores, identificaron ARN viral y anticuerpos contra la proteína S principalmente en condrocitos (células presentes en el cartílago) y en menor medida en CEs, esto en pacientes que se recuperaron de COVID-19 pero que, a pesar de las pruebas negativas de PCR para el SARS-CoV-2 en un periodo de 11 a 300 días, progresaron con la enfermedad hasta que murieron (71). La detección de componentes del virus (p. ej, ARN viral o resto de la proteína S) en las CFCEs de los pacientes que ingresan a la unidad, también podría ser evaluada para tener una comprensión mayor de la fisiopatología de la trombosis por COVID prolongado. Además, la inflamación desregulada del COVID-19 persistente puede favorecer la reactivación de otros patógenos latentes en el cuerpo (por ejemplo, el virus de Epstein-Barr), lo que también contribuye al desarrollo de trombosis después de la infección por SARS-CoV-2 (5).

Asimismo se han reportado otras alteraciones que causa el SARS-CoV-2 en el endotelio, por ejemplo, Saito y colaboradores realizaron un perfil metabólico con plasma de pacientes con COVID-19 prolongado en donde encontraron un disminución en las concentraciones del aminoácido arginina por hasta 12 meses después de la enfermedad inicial, este aminoácido es indispensable para la función normal de las CEs, porque es uno de los sustratos en la síntesis del NO, una potente molécula antiplaquetaria y vasodilatadora (70). Igualmente, se ha reportado la pérdida del glucocáliz en pacientes con COVID-19 prolongado, lo que aumenta la permeabilidad vascular y favorece la formación de edemas.

Cabe resaltar que la disfunción endotelial por COVID-19 a largo plazo no solo es un riesgo para la trombosis, también se ha asociado a otras sintomatologías como arritmias, fatiga crónica o incluso problemas neurológicos debido a que el virus causa daño en la barrera hematoencefálica (72,73).

Otra limitación para considerar es el número reducido de pacientes con los que trabajamos, por lo que nuestro grupo de trabajo sigue reclutando pacientes con COVID-19 prolongado y evaluar mecanismos intracelulares que estén directamente relacionados con la disfunción morfológica observada en nuestros resultados. Para identificarlos, analizar un esquema de tratamiento y mejorar la calidad de vida. Igualmente, considerar otros aspectos como la trombosis por vacuna, ya que, si bien es poco frecuente, estudiarla traerá otros beneficios como la elaboración de mejores vacunas a futuro. Así como considerar cómo influyen las diferentes variantes del SARS-CoV-2 en el riesgo de trombosis a largo plazo. De igual manera, es necesario hacer un seguimiento por más tiempo en estos pacientes, lo que podría generar información sobre el tiempo que perduran los efectos del virus en el endotelio y cómo evolucionan los pacientes con respecto a sus síntomas. A pesar de las limitaciones de nuestro estudio, nuestros hallazgos ofrecen información relevante sobre las alteraciones a largo plazo que tienen las CEs por el efecto del SARS-CoV-2 en una población poco estudiada, si bien estos casos son poco comunes no significa que no deban ser investigados. Son necesarios más proyectos que estudien los mecanismos que causan la alteración de la disfunción endotelial, las consecuencias y los potenciales biomarcadores que permitan pronosticar los eventos de trombosis porque si algo nos ha demostrado el SARS-CoV-2 es que llegó para quedarse.

## Conclusiones

Las CFCEs de los pacientes con trombosis post COVID-19 como una secuela a largo plazo se caracterizan por tener una baja frecuencia en SP, una morfología alterada (senescente) y un bajo potencial proliferativo. Lo anterior sugiere que el endotelio vascular dañado por la presencia del SARS-CoV-2 no logra alcanzar las condiciones ideales y en consecuencia el riesgo de trombosis.

## Perspectivas

- Realizar estudios a nivel del genoma para determinar posibles alteraciones en el perfil de expresión de genes relacionados con la fisiología endotelial.
- Determinar la presencia de fragmentos virales del SARS-CoV-2 que pudieran detonar una respuesta inmunológica generando inflamación crónica, disfunción endotelial y en consecuencia un factor de riesgo de trombosis.

## Referencias

1. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol* [Internet]. el 1 de abril de 2020 [citado el 30 de noviembre de 2024];92(4):401–2. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31950516/>
2. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020 [Internet]. [citado el 30 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
3. Bialek S, Boundy E, Bowen V, Chow N, Cohn A, Dowling N, et al. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - United States, February 12-March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. el 27 de marzo de 2020 [citado el 30 de noviembre de 2024];69(12):343–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32214079/>
4. Enfermedad por coronavirus (COVID-19): afección posterior a la COVID-19 [Internet]. [citado el 19 de octubre de 2024]. Disponible en:

[https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-post-covid-19-condition](https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-post-covid-19-condition)

5. Turner S, Khan MA, Putrino D, Woodcock A, Kell BD, Pretorius E. Long COVID: pathophysiological factors and abnormalities of coagulation. . *TrendsEndocrinolMetab.* 2023;34(6):321–44.
6. Sutanto H, Soegiarto G. Risk of Thrombosis during and after a SARS-CoV-2 Infection: Pathogenesis, Diagnostic Approach, and Management. *Hematol Rep.* el 3 de abril de 2023;15(2):225–43.
7. Gallo G, Savoia C. New Insights into Endothelial Dysfunction in Cardiometabolic Diseases: Potential Mechanisms and Clinical Implications. *Int J Mol Sci [Internet].* el 1 de marzo de 2024 [citado el 28 de septiembre de 2024];25(5). Disponible en: </pmc/articles/PMC10932073/>
8. Melero-Martin JM. Human Endothelial Colony-Forming Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* el 4 de abril de 2022;a041154.
9. Banno K, Yoder MC. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr Res.* el 18 de enero de 2018;83(1–2):283–90.
10. de Boer S, Bowman M, Notley C, Mo A, Lima P, de Jong A, et al. Endothelial characteristics in healthy endothelial colony forming cells; generating a robust and valid ex vivo model for vascular disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis [Internet].* el 1 de octubre de 2020 [citado el 28 de septiembre de 2024];18(10):2721. Disponible en: </pmc/articles/PMC7590112/>
11. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci [Internet].* el 1 de septiembre de 2019 [citado el 29 de septiembre de 2024];20(18). Disponible en: </pmc/articles/PMC6769656/>
12. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res [Internet].* el 1 de marzo de 2022 [citado el 28 de septiembre de 2024];387(3):391. Disponible en: </pmc/articles/PMC8975780/>
13. González-Villalva A, Morales-Ricardes G, Rojas-Lemus M, Bizarro-Nevarés P, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, et al. El endotelio sano y su disfunción en el riesgo cardiovascular. *Revista de la Facultad de Medicina (México) [Internet].* el 10 de noviembre de 2023 [citado el 29 de septiembre de 2024];66(6):37–52. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422023000600037&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422023000600037&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
14. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci [Internet].* el 9 de noviembre de 2013 [citado el 29 de septiembre de 2024];9(10):1057. Disponible en: </pmc/articles/PMC3831119/>

15. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* [Internet]. el 1 de enero de 2018 [citado el 29 de septiembre de 2024];98(1):3. Disponible en: /pmc/articles/PMC5866357/
16. Goveia J, Stapor P, Carmeliet P. Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. *EMBO Mol Med* [Internet]. septiembre de 2014 [citado el 29 de septiembre de 2024];6(9):1105. Disponible en: /pmc/articles/PMC4197858/
17. Carvajal Carvajal C. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Med.legCostaRica*. 2017;34(2):90–100.
18. Dudley AC, Griffioen AW. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*. el 15 de agosto de 2023;26(3):313–47.
19. Del Gaudio F, Liu D, Lendahl U. Notch signalling in healthy and diseased vasculature. *Open Biol* [Internet]. 2022 [citado el 29 de septiembre de 2024];12(4). Disponible en: /pmc/articles/PMC9042574/
20. Gao J, Pan X, Li G, Chatterjee E, Xiao J. Physical Exercise Protects Against Endothelial Dysfunction in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Cardiovasc Transl Res* [Internet]. el 1 de junio de 2022 [citado el 30 de septiembre de 2024];15(3):604. Disponible en: /pmc/articles/PMC8447895/
21. Mongiat M, Andreuzzi E, Tarticchio G, Paulitti A. Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. el 1 de noviembre de 2016;17(11):1822.
22. Luo Z, Yao J, Wang Z, Xu J. Mitochondria in endothelial cells angiogenesis and function: current understanding and future perspectives. *J Transl Med*. el 5 de julio de 2023;21(1):441.
23. Nitzsche B, Rong WW, Goede A, Hoffmann B, Scarpa F, Kuebler WM, et al. Coalescent angiogenesis—evidence for a novel concept of vascular network maturation. *Angiogenesis*. el 14 de febrero de 2022;25(1):35–45.
24. Norooznejhad AH, Mansouri K. Endothelial cell dysfunction, coagulation, and angiogenesis in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Microvasc Res* [Internet]. el 1 de septiembre de 2021 [citado el 29 de septiembre de 2024];137:104188. Disponible en: /pmc/articles/PMC8135191/
25. Bravo B, Fernández de Castro L, Buendía I, Santos X, Gortázar A. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madre mesenquimales humanas. *RevistadeOsteoporosisyMetabolismoMineral*. 2017;9(1):5–12.
26. Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. el 2 de septiembre de 2020;5(1):181.
27. Guglielmone R, De Elías R, Kiener O, Kiener G, Maldonado V. Importancia clínica y diagnóstica de la relación receptor de tirosin-quinasa tipo 1 en su

- forma soluble y el factor de crecimiento placentario. *ActaBioquímicaclínicalatinoamerica*. 2020;54(2):125–33.
28. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, Sun LP, Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1 [Internet]. el 11 de mayo de 2023 [citado el 29 de septiembre de 2024];8(1):1–39. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01460-1>
  29. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología . 13a ed. Mexico: MedicaPanamericana; 2006. 803–810 p.
  30. Silverthorn DU. Fisiología Humana. Un enfoque integrado. 4a ed. Argentina: MedicaPanamericana; 2008. 501–503 p.
  31. Baselet B, Sonveaux P, Baatout S, Aerts A. Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. el 28 de febrero de 2019 [citado el 30 de septiembre de 2024];76(4):699. Disponible en: </pmc/articles/PMC6514067/>
  32. Bloom SI, Islam MT, Lesniewski LA, Donato AJ. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. el 1 de enero de 2023 [citado el 30 de septiembre de 2024];20(1):38. Disponible en: </pmc/articles/PMC10026597/>
  33. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 2 de abril de 2021 [citado el 30 de septiembre de 2024];22(8). Disponible en: </pmc/articles/PMC8068178/>
  34. Steyers C, Miller F. Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. el 25 de junio de 2014;15(7):11324–49.
  35. Colling ME, Tourdot BE, Kanthi Y. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism. *Circ Res* [Internet]. el 6 de junio de 2021 [citado el 30 de septiembre de 2024];128(12):2017. Disponible en: </pmc/articles/PMC8202069/>
  36. Golan DE. Principios de Farmacología. Bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico. 3a ed. China: LippincottWilliams&Wilkins; 2012.
  37. Majluf Cruz A, Espinosa-Larrañaga F. Fisiopatología de la trombosis. *GacMedMex*. 2007;143:11–4.
  38. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J*. 2016;38(11):785–91.
  39. Ashorobi D, Ameer MA, Fernandez R. Trombosis. *StatPearls*. 2024;
  40. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:3 [Internet]. el 6 de octubre de 2020

- [citado el 19 de octubre de 2024];19(3):141–54. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
41. Santos-López G, Cortés-Hernández P, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. SARS-CoV-2: basic concepts, origin and treatment advances. *Gac Med Mex* [Internet]. el 1 de enero de 2021 [citado el 19 de octubre de 2024];157(1):84–9. Disponible en: [www.gacetamedicademexico.com](http://www.gacetamedicademexico.com)
  42. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmailzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med*. el 6 de febrero de 2021;23(2).
  43. Manta B, Sarkisian AG, García-Fontana B, Pereira-Prado V, Manta B, Sarkisian AG, et al. Fisiopatología de la enfermedad COVID-19. *Odontoestomatología* [Internet]. el 1 de abril de 2022 [citado el 19 de octubre de 2024];24(39). Disponible en: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-93392022000101312&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-93392022000101312&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  44. Enfermedad por coronavirus (COVID-19) [Internet]. [citado el 19 de octubre de 2024]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19))
  45. Santoro L, Zaccone V, Falsetti L, Ruggieri V, Danese M, Miro C, et al. Role of Endothelium in Cardiovascular Sequelae of Long COVID. *Biomedicines* [Internet]. el 1 de agosto de 2023 [citado el 19 de octubre de 2024];11(8):2239. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10452509/>
  46. Nicolai L, Kaiser R, Stark K. Thromboinflammation in long COVID—the elusive key to postinfection sequelae? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. el 1 de agosto de 2023 [citado el 19 de octubre de 2024];21(8):2020–31. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10174338/>
  47. Wang C, Yu C, Jing H, Wu X, Novakovic VA, Xie R, et al. Long COVID: The Nature of Thrombotic Sequelae Determines the Necessity of Early Anticoagulation. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. el 5 de abril de 2022 [citado el 19 de octubre de 2024];12:861703. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9016198/>
  48. Scholkmann F, May CA. COVID-19, post-acute COVID-19 syndrome (PACS, “long COVID”) and post-COVID-19 vaccination syndrome (PCVS, “post-COVIDvac-syndrome”): Similarities and differences. *Pathol Res Pract* [Internet]. el 1 de junio de 2023 [citado el 19 de octubre de 2024];246:154497. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10154064/>
  49. Schönborn L, Seck SE, Thiele T, Warkentin TE, Greinacher A. SARS-CoV-2 Infection in Patients with a History of VITT. *New England Journal of Medicine* [Internet]. el 7 de julio de 2022 [citado el 19 de octubre de 2024];387(1):88–90. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2206601>

50. Selvadurai M V., Favaloro EJ, Chen VM. Mechanisms of Thrombosis in Heparin-Induced Thrombocytopenia and Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. el 12 de junio de 2023 [citado el 19 de octubre de 2024];49(5):444–52. Disponible en: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-0043-1761269>
51. Liu Y, Lyons CJ, Ayu C, O'Brien T. Recent advances in endothelial colony-forming cells: from the transcriptomic perspective. *J Transl Med* [Internet]. el 1 de diciembre de 2024 [citado el 19 de octubre de 2024];22(1):313. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10967123/>
52. Zhang Q, Cannavicci A, Kutryk MJB. Exploring Endothelial Colony-Forming Cells to Better Understand the Pathophysiology of Disease: An Updated Review. *Stem Cells Int* [Internet]. 2022 [citado el 19 de octubre de 2024];2022:4460041. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9126670/>
53. Schwarz N, Yadegari H. Potentials of Endothelial Colony-Forming Cells: Applications in Hemostasis and Thrombosis Disorders, from Unveiling Disease Pathophysiology to Cell Therapy. *Hamostaseologie* [Internet]. el 6 de abril de 2023 [citado el 19 de octubre de 2024];43(5):325–37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37857295/>
54. Se acaba la emergencia por la pandemia, pero la COVID-19 continúa - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado el 25 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/6-5-2023-se-acaba-emergencia-por-pandemia-pero-covid-19-continua>
55. Xu S wen, Ilyas I, Weng J ping. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies. *Acta Pharmacol Sin*. el 17 de abril de 2023;44(4):695–709.
56. Lippi G, Favaloro EJ. Epidemiology and Predisposing Factors of Post-COVID Venous Thrombosis: A Concise Review. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. el 5 de febrero de 2024 [citado el 25 de noviembre de 2024];50(2):271–4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37327881/>
57. Ranucci M, Baryshnikova E, Anguissola M, Pugliese S, Falco M, Menicanti L. The Long Term Residual Effects of COVID-Associated Coagulopathy. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 1 de marzo de 2023 [citado el 25 de noviembre de 2024];24(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36982589/>
58. Fang MC, Reynolds K, Tabada GH, Prasad PA, Sung SH, Parks AL, et al. Assessment of the Risk of Venous Thromboembolism in Nonhospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open* [Internet]. el 13 de marzo de 2023 [citado el 25 de noviembre de 2024];6(3). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36912838/>

59. Instituto Nacional de Rehabilitación. Guía clínica de trombosis venosa profunda. México;2020.32p.
60. Veyre F, Poulain-Veyre C, Esparcieux A, Monsarrat N, Aouifi A, Lapeze J, et al. Femoral Arterial Thrombosis in a Young Adult after Nonsevere COVID-19. *Ann Vasc Surg* [Internet]. el 1 de noviembre de 2020 [citado el 25 de noviembre de 2024];69:85–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32736027/>
61. Ashkenazy N, Patel NA, Sridhar J, Yannuzzi NA, Belin PJ, Kaplan R, et al. Hemi- and Central Retinal Vein Occlusion Associated with COVID-19 Infection in Young Patients without Known Risk Factors. *Ophthalmol Retina* [Internet]. el 1 de junio de 2022 [citado el 25 de noviembre de 2024];6(6):520–30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35278727/>
62. Al-Abri M, Al-Musalami A, Al-Rawahi B, Al-Hinai A, Al-Fadhil N. Central Retinal Vein Occlusion in a Young Healthy COVID-19 Patient: A Case Report and Literature Review. *Middle East Afr J Ophthalmol* [Internet]. el 1 de julio de 2021 [citado el 25 de noviembre de 2024];28(3):199. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8763107/>
63. Informe integral de COVID-19 en México. [Internet]. México:Secretaria de salud. Dirección general de epidemiología; 2023. Disponible en: [https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/covid19/Info-04-23-Int\\_COVID-19.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/covid19/Info-04-23-Int_COVID-19.pdf)
64. Godoy A, Galli NB, Tabares A. Psychological aspects in young people with venous thromboembolic disease, preliminary report. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. septiembre de 2024 [citado el 25 de noviembre de 2024]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39307620/>
65. Alvarado-Moreno JA, Davila-Moreno J, Dominguez-Reyes V, Arreola-Diaz R, Isordia-Salas I, Chavez-Gonzalez A, et al. Morphological and functional alterations in endothelial colony-forming cells from recovered COVID-19 patients. *Thromb Res* [Internet]. el 1 de octubre de 2021 [citado el 25 de noviembre de 2024];206:55–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34411875/>
66. Hernandez-Lopez R, Chavez-Gonzalez A, Torres-Barrera P, Moreno-Lorenzana D, Lopez-DiazGuerrero N, Santiago-German D, et al. Reduced proliferation of endothelial colony-forming cells in unprovoked venous thromboembolic disease as a consequence of endothelial dysfunction. *PLoS One* [Internet]. el 1 de septiembre de 2017 [citado el 25 de noviembre de 2024];12(9). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910333/>
67. Poyatos P, Luque N, Sabater G, Eizaguirre S, Bonnin M, Orriols R, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk in post-COVID-19 patients after 6- and 12-months SARS-CoV-2 infection. *Infection* [Internet]. el 1 de

- agosto de 2024 [citado el 25 de noviembre de 2024];52(4):1269–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38324145/>
68. Georgieva E, Ananiev J, Yovchev Y, Arabadzhiev G, Abrashev H, Abrasheva D, et al. COVID-19 Complications: Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 1 de octubre de 2023 [citado el 25 de noviembre de 2024];24(19). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37834324/>
  69. Tsilingiris D, Vallianou NG, Karampela I, Christodoulatos GS, Papavasileiou G, Petropoulou D, et al. Laboratory Findings and Biomarkers in Long COVID: What Do We Know So Far? Insights into Epidemiology, Pathogenesis, Therapeutic Perspectives and Challenges. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 1 de julio de 2023 [citado el 25 de noviembre de 2024];24(13). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37445634/>
  70. Saito S, Shahbaz S, Luo X, Osman M, Redmond D, Cohen Tervaert JW, et al. Metabolomic and immune alterations in long COVID patients with chronic fatigue syndrome. *Front Immunol* [Internet]. 2024 [citado el 25 de noviembre de 2024];15:1341843. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10830702/>
  71. Bussani R, Zentilin L, Correa R, Colliva A, Silvestri F, Zacchigna S, et al. Persistent SARS-CoV-2 infection in patients seemingly recovered from COVID-19. *J Pathol* [Internet]. el 1 de marzo de 2023 [citado el 25 de noviembre de 2024];259(3):254–63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36651103/>
  72. Qiao H, Deng X, Qiu L, Qu Y, Chiu Y, Chen F, et al. SARS-CoV-2 induces blood-brain barrier and choroid plexus barrier impairments and vascular inflammation in mice. *J Med Virol* [Internet]. el 1 de mayo de 2024 [citado el 25 de noviembre de 2024];96(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38747003/>
  73. Haffke M, Freitag H, Rudolf G, Seifert M, Doehner W, Scherbakov N, et al. Endothelial dysfunction and altered endothelial biomarkers in patients with post-COVID-19 syndrome and chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *J Transl Med* [Internet]. el 1 de diciembre de 2022 [citado el 25 de noviembre de 2024];20(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35317812/>

## **Anexos**

### **Anexo 1**

#### **Hoja de recolección de datos**

Información Sociodemográfica

Nombre

Edad

Actividad física (estilo de vida)

Comorbilidades (Diabetes, Hipertensión, Síndrome metabólico u obesidad)

Tabaquismo

Antecedentes familiares (Infarto, Trombosis, Comorbilidades)

Mujeres Anticonceptivos orales

Fecha de COVID-19

Número de infecciones

Vacunas (cuales y cuantas)

Fecha de evento de trombosis

Tipo de trombosis

Anticoagulante (Cual)

Que otra sintomatología presenta.

## Productos académicos



## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

**Jeniffer Resendiz Vazquez**

attended

**ISTH 2024 CONGRESS**

held between

**Saturday, June 22, 2024 to Wednesday, June 26, 2024**



If you would like to unsubscribe from ISTH Congress emails, please [click here](#) to manage your preferences.  
If you would like to unsubscribe from all ISTH emails, you may do so [here](#).



Action 	Manuscript Number ▲	Title ▲	Authorship ▲	Initial Date Submitted ▼	Status Date ▲	Current Status ▲
<a href="#">View Submission</a>	ARCMED-D-25-00062	Deep vein thrombosis in patients recovered from COVID-19: a long-term sequel	Other Author	Jan 16, 2025	Feb 04, 2025	Under Review